دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی

گروه آموزشی علوم باغبانی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی علوم باغبانی گرایش بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی

عنوان:

بررسی پاسخ ژنوتیپ‌های خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای

استاد راهنما:

دکتر مهدی محب الدینی

استاد مشاور:

دکتر اسماعیل چمنی

پژوهشگر:

سهیلا ندائی

بهمن - ۱۳۹۴

نام خانوادگی دانشجو: **ندائی** نام: **سهیلا**

عنوان پایان‌نامه: **بررسی پاسخ ژنوتیپ‌های خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در شرایط درون شیشه‌ای**

استاد راهنما: **دکتر مهدی محب‌الدینی**

استاد مشاور: **دکتر اسماعیل چمنی**

مقطع تحصیلی: **کارشناسی ارشد** رشته: **علوم باغبانی**

گرایش: **بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی** دانشگاه **محقق اردبیلی**

دانشکده‌ی **کشاورزی و منابع طبیعی** تاریخ دفاع: **۹۴/۱۱/۲۸** تعداد صفحات: **۸۶**

چکیده:

گیاه خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. و یک‌ساله از خانواده Portulacaceae می‌باشد. خرفه به علت داشتن متابولیت‌های ثانویه با ارزشی همانند نورآدرنالین، دوپامین و اسیدهای چرب امگا -۳ اهمیت دارویی فراوان دارد و به عنوان ضدسرطان، آنتی اکسیدان و تصفیه کننده خون کاربرد دارد. تحقیق حاضر به منظور تعیین مناسب-ترین غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (اکسین و سایتوکینین) برای تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای با استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل، میانگره و برگ سه ژنوتیپ ایرانی (مشهد، یاسوج و پارس‌آباد) گیاه دارویی خرفه جهت استفاده در مطالعات بعدی انجام گرفت. بذور گیاه خرفه بعد از ضدعفونی جهت جوانه‌زنی در محیط کشت MS کشت شدند. ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل، میانگره و برگ در محیط کشت حاوی تنظیم کننده-های رشد گیاهی BAP، IBA و NAA جهت القای کالوس و باززایی کشت گردیدند. این آزمایشات بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. تمام داده‌های مربوط با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 16 تجزیه شدند و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که ترکیبی از هورمون اکسین و سایتوکینین باعث بهتر شدن ایجاد کالوس‌زایی در هر سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد در ریزنمونه‌های کوتیلدون، هیپوکوتیل، میانگره و برگ در گیاه خرفه می‌شود. بطور کلی بیشترین میانگین وزن کالوس در این آزمایش در ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ مشهد در ترکیب هورمونی ۳ mg/l BAP + ۱ mg/l IBA با مقدار ۱/۲۵ گرم کالوس بدست آمد. در ریزنمونه‌های برگ هرسه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد کشت شده در محیط کشت ms حاوی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی باززایی مشاهده نگردید. در ترکیب هورمونی BAP + IBA، در ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ پارس‌آباد و ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ مشهد و پارس‌آباد باززایی مشاهده گردید. در ترکیب هورمونی BAP + NAA نیز ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ مشهد و یاسوج باززایی کردند. بطور کلی بیشترین درصد باززایی در ریزنمونه میانگره ژنوتیپ یاسوج در ترکیب هورمونی BAP + IBA با ۵۵/۵۵ درصد باززایی مشاهده شد.

کلید واژه‌ها: گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.)، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، ریزنمونه، القای کالوس

فهرست مطالب

شماره و عنوان مطالب **صفحه**

فصل اول: کلیات پژوهش

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- پراکنش خرفه در جهان ۶

۱-۳- پراکنش خرفه در ایران ۶

۱ -۴- مشخصات گیاهشناسی خرفه ۷

۱ -۵ – ترکیبات شیمیایی گیاه خرفه ۶

۱-۶ – خواص دارویی خرفه ۷

۱ -۷ – کشت بافت ۸

۱ -۸ – تأثیر مواد گیاهی در کشت بافت ۹

۱ -۹ – تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۹

۱ -۱۰ – اهمیت و کاربرد کشت بافت ۱۰

۱ -۱۱ – کاربرد کشت بافت در گیاهان دارویی ۱۱

۱ -۱۱ -۱ – راهکارهای افزایش متابولیت‌های ثانویه ۱۱

۱ -۱۲ – مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه کشت بافت خرفه ۱۲

۱ -۱۳ – اهداف تحقیق ۱۵

فصل دوم: مواد و روش پژوهش

۲-۱- منبع گیاهی مورد استفاده ۱۷

۲-۲- محیط کشت ۱۷

۲ -۲ -۱ -تهیه محلول‌های پایه ۱۷

۲ -۲ -۱ -۱ –تهیه محلول‌های غذایی پایه عناصر پر مصرف ۱۷

۲ -۲ -۱ -۲ – تهیه محلول‌های غذایی پایه عناصرکم مصرف ۱۸

۲ -۲ -۱ -۳ – تهیه محلول‌های غذایی پایه آهن ۱۹
۲ -۲ -۱ -۴ – تهیه محلول‌های غذایی پایه ویتامین ۱۹
۲ -۲ -۱ -۵ – تهیه محلول‌های پایه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ۲۰
۲ -۳ – تهیه محیط کشت ۲۰
۲ -۳ -۱ – توزیع محیط کشت ۲۱
۲ -۴ – وسایل و تجهیزات مورد نیاز ۲۱
۲ -۵ – ضدعفونی وسایل مورد نیاز ۲۲
۲ -۶ – آماده سازی هود لامینار.....۲۲
۲ -۷ – ضدعفونی ریزنمونه‌ها ۲۳
۲ -۸ – کشت ریزنمونه‌ها ۲۴
۲ -۹ –تجزیه و تحلیل داده‌ها ۲۶

فصل سوم: نتایج و یافته‌های پژوهش

۳ -۱ - تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی IBA و BAP برصفات مورد ارزیابی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۲۸
۳ -۱- ۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۲۸
۳ -۱ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۲۹
۳ -۱ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۲۹
۳ -۱ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۳۰
۳ -۲ - تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی IBA و BAP برصفات مورد ارزیابی در ریزنمونه‌های کوتیلدون سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۳۳
۳ -۲ -۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۳۳
۳ -۲ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های کوتیلدون ۳۴
۳ -۲ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۳۴
۳ -۲ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۳۵

۳ -۳ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی IBA و BAP برصفات مورد ارزیابی در ریزنمونه‌های میانگره دو ژنوتیپ مشهد و یاسوج ۳۹
۳ -۳ -۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های میانگره ۳۹
۳ -۳ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های میانگره ۴۰
۳ -۳ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های میانگره ۴۱
۳ -۳ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های میانگره ۴۱
۳ -۴ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی IBA و BAP برصفات مورد ارزیابی در ریزنمونه‌های برگ سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۴۴
۳ -۴ -۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ ۴۴
۳ -۴ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های برگ ۴۴
۳ -۴ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های برگ ۴۵
۳ -۴ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های برگ ۴۶
۳ -۵ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BAP بردر صد کالوس‌زایی، در صد باززایی، درصد ریشه‌زایی و میانگین وزن کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۴۷
۳ -۵ -۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۴۸
۳ -۵ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۴۹
۳ -۵ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۴۹
۳ -۵ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۵۰
۳ -۶ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BAP بردر صد کالوس‌زایی، در صد باززایی، درصد ریشه‌زایی و میانگین وزن کالوس در ریزنمونه کوتیلدون سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۵۴
۳ -۶ -۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵۴
۳ -۶ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵۵
۳ -۶ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵۶
۳ -۶ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵۶
۳ -۷ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BAP بردر صد کالوس‌زایی، در صد باززایی، درصد ریشه‌زایی و میانگین وزن کالوس در ریزنمونه برگ دو ژنوتیپ مشهد و پارس‌آباد ۶۰

۳ –۷ –۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ ۶۰
۳ –۷ –۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های برگ ۶۰
۳ –۷ –۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های برگ ۶۱
۳ –۷ –۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های برگ ۶۱

فصل چهارم: نتیجه‌گیری و بحث

۴ –۱ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی IBA و BAP برصفات مورد ارزیابی در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۶۵
۴ –۱ –۱ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۶۵
۴ –۱ –۲ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۶۶
۴ –۱ –۳ – درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۶۶
۴ –۲ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی IBA و BAP برصفات مورد ارزیابی در ریزنمونه‌های کوتیلدون سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۶۸
۴ –۲ –۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۶۸
۴ –۲ –۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های کوتیلدون ۶۸
۴ –۲ –۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۶۸
۴ –۲ –۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۶۹
۴ –۳ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی IBA و BAP برصفات مورد ارزیابی در ریزنمونه‌های میانگره دو ژنوتیپ مشهد و یاسوج ۶۹
۴ –۳ –۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های میانگره ۷۰
۴ –۳ –۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های میانگره ۷۰
۴ –۳ –۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های میانگره ۷۱
۴ –۳ –۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های میانگره ۷۱
۴ –۴ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی IBA و BAP برصفات مورد ارزیابی در ریزنمونه‌های برگ سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۷۲
۴ –۴ –۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ ۷۲

۴ -۴ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های برگ ۷۳
۴ -۴ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های برگ ۷۴
۴ -۴ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های برگ ۷۴
۴ -۵ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BAP بردر صد کالوس‌زایی، در صد باززایی، درصد ریشه‌زایی و میانگین وزن کالوس در ریزنمونه هیپوکوتیل سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۷۵
۴ -۵ -۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۷۵
۴ -۵ -۲ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۷۶
۴ -۵ -۳ – درصد باززایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۷۶
۴ -۶ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BAP بردر صد کالوس‌زایی، در صد باززایی، درصد ریشه‌زایی و میانگین وزن کالوس در ریزنمونه کوتیلدون سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۷۷
۴ -۶ -۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۷۸
۴ -۶ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های کوتیلدون ۷۸
۴ -۶ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۷۸
۴ -۶ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۷۸
۴ -۷ – تأثیر غلظت‌های مختلف ترکیب هورمونی NAA و BAP بردر صد کالوس‌زایی، در صد باززایی، درصد ریشه‌زایی و میانگین وزن کالوس در ریزنمونه برگ دو ژنوتیپ مشهد و پارس‌آباد ۷۹
۴ -۷ -۱ – درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های برگ ۷۹
۴ -۷ -۲ – میانگین وزن کالوس ریزنمونه‌های برگ ۷۹
۴ -۷ -۳ – درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های برگ ۸۰
۴ -۷ -۴ – درصد باززایی ریزنمونه‌های برگ ۸۰
نتیجه‌گیری کلی ۸۱
پیشنهادات ۸۱
فهرست منابع و مآخذ ۸۲

فهرست جدول‌ها

شماره و عنوان جدول	صفحه

جدول ۲ – ۱: محلول پایه عناصر پرمصرف ۱۸
جدول ۲ – ۲: محلول پایه عناصر پرمصرف..... ۱۸
جدول ۲ – ۳: محلول پایه آهن ۱۹
جدول ۲ – ۴: محلول پایه ویتامین ۱۹
جدول ۲ – ۵: ترکیب محیط کشت مورد استفاده برای یک لیتر ۲۱
جدول ۲ – ۶: آزمایشات انجام شده در این پژوهش در یک دید کلی ۲۵
جدول ۲ – ۷: ترکیب تیمارهای هورمونی BAP + IBA ۲۶
جدول ۲ – ۸: ترکیب تیمارهای هورمونی BAP + NAA ۲۶
جدول ۳ – ۱: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی IBA و BAP بر صفات مورد ارزیابی ریزنمونه هیپوکوتیل ۳۱
جدول ۳ – ۲: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی IBA و BAP بر درصد باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل ۳۲
جدول ۳ – ۳: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب IBA و BAP بر صفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های هیپوکوتیل سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۳۳
جدول ۳ – ۴: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی IBA و BAP بر صفات مورد ارزیابی ریزنمونه کوتیلدون ۳۷
جدول ۳ – ۵: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی IBA و BAP بر درصد باززایی ریزنمونه کوتیلدون ۳۷
جدول ۳ – ۶: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب BAP بر میانگین وزن کالوس در ریزنمونه‌های کوتیلدون ژنوتیپ پارس‌آباد.... ۳۷
جدول ۳ – ۷: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب BAP و IBA برصفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های کوتیلدون سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۳۸
جدول ۳– ۸: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی IBA و BAP بر صفات مورد ارزیابی در ریزنمونه میانگره ۴۲
جدول ۳ – ۹: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب هورمونی BAP و IBA بر صفات مورد ارزیابی در ریزنمونه میانگره ۴۳
جدول ۳ – ۱۰: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی IBA و BAP بر صفات مورد ارزیابی در ریزنمونه برگ ۴۶
جدول ۳ – ۱۱: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب BA و NAA برصفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های برگ سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۴۷
جدول ۳ – ۱۲: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی NAA و BAP بر صفات مورد ارزیابی ریزنمونه هیپوکوتیل ۵۱
جدول ۳ – ۱۳: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب BAP و NAA برصفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های هیپوکوتیل سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۵۳
جدول ۳ – ۱۴: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب NAA بر درصد باززایی در ریز نمونه‌های هیپوکوتیل ژنوتیپ مشهد ۵۳

جدول ۳ – ۱۵: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی NAA و BAP بر صفات مورد ارزیابی ریزنمونه‌های کوتیلدون ۵۷
جدول ۳ – ۱۶: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب BA و NAA بر صفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های کوتیلدون سه ژنوتیپ مشهد، یاسوج و پارس‌آباد ۵۸
جدول ۳ – ۱۷: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب BAP بر درصد ریشه‌زایی در ریز نمونه‌های کوتیلدون ژنوتیپ پارس‌آباد.....۵۹
جدول ۳ – ۱۸: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب BAP بر درصد کالوس‌زایی در ریز نمونه‌های کوتیلدون ژنوتیپ پارس‌آباد ۵۹
جدول ۳ – ۱۹: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب NAA بر درصد کالوس‌زایی در ریز نمونه‌های کوتیلدون ژنوتیپ پارس-آباد.....۵۹
جدول ۳ – ۲۰: تجزیه واریانس تأثیر ترکیب هورمونی NAA و BAP بر صفات مورد ارزیابی ریزنمونه‌های برگ ۶۲
جدول ۳ – ۲۱: مقایسه میانگین تأثیر ترکیب BA و NAA برصفات مورد ارزیابی در ریز نمونه‌های برگ دو ژنوتیپ مشهد و پارس‌آباد ۶۳

فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان شکل **صفحه**

شکل ۲ – ۱: کشت ریزنمونه‌ها در داخل محیط کشت MS ۲۴
شکل ۲ – ۲: رشد گیاهچه‌های ژنوتیپ مشهد ۲۵
شکل ۲ – ۳: انتقال ریزنمونه‌های کشت شده به اتاقک رشد برای کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی ۲۵
شکل ۳ – ۱: تأثیر BAP + IBA بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ مشهد ۲۹
شکل ۳ – ۲: تأثیر BAP + IBA بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ یاسوج ۲۹
شکل ۳ – ۳: تأثیر BAP + IBA بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ پارس‌آباد ۲۹
شکل ۳ – ۴: تأثیر BAP + IBA بر روی باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ مشهد ۳۱
شکل ۳ – ۵: تأثیر BAP + IBA بر روی باززایی ریزنمونه کوتیلدون در ژنوتیپ پارس‌آباد ۳۶
شکل ۳ – ۶: تأثیر BAP + IBA بر میانگین وزن کالوس ریزنمونه میانگره در ژنوتیپ مشهد ۴۰
شکل ۳ – ۷: تأثیر BAP + IBA بر میانگین وزن کالوس ریزنمونه میانگره در ژنوتیپ یاسوج ۴۰
شکل ۳ – ۸: تأثیر BAP + IBA بر روی باززایی ریزنمونه میانگره در ژنوتیپ مشهد ۴۲
شکل ۳ – ۹: تأثیر BAP + IBA بر روی باززایی ریزنمونه میانگره در ژنوتیپ یاسوج ۴۲

شکل ۳ – ۱۰: تأثیر BAP + NAA بر روی کالوس‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ یاسوج ۴۸
شکل ۳ – ۱۱: تأثیر BAP + NAA بر روی ریشه‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ پارس‌آباد ۵۰
شکل ۳ – ۱۲: تأثیر BAP + NAA بر روی باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ پارس‌آباد ۵۱
شکل ۳ – ۱۳: تأثیر BAP + NAA بر روی باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ یاسوج ۵۱
شکل ۳ – ۱۴: تأثیر BAP + NAA بر روی باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ مشهد ۵۵
شکل ۳ – ۱۵: تأثیر BAP + NAA بر روی باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ یاسوج ۵۵
شکل ۳ – ۱۶: تأثیر BAP + NAA بر روی باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل در ژنوتیپ پارس‌آباد ۵۵

فهرست علائم اختصاری

علامت اختصاری	مفهوم یا توضیح
BAP	۶ -بنزی‌ل آمی‌نو پوری‌ن
IBA	اسی‌د ای‌ندول -۳ -بوتی‌ری‌ک
NAA	اسی‌د نفتالی‌ن استی‌ک

فصل اول:

کلیات پژوهش

۱ -۱ - مقدمه

گیاهان دارویی منبع مهم دارو برای جمعیت کثیری از جهان می‌باشد و تقاضای جهانی برای انواع گیاهان دارویی نه تنها بیشتراست بلکه در حال گسترش است. از آنجایی که استفاده از گیاهان دارویی در ایران تاریخچه غنی و پرافتخاری دارد، این دانش سنتی را باید مطابق استانداردهای روز دنیا به دانشی کاربردی تبدیل کرد که جوابگوی نیازمندی‌های روز دنیا با زبان علمی و قابل قبول برای مراجع پزشکی باشد. ارزش گیاهان دارویی در طب سنتی ایران از یک سو، یکنواخت نبودن جنس و گونه و مقدار مواد موثره آنها از سوی دیگر مطالعات گسترده و عمیق علمی را در این زمینه طلب می‌کند.

در ارتباط با گیاهان دارویی سه مقوله بسیار مهم یعنی انتخاب، تکثیر و حفظ ژنوتیپ‌های مهم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند که زیست فناوری به عنوان یک ابزار در این جهت به کار گرفته می‌شود. در این راستا استفاده از کشت بافت و مهندسی ژنتیک به عنوان ابزارهای لازم و قوی برای دستکاری ژنتیکی گیاهان به منظور ارتقای صفات کمی و کیفی و کاهش زمان و هزینه‌ی تولید گیاهان دارویی، فراورده‌های گیاهی و ایجاد ژنوتیپ‌هایی با صفات مطلوب از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (زاجی و همکاران، ۱۳۸۸).

گیاهان دارویی به دلیل نداشتن مواد افزودنی شیمیایی مصنوعی با بدن سازگاری بهتری دارند و معمولاً فاقد عوارض ناخواسته داروهای شیمیایی هستند، به خصوص در موارد مصرف طولانی و در بیماری‌های مزمن بسیار مناسب‌ترند. گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامتی جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیش‌گیری از بیماری‌ها برخوردار بوده و هستند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشرداشته و یکی ازمهمترین منابع تأمین غذایی و دارویی بشر درطول نسل‌ها بوده است. نابودی گونه‌های متنوع گیاهی، مشکلات مرتبط با اهلی نمودن وکشت زراعی این گیاهان، توجه محققین و پژوهش‌گران را به استفاده از راه‌کارهای بیوتکنولوژی جهت افزایش تولید و بهره‌وری گیاهان دارویی معطوف نموده است. بیوتکنولوژی قادر است کارآیی گیاهان را به عنوان منابع جهت تولید دارو افزایش دهد (نصیری‌راد، ۱۳۸۹). سلول‌ها و یا بافت‌های گیاهی توان تولید ترکیبات ثانویه مهم گیاهی را حتی تحت شرایط آزمایشگاهی در خود نگه می‌دارند و این مسئله باعث شده که برای ساخت مواد مورد نیاز بشر در مقیاس صنعتی، نه تنها

کاشت و تکثیر سلول‌ها و بافت‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی از مباحث نویدبخش امروز زیست فناوری گیاهی باشد، بلکه استحصال آنزیم‌های گیاهی و بکارگیری آنها در انجام واکنش‌های مورد نیاز در صنایع مختلف مورد توجه خاصی قرار گیرد (احمدی مقدم و همکاران[1]، ۲۰۱۳). اگر چه از طریق کشت سلول‌های گیاهی می‌توان طیف وسیعی از متابولیت-های ثانویه را تولید کرد اما در برخی موارد تولید آنها اقتصادی بوده است. تولید ترکیباتی با حجم کم و قیمت بالا از قبیل ترکیبات ضد سرطان و ضد ایدز ازجمله مواردی است که می‌توان با این تکنیک به طور اقتصادی تولید نمود. در حال حاضر استفاده از این تکنولوژی در تولید تعداد اندکی از مواد دارویی ارزش اقتصادی بالایی را به همراه داشته است (خانیانی و همکاران، ۱۳۸۴). زیست فناوری چندین مزایای ممکن را در مورد کشاورزی، برای تولید محصولات غذایی اصلاح شده و هم برای استفاده از گیاهان در تولید محصولات مهم تجاری-دارویی ارائه می‌دهد. سلول گیاهی و کشت بافت برای زیست‌شناسان از اهمیت خاصی برخوردار است (نصیری‌راد، ۱۳۸۹). کاربردهای مختلف کشت‌بافت در زمینه‌ی گیاهان دارویی از جنبه‌های باززایی در شرایط آزمایشگاهی، باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیک (غیرجنسی) و حفاظت گونه‌های گیاهان دارویی از طریق نگهداری در سرما و غیره قابل بررسی است (امید بیگی، ۱۳۹۰). در شرایط مزرعه، گیاهان در شرایط آب و هوایی متغیری هستند که انجام تحقیقات و پژوهش‌ها را دشوار می‌سازد. تکنیک کشت بافت بر این محدودیت‌ها غلبه کرده و اجازه به رشد گیاه تحت شرایط تغذیه‌ای و آب و هوایی کنترل شده می‌دهد تا امکان انجام آزمایش‌ها در شرایط یکسان در تمام طول سال امکان پذیر باشد (ژانگ و همکاران[2]، ۱۹۹۸).

کشت بافت گیاهی به رشد و تکثیر سلول‌ها و بافت‌ها و اندام‌های گیاهی روی محیط ضدعفونی شده و تحت شرایط کنترل شده اطلاق می‌شود همچنین کشت سلول‌ها و بافت‌ها، تولیدگیاهان شبیه به اصل در تعداد زیاد را منجر می شود که یک تکثیر تجاری را فراهم می‌کند (یاسین خان و همکاران[3]، ۲۰۰۹). کشت سلول و بافت گیاهی که با عنوان‌های کشت درون‌شیشه‌ای و یا کشت استریل نیز مطرح می‌شود ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی و دارای کاربردهای تجاری است. هرچند که هزینه و سرمایه زیاد و نیاز به نیروی کار ماهر و متخصص از جمله معایب روش‌های بیوتکنولوژی به شمار می‌آیند، اما کشت بافت توانسته راهی عملی در جهت تولید محصولات متابولیتی منحصر به‌فرد ایجاد نماید. پیچیده بودن ساختار بسیاری از متابولیت‌های ثانویه باعث شده که نتوان آنها را به صورت مصنوعی سنتز نمود

1- Ahmadi Moghadam & et al
2 -Zhang & et al
3 –Yaseen Khan & et al

و لذا تنها منبع تولید آنها سلول گیاه می‌باشد. اگر این سلول‌ها را نیز بتوان نظیر میکروارگانیسم‌ها کشت نمود می‌توان تولید آنها را به مقدار قابل توجهی افزایش داد (مونتولیو و همکاران[1]، ۲۰۰۹). پیشرفت در کشت‌بافت همراه با به‌سازی تکنیک مهندسی ژنتیک مخصوصاً تکنولوژی تراریخت‌سازی راه را برای تولید داروها و دیگر مواد سودمند باز می‌کند. ابزارهای زیست فناوری برای تکثیر و تغییر ژنتیکی گیاهان دارویی توسط تکنیک‌هایی مثل باززایی در شرایط درون‌شیشه‌ای و انتقال ژن اهمیت دارند، همچنین برای تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از گیاهان می‌تواند مؤثر باشد. پیشرفت در تکنولوژی کشت بافت نشان داده است که فاکتورهای نسخه‌برداری ابزارهای مولکولی جدید مؤثری برای تولید متابولیت‌های گیاهی برای افزایش تولید ترکیبات مؤثر هستند (یاسین خان و همکاران، ۲۰۰۹).

از مزایای کشت بافت تولید انبوه و سریع یک رقم مطلوب و یا رقم‌های جدید است. در گیاهان بذرهای تولید شده کاملاً همانند گیاه مادر خود نیستند. همچنین این بذور با یکدیگر نیز تفاوت دارند. چنانچه یک گیاه مطلوب در منطقه‌ای توسط کشاورزان برگزیده شود و از آن بذر تهیه نمایند، تضمینی وجود ندارد که بذور سبز شده ویژگی‌های موردنظر را داشته باشند. همچنین از راه‌های معمول مانند قلمه‌زدن نیز نمی‌توان بسیاری از گیاهان راتکثیر کرد اما با استفاده از روش-های کشت‌بافت می توان در زمان کوتاه تعداد زیادی از یک گیاه مطلوب را تهیه نمود. کشت‌بافت موجب کاهش احتمال انتقال بیماری‌های ویروسی به گیاه می‌گردد اگر گیاه از راه‌های معمول مانند قلمه‌زنی تکثیر شود احتمال انتقال ویروس و سایر آلودگی‌ها به گیاهان جدید وجود دارد و به مرور زمان سبب کاهش محصول می‌شود اما با استفاده ازکشت بافت می‌توان با روش‌هایی آلودگی‌ها بویژه ویروس را حذف نمود و از آن پس تمام گیاهان تولید شده عاری از آلودگی هستند (احسان پور و امینی، ۱۳۸۰).

ریزازدیادی بطور وسیعی برای تکثیر سریع تعدادی از گونه‌های گیاهی استفاده می‌شود. باوجود این استفاده‌ی وسیع، اغلب درصد بالایی از گیاهان وقتی به شرایط *برون شیشه‌ای* منتقل می‌شوند به علت شرایط غیرعادی این محیط، مانند سطح بالای نور، رطوبت پایین و غیره خسارت دیده و از بین می‌روند بنابراین ایجاد شرایط مطلوب در ازدیاد درون‌شیشه-ای برای سازگاری و پایداری گیاه در خاک برای بعد از انتقال به خاک، اهمیت دارد (دب و ایمچن[2]، ۲۰۱۰). در این راستا

1 –Montoliu & et al
2- Deb & Ichmen

استفاده از تکنیک کشت بافت می‌تواند مکمل روش‌های به‌نژادی معمول در جهت افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی باشد (بانسال و همکاران[1]، ۱۹۹۱).

دلیل توجه به جنبه‌های مختلف کشت بافت گیاهان دارویی، بهینه نمودن این روش ها به عنوان ابزار زیست فناوری مهم جهت مطالعات بعدی و همچنین کاربرد آنها در اصلاح گیاهان دارویی می‌باشد، به گونه‌ای که ایجاد یک سیستم باززایی موثر و کارا شرط اولیه انتقال ژن به گیاهان است. در همین راستا مهندسی ژنتیک و انتقال ژن از یک منبع خارجی به گونه مورد نظر و استفاده از روش‌های نوین کشت بافت می‌توانند موانع موجود در اصلاح سنتی نظیر عدم تلاقی و فقدان ژنی مطلوب در خزانه ژرم‌پلاسم گونه گیاهی را برداشته و تنوع ژنتیکی مطلوبی در جمعیت گیاهی ایجاد نماید (حسنی جیفرودی، ۱۳۹۳).

توسعه‌ی پروتوکل کشت بافت و بهینه سازی شرایط درون‌شیشه‌ای می تواند برای مطالعه‌ی بیشتر گیاه خرفه مفید باشد. تشکیل کالوس یک مرحله اولیه در فرایند کشت بافت است که بعنوان سوسپانسیون سلولی پایدار (کومار و کنوار[2]، ۲۰۰۷؛ رودریگز- گری و روبلو[3]، ۱۹۹۲؛ گورل و همکاران[4]، ۲۰۰۲؛ انگرا و همکاران[5]، ۲۰۰۸)، جنین‌زایی سوماتیکی (بارانا و واخلو[6]، ۱۹۹۳؛ کولکرنی و همکاران[7]، ۲۰۰۲؛ رحمان و همکاران[8]، ۲۰۰۶) و بسیاری از کاربردهای دیگر می باشد. باشد. علاوه براین، پروتوکل باززایی ریزنمونه‌ها پیش‌نیاز لازم برای باززایی سلول‌های تغییر شکل یافته‌ی ژنتیکی و بافت گیاهی هر سیستم گیاهی است. همچنین ریزازدیادی می‌تواند یک تکنیک مؤثر برای ازدیاد انبوه از ژرم‌پلاسم برگزیده در یک دوره‌ی کوتاهی از زمان باشد (ماهیپال وهمکاران[9]، ۲۰۱۵).

هدف از این پژوهش، بهینه سازی دستورالعمل کالوس‌زایی و باززایی مناسب برای برخی توده‌های بومی گیاه دارویی خرفه می‌باشد. به عنوان مثال، کالوس ایجاد شده از ریشه‌های موئین تراریخت گیاه خرفه را به عنوان یکی از منابع مهم تولید متابولیت‌های ثانویه می‌توان به کار برد. در نتیجه یافته‌های این مطالعه به تولید انواع متابولیت‌های ثانویه با ارزشی همانند نورآدرنالین و امگا- ۳ کمک خواهد کرد (پیریان و پیری، ۱۳۹۱). به عبارت دیگر، این کار نقطه شروعی

1–Bansal & et al
2- Kumalr & Kanwar
3- Rodriguez & Rubluo
4- Gurel & et al
5- Ngara & et al
6- Barna & Wakhlu
7- Kulkarni & et al
8- Rahman & et al
9 –Mahipal & et al

برای جداسازی متابولیت‌های ثانویه در کشت کالوس نیز است. تولید متابولیت‌های ثانویه با خصوصیت دارویی در شرایط آزمایشگاهی فواید زیادی در مقایسه با استخراج این گیاهان تحت شرایط طبیعی دارد و کنترل دقیق پارامترهای مختلف سبب می‌شود که کیفیت مواد حاصل در طول زمان تغییر نکند، در حالی که در شرایط طبیعی بطور مداوم تحت تاثیر شرایط آب و هوایی و آفات است. در نتیجه تلاش به منظور تحت کنترل در آوردن عوامل محیطی ضروری به نظر می-رسد. پیش نیاز اصلی و اولین گام برای موارد فوق بهینه‌سازی یک سیستم کشت‌بافت مناسب است. از این رو پژوهش حاضر با توجه به ضرورت اشاره شده در جهت بررسی تنظیم کننده‌های رشد روی کالوس‌زایی و باززایی گیاه خرفه انجام گرفت. فاکتورهای متعددی مانند ژنوتیپ، نوع ریزنمونه، ترکیبات مختلف هورمونی و تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر اسیدهای آمینه و پلی‌آمین‌ها در موفقیت کشت‌بافت یک گیاه مؤثرند که در این بین، ریزنمونه از موارد مؤثر در میزان باززایی گیاهان دارویی است (تریپاتی و تریپاتی،[1] ۲۰۰۳).

۱ -۲ - پراکنش خرفه در جهان

خاستگاه خرفه به طور طبیعی در هند و خاورمیانه گزارش شده است و در ناحیه‌ی گرم و مرطوب اقلیم‌های شمالی، مخصوصاً اقلیم‌های معتدل و گرمسیری از جهان می‌روید (ماهیپال وهمکاران، ۲۰۱۵).

۱ -۳ - پراکنش خرفه در ایران

این گیاه هم به‌صورت هرز و هم به‌صورت بومی در ایران یافت می‌شود و بیشتر در اقلیم‌های گرم و اکثراً مرطوب از شمال ایران می‌روید (صفدری و کاظمی‌تبار[2]، ۲۰۰۹). گونه‌های مختلفی از جنس *Portulaca* در ایران گزارش شده است که مهمترین آن گونه *P. oleracea* L. است.

1- Tripathi & Tripathi
2- Safdari & Kazemitabar

۱ -۴ - مشخصات گیاهشناسی خرفه

گیاه خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. و یک‌ساله از خانواده Portulacaceae می‌باشد. این گیاه علفی دارای ساقه‌های قرمز گوشتی، برگ‌های ضخیم متقابل، گل‌های زرد یا سفید و بذرهای ریزسیاه رنگ می‌باشد که خواص دارویی دارد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲). گیاه خرفه عموماً به نام‌های pigweed ، hogweed و همچنین purslane نیز نامیده می‌شود (ماهیپال و همکاران، ۲۰۱۵؛ امیرالعلم و همکاران[1]، ۲۰۱۴).

۱ -۵ - ترکیبات شیمیایی گیاه خرفه

بخش‌های مختلف این گیاه از آب، مواد لعابی، پکتین، پروتئین، کربوهیدرات، اسیدهای چرب غیر اشباع CO_3، مواد آنتی اکسیدان و عناصر معدنی متعدد شامل آهن، مس، منگنز، پتایسیم، کلسیم، فسفر و سلنیوم تشکیل شده است. خرفه دارای متابولیت‌های ثانویه با ارزشی همانند نورآدرنالین، دوپامین و اسیدهای چرب امگا -۳ می‌باشد (پیریان و پیری، ۱۳۹۱؛ زارعی و همکاران، ۱۳۹۳؛ مرادی و همکاران[2]، ۲۰۱۲؛ امیرالعلم و همکاران، ۲۰۱۴؛ قربانی و همکاران[3]، ۲۰۱۵). این ترکیبات در کرک‌های ریشه‌ی خرفه موجود می‌باشد (قربانی و همکاران، ۲۰۱۵). گیاه خرفه به علت داشتن گنجینه بزرگی از مواد مفید از جمله عناصر معدنی، انتقال دهنده‌های عصبی و نیز دارای توانایی آنتی اکسیدانی زیاد می‌تواند به هنگام مصرف، نقش قابل توجهی در تغییرات ایجاد شده در هومئوستازی بدن ایجاد کند. آزمایش‌های فیتوشیمیایی عصاره خرفه نشان داده است این گیاه حاوی ویتامین آ و ب ۱، نورآدرنالین، دوپامین، اسیدهای ارگانیک مثل آلفا لینولئیک اسید، سینامیک، کافئیک، مالیک، اگزالیک، سیتریک و نیز کومارین‌ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای قلبی آنتراکینونی و آلکالوئید کوئرستین می‌باشد (زارعی و همکاران، ۱۳۹۳).

۱ -۶ - خواص دارویی خرفه

خرفه دارای اثربخشی دارویی در سردرد، درد معده، ناراحتی‌های دفع ادرار، اسهال، ورم پستان، و در افزایش شیر مادر مؤثر بوده و به عنوان سالاد و سبزیجات در سراسر جهان استفاده می‌شود. ظاهراً برای درمان سوختگی‌ها، درد گوش،

1- Amirul Alam & et al
2- Moradi & et al
3- Ghorbani & et al

گزیدگی حشرات، التهابات، جراحات پوستی، زخم معده، خارش‌های پوستی، اگزما و آبسه نیز مفید است. خرفه دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، تب‌بر، ملین، شل‌کننده‌ی عضلات و مدر، ماده‌ی نیروزا و یک آنتی‌آسکوربیک می-باشد. تغذیه‌ی برگ‌های آن برای آبسه و به عنوان داروی ضد دیابت مطرح است. از شاخ و برگ آن در درمان ناراحتی قلبی و ازعصاره‌ی آن بصورت لوسیون برای تسکین سردرد روی پیشانی به کارمی‌رود (ماهیپال و همکاران، ۲۰۱۵). گیاه خرفه به علت داشتن متابولیت‌های ثانویه با ارزشی همانند نورآدرنالین، دوپامین و امگا -۳ اهمیت دارویی فراوانی دارد و به عنوان ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و تصفیه کننده خون نیز کاربرد دارد (پیریان وپیری، ۱۳۹۱) که این ترکیبات در کرک‌های ریشه‌ی خرفه موجود می باشد. این ترکیبات به عنوان تعدیل کننده‌ی سیستم ایمنی در درمان شوک هستند (قربانی وهمکاران، ۲۰۱۵). خرفه همچنین بر فعالیت تولیدمثلی هم تاثیر دارد بطوری که عصاره ی اتانولی گیاه سبب کاهش ۵۰-۴۰ درصدی لانه گزینی می‌شود که در نتیجه سقط جنین را در پی دارد. همچنین خرفه خواص آنتی اکسیدانی دارد و پراکسیداسیون لیپیدی در حضور غلظت‌های مختلف گیاه خرفه به‌خوبی مهار می‌شود. عصاره‌ی گیاه خرفه موجب کاهش چربی خون شده و در بهبود عملکرد کبد نیز می‌تواند مؤثر باشد. خاصیت ضد دردی و ضد التهابی فلاونوئیدها به‌وجود همین ماده در عصاره آن و نیز بخشی مربوط به اثرات شل‌کنندگی (غلظت بالای یون پتاسیم) و خاصیت ضد تشنجی (مربوط به کافئیک) بیان شده است. گیاه خرفه خاصیت ضد اضطرابی نیز دارد. همچنین در بررسی اثر عصاره خرفه بر علائم روانی اسکیزوفرنی دریافتند مصرف همزمان خرفه و ریسپریدون می‌تواند به علت وجود برخی ترکیبات آن به‌ویژه امگا -۳ و لینولئیک اسید موجب بهبود علائم روانشناختی بیماران اسکیزوفرنیک مزمن گردد (زارعی و همکاران، ۱۳۹۳).

۱ -۷ - کشت بافت

کشت درون شیشه ای گیاهان از سال ۱۹۷۵ پیشرفت قابل توجهی نموده است. روش‌های آزمایشگاهی برای کشت گیاه، بذر، جنین، مریستم، بافت، سلول و پروتوپلاست در محیط کشت استریل ابداع شده است که با بهره گیری از این روش‌ها می‌توان باززایی و تولید را در بسیاری از گونه‌های گیاهی انجام داد. به تمام روش‌های مختلف کشت کالوس، کشت اندام و امثال آن کشت بافت گیاهی اطلاق شده است (باقری و صفاری، ۱۳۸۶).

رشد و نمو گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای به دو عوامل زیر بستگی دارد:

۱ – عوامل ژنتیکی: مشخصات ژنتیکی گیاه مورد نظر را شامل می‌شود.

۲ –عوامل محیطی: از مهمترین عوامل می‌توان موارد زیر را نام برد.

الف: ترکیبات محیط کشت که شامل آب، عناصر پر مصرف و عناصر کم مصرف، قندها و مواد آلی از قبیل تنظیم کننده-های رشد، ویتامین‌ها و غیره.

ب: عوامل فیزیکی که شامل نور، دما و PH

۱ –۸ –تأثیر مواد گیاهی در کشت بافت

ژنوتیپ گیاهی مهمترین نقش را در کشت بافت دارد. به گونه ای که گیاهان تک لپه‌ای نسبت به گیاهان دولپه‌ای در محیط کشت دشوارتر رشد و نمو می‌کنند. در بین گیاهان یک گونه نیز تفاوت‌های زیادی در کشت بافت آن مشاهده می-گردد. عوامل دیگری که بر کشت بافت موثرند سن گیاه، سن بافت، نوع ریزنمونه، و غیره می‌باشد.

۱ –۹ – تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (هورمون‌ها) ترکیبات آلی هستند که بصورت طبیعی در گیاهان ساخته می‌شوند و بر رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارند. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی معمولاً در نقاط مختلف گیاه فعال هستند. علاوه بر این، ترکیبات مصنوعی نیز ساخته شده‌اند که با انواع طبیعی مطابقت دارند. مجموع هورمون‌های گیاهی و ترکیبات مصنوعی سنتز شده، تنظیم کننده های رشد نامیده می‌شود.

علاوه بر مواد غذایی، افزودن یک یا چند تنظیم کننده رشد گیاهی از قبیل اکسین‌ها، سایتوکینین‌ها و جیبرلین‌ها به محیط‌های کشت بافت گیاهی برای رشد بهتر بافت‌ها و اندام‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در هر حال مقدار نیاز به ماده‌ی رشد گیاهی به نوع بافت، مقدار تنظیم کننده‌های رشد درون‌زا و هدف از کشت بافت بستگی دارد. تنظیم کننده‌های رشد در محیط‌های کشت بافت در مقادیر بسیار جزئی مصرف می‌شوند. ترکیبات مصنوعی فراوانی وجود دارد که خاصیت تنظیم کنندگی رشد و نمو گیاهان را در شرایط درون شیشه‌ای دارا هستند. در کشت درون شیشه‌ای اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها کاربرد فراوانی دارند (باقری و صفاری، ۱۳۸۶).

در کشت‌های درون شیشه‌ای، اکسین‌ها معمولاً به منظور تحریک تقسیم سلولی و تمایز ریشه‌ها بکارمی‌روند. در کشت بافت گیاهی اغلب از اکسین‌های ایندول استیک اسید (IAA)، ایندول بوتیریک اسید (IBA)، نفتالین استیک اسید (NAA)، ۲، ۴- دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2, 4 – D)، ۲ و ۴ و ۵ تری کلرو فنوکسی استیک اسید (2, 4, 5 – T) استفاده می‌شود. اکسین های IBA و IAA اغلب به منظور ریشه‌زایی، و یا به همراه سایتوکینین برای پرآوری شاخه‌ها استفاده می‌شوند. 2, 4, 5 – T و 2, 4 – D برای آغازش و رشد کالوس در شرایط درون شیشه‌ای بسیار مؤثر هستند. 2, 4 – D همچنین در ایجاد جنین‌زایی سوماتیکی از عوامل مهم به شمار می‌رود. سایتوکینین‌ها عمدتاً در تقسیمات سلولی و تمایزیابی شاخه‌های نابجا از کالوس و بافت‌های گیاهی، شرکت می‌کنند. این ترکیبات همچنین با حذف غالبیت انتهایی باعث پرآوری شاخه‌ها می‌شوند. سایتوکینین‌هایی نظیر زآتین، بنزیل آدنین (BA)، کینیتین (KIN)، تیدیازورون (TDZ) و بنزیل آمینو پورین (BAP) در محیط‌های کشت بافت کاربرد وسیعی دارند و در میان آن‌ها، تیدیازورون در غلظت‌های کمتر مصرف می‌شود. استفاده از این ترکیبات در محیط‌های کشت بافت گیاهی به تنهایی یا همراه با سایر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، بویژه اکسین‌ها متداول می‌باشد (هادیزاده، ۱۳۹۲).

۱ -۱۰ - اهمیت و کاربرد کشت بافت

۱ - تولید گیاهان عاری از ویروس.

۲ - تکثیر و ریز ازدیادی گیاهان.

۳ - تولید گیاهان هاپلوئید و سپس دیپلوئید کاملاً هموزیگوس از طریق کشت میکروسپور یا بساک.

۴ - دست‌ورزی ژنتیکی و دورگ‌گیری سوماتیکی با استفاده از امتزاج پروتوپلاستی و همچنین ایجاد تلاقی بین گونه‌ای در شرایط درون‌شیشه‌ای.

۵ - کشت سوسپانسیون سلولی و تولید متابولیت‌های اولیه مثل قند و کربن و نیز متابولیت‌های ثانویه.

۶ - ایجاد گیاهانی با خصوصیات جدید با استفاده از تنوع سوماکلونال.

۷ - نجات جنین با استفاده از کشت جنین‌های نارس در تلاقی بین گونه‌ای.

۸ - نگهداری ژرم‌پلاسم گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای.

۹ – استفاده در مطالعات بافت‌شناسی، سلول‌شناسی، و فیزیولوژی گیاهی.

۱ –۱۱ – کاربرد کشت‌بافت در گیاهان دارویی

۱ – باززایی در شرایط آزمایشگاهی

۲ – باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیک (غیرجنسی)

۳ – حفاظت گونه‌های گیاهان دارویی از طریق نگهداری در شرایط انجماد

۴ – تولید متابولیت‌های ثانویه از گیاهان دارویی

۵ – دست‌ورزی ژنتیکی

۶– ریزازدیادی

۱ –۱۱ –۱ – راهکارهای افزایش متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت بافت

۱ – استفاده از محرک‌های زنده و غیرزنده‌ای که می‌توانند مسیرهای متابولیکی سنتز متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار داده و میزان تولید آنها را افزایش دهند.

۲ – افزودن ترکیب اولیه‌ی مناسب به محیط کشت، با این دیدگاه که تولید محصول نهایی در نتیجه وجود این ترکیبات در محیط کشت، القا شود.

۳ – افزایش تولید یک متابولیت ثانویه در اثر ایجاد ژنوتیپ‌های جدیدی که از طریق امتزاج پروتوپلاست یا مهندسی ژنتیک، به دست می‌آیند.

۴ – استفاده از مواد جهش‌زا جهت ایجاد واریته‌های پربازده.

۵ – کشت بافت ریشه‌ی گیاهان دارویی (ریشه، نسبت به بافت‌های گیاهی دیگر، پتانسیل بیشتری جهت تولید متابولیت‌های ثانویه دارد).

۱ -۱۲ – مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه کشت بافت خرفه

برای تحریک تشکیل کالوس روی یک ریزنمونه اضافه کردن مواد تنظیم رشد به محیط کشت توصیه می‌شود. خصوصیات ماده تنظیم کننده رشد (نوع، غلظت و نسبت آنها) تا حد زیادی بستگی به ژنوتیپ و مقدار هورمون‌های موجود در ریزنمونه دارد (رازدان[1]، ۲۰۰۳).

در یک آزمایشی که توسط ماهیپال و همکاران (۲۰۱۵) بر روی گیاه خرفه انجام گرفته است مشاهده شده است که قطعات ساقه‌ی تازه‌ای که درگلخانه رشد کرده بود در مقایسه با گیاه رشد کرده در شرایط معمولی به تنظیم‌کننده‌های رشدگیاه سریع پاسخ نشان دادند. در واقع در حدود یک هفته بعد از کشت، ۹۳ درصد ریزنمونه‌ها به شکل ساقه‌هایی درتیمار حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP رشد کردند. باززایی شاخه از قطعات گره در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین که با درصد پایینی از پاسخ (۸۹ درصد) همراه بوده است. تأثیر ترکیب BAP و Kin روی درصد باززایی ساقه در مقایسه با استفاده‌ی هرکدام به تنهایی پایین بوده است. همچنین آنها گزارش کردند که در غلظت‌های برابر BAP و Kin، BAP بهتراز Kin برای باززایی ساقه از کشت قطعات گره گیاه خرفه می‌باشد. تشکیل کالوس از ته ریزنمونه هم وقتی که IAA یا IBA درترکیب با BAP یا Kin درمحیط کشت بوده است مشاهده گردیده است. ترکیباتی از اکسین‌ها در محیط کشت مایع باعث تشکیل کالوس از ته ساقه‌ها و تعدادی ازریشه‌ها شده است. همچنین با افزایش غلظت BAP و Kin درمحیط تعداد ساقه کاهش یافته است و وقتی که از هریک ازهورمون‌های BAP و Kin مقدار ۲ میلی‌گرم درلیتر به محیط اضافه شده است ساقه‌ها از رشد باز مانده اند اما ضخیم و سالم بوده اند. همچنین بیشترین تعداد ساقه درمحیط حاوی ۱میلی‌گرم در لیتر از هریک از BAP و Kin به‌دست آمد. محیط MS حاوی با ۲/۵ میلی‌گرم درلیتر IBA ترکیب مناسبی برای آغازش ریشه و طویل شدن آن در خرفه بوده است. نتایج نشان داده است که IBA بهتر از IAA در القاء ریشه بود (ماهیپال وهمکاران، ۲۰۱۵).

در تحقیقی دیگر که توسط صفدری و کاظمی‌تبار (۲۰۰۹) روی دوگونه خرفه یکی از نوع خرفه‌ی هرز و دیگری بومی انجام گرفته است به این صورت بوده است که در نوع هرز حدود یک هفته بعد از کشت عموماً در بیشتر تیمارها تشکیل ریشه پاسخ عمده‌ی ریزنمونه‌های برگی بوده است. آغازش کالوس از ریزنمونه‌های برگی در این نوع خرفه در

1 -Razdan

تیمارهای حاوی ۱۰ میکرومولار IBA در ترکیب با ۵ یا ۱۰ میکرومولار BAP و همچنین شامل ۵ میکرومولار IBA در ترکیب با ۵ میکرومولار BAP مشاهده شده است. تشکیل کالوس در تیمارهای حاوی BAP یا IBA به تنهایی یا بدون تیمار هورمونی (شاهد) در این تحقیق مشاهده نشده است. در حدود سه هفته بعد از کشت ریزنمونه‌های دمبرگ در نوع هرز گیاه خرفه، گیاه خرفه ساقه‌های باریک روشن ظاهر شده است. تشکیل ساقه از قاعده‌ی دمبرگ‌ها در تیمار حاوی ۱۰ میکرومولار IBA، درحد پایینی بوده است (۲۰٪). بعداز ده روز ساقه‌های باززا شده به محیط تحریک ریشه منتقل شده‌اند و ریشه‌های تشکیل شده در تیمارحاوی ۲/۵ میکرومولار IBA ترد و طویل و متراکم بوده‌اند. ولی ریشه‌های تشکیل شده در ۲/۵ میکرومولار NAA سفت‌تر و به‌نسبت کوتاه‌تر از تیمار قبلی بوده است. همچنین تشکیل ریشه در ۵ میکرومولار از هر کدام از این هورمون‌ها مناسب نبوده است و در تیمارهای حاوی فقط BAP ریشه‌ای تشکیل نشده است. تشکیل ساقه به دنبال تشکیل ریشه فقط درتیمار حاوی ۱۰ میکرومولار BAP است (۵۰٪). در این تحقیق بیشترین کالوس‌زایی سرشاخه‌ها، در تیمارهای ۱۰ میکرومولار BAP در ترکیب با ۱۰ میکرومولار IBA و ۵ میکرومولار BAP در ترکیب با ۱۰ میکرومولار IBA و ۵ میکرومولار BAP درترکیب با ۵ میکرومولار IBA بدست آمده است. اما کشت سرشاخه‌ها در ۱۰ میکرومولار BAP در ترکیب با ۵ میکرومولار IBA کمترین کالوس‌زایی با ریشه‌های کم را داشته است. نتایج بررسی صفدری و کاظمی‌تبار (۲۰۰۹) نشان داده است که در گیاه خرفه‌ی بومی در مقایسه با نوع هرز گیاه خرفه، ریزنمونه‌های برگ خرفه‌ی بومی هیچ پاسخی به غلظت‌های مختلف ازترکیبات IBA و BAP نشان نداده‌اند. این برگ‌ها سه هفته بعد از کشت، قهوه‌ای و از بین رفته‌اند. تعدادی از سرشاخه‌ها در غلظت‌های ۸/۸۸ میکرومولار یا ۱۳/۳۲ میکرومولار BAP یا در ۱۳/۳۲ میکرومولار Kin یک تا سه ساقه تولید کرده است. اما در تیمارهای دیگر پاسخی مشاهده نشده است. درصد باززایی شاخه‌ها دراین تیمارها به ترتیب ۱۵، ۲۰ و ۱۷درصد بوده است. نتیجه تجزیه واریانس داده‌ها در بررسی صفدری و کاظمی‌تبار (۲۰۰۹) نشان داده است که تشکیل ساقه از قطعات گره در این نوع خرفه توسط BAP معنی‌دار بوده است (درسطح احتمال ۱٪). علاوه براین درصد باززایی شاخه برای صفر، ۴/۴۴ و ۱۳/۳۲ میکرومولار BAP به ترتیب ۳۹، ۵۲ و ۶۷ درصد بوده است. همچنین نتیجه‌ی تجزیه واریانس داده‌ها برای کینتین نشان داده است که کینتین اثرمعنی‌داری روی باززایی شاخه‌ها از قطعات گره در خرفه بومی دارد (درسطح احنمال ۱٪) بطوری که حداکثر باززایی ساقه در تیمار کینتین در غلظت ۱۳/۳۲ میکرومولار بوده است که ۷۱ درصد بوده است. درصد باززایی ساقه در صفر، ۴/۴، ۸/۸ میکرومولار کینتین به ترتیب ۴۰٪، ۴۹٪ و ۵۷٪ بوده است. از میان تیمارهای مورد استفاده برای تحریک ساقه ازقطعات گره،

تیمارحاوی ۸/۸۸ میکرومولارBAP بهتربوده است (۷۸٪). درمقایسه با ۴/۴ میکرومولار BAP تشکیل کالوس در۴/۴ میکرومولار کینتین کاهش یافته است. حدوداً بعد از یک هفته از انتقال ساقه های باززا شده به محیط آغازش ریشه بسیاری از آنها شروع به آغازش کرده‌اند اما باززایی ریشه و توسعه آن در همه تیمارها برابر نبوده‌اند. حداکثر درصد باززایی ریشه در ۲/۵ میکرومولار IBA و سپس در ۲/۵ میکرومولار NAA (به ترتیب ۸۰ و ۹۰ درصد) بوده است. علاوه‌براین درصد باززایی ریشه برای ۵ میکرومولار IBA و ۵ میکرومولار NAA، به ترتیب ۶۸ درصد و ۴۸ درصد بوده است. عموماً ریشه-های تشکیل شده در محیط حاوی IBA باریک‌تر ، متراکم‌تر و طویل‌تر از آنهایی بوده‌اند که در محیط حاوی NAA تشکیل شده بودند. در غلظت‌های محیط کشت، BAP بهتر از کینتین در باززایی ساقه از قطعات گره درگیاه خرفه‌ی بومی بوده - است اما در غلظت‌های بالاتر از ۱۳/۳۲ میکرومولار شبیه به‌هم بوده‌اند. با وجود این حداکثر درصد باززایی ساقه، در خرفه متعلق به BAP با غلظت ۸/۸۸ میکرومولار و حداقل در صد باززایی در ۴/۴ میکرومولار از این هورمون بود. دراین آزمایش فقط از سایتوکینین برای باززایی ساقه از قطعات گره استفاده کردند. آنها دریافتند که کاربرد اکسین در این گیاه تحریک ریشه را ترغیب می‌کند (IBA بهتراز NAA درتحریک ریشه بوده است) و درخرفه بومی مخصوصاً درغلظت‌های پایین (۱ میلی‌گرم درلیتر تا ۵ میکرومولار و پایین‌تر) مناسب‌ترین اکسین برای تحریک ریشه مثل بسیاری از گیاهان دیگر می‌باشد (صفدری و کاظمی‌تبار، ۲۰۰۹).

در بررسی دیگر در گیاه خرفه رقم گرندی‌فلورا که توسط آشوک و بشیر (۲۰۱۰) انجام شده است گزارش شده است که در تیمار با سایتوکینین غلظت تا حد ۴ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تعداد باززایی مشاهده گردیده است ولی غلظت بالاتر از این مقدار باعث بازدارندگی منفی روی باززایی شده است. همچنین بیشترین طول ساقه با غلظت ۳ میلی‌گرم درلیتر کینتین مشاهده شده است. در این گیاه آغازش ریشه (۹۵٪) و توسعه آن ازساقه با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAAبا طول متوسط ۶ سانتی‌متر در محیط کشت 1/2MS بدست آمده است (آشوک و بشیر[1]، ۲۰۱۰).

1 –Ashok & Bashir

۱ -۱۳ -اهداف تحقیق

۱. بررسی وجود تنوع بین ژنوتیپ‌های خرفه از لحاظ پاسخ به تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی

۲. تعیین پاسخ ژنوتیپ‌های خرفه به غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

۳. تعیین پاسخ ریزنمونه‌های مختلف ژنوتیپ‌های مورد بررسی خرفه در استفاده از تیمارهای مختلف

۴. تعیین بهترین پاسخ به تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی خرفه در شرایط درون‌شیشه‌ای برای بهینه‌سازی محیط کشت باززایی و کالوس‌زایی

فصل دوم:

مواد و روش پژوهش

۲ -۱ -منبع گیاهی مورد استفاده

بذر گیاه خرفه از شهرهای مشهد، یاسوج و پارس‌آباد تهیه شد و به آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انتقال داده شد. سپس بذر این گیاه کشت شد و ریز نمونه‌های برگ، میانگره، کوتیلدون و هیپوکوتیل تهیه شد.

۲ -۲ -محیط کشت

در این تحقیق از محیط کشت MS (موراشیگ و اسکوگ[1]، ۱۹۶۲) استفاده شد. مراحل آماده سازی و تهیه محیط کشت به شرح زیر بود.

۲ -۲ -۱ -تهیه محلول‌های پایه

برای تهیه محیط کشت، ابتدا محلول‌های پایه ترکیبات محیط کشت درغلظت چند برابر در گروه‌های جداگانه تهیه و در طول آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. محلول‌های پایه شامل محلول‌های غذایی پایه عناصر پرمصرف (جدول ۲- ۱)، محلول‌های غذایی پایه عناصر کم‌مصرف (جدول ۲-۲)، محلول‌های غذایی پایه آهن (جدول ۲ -۳) و محلول‌های غذایی پایه ویتامین (جدول ۲- ۴) بود که پس از تهیه شدن در یخچال نگهداری شدند.

۲ -۲ -۱ -۱ -تهیه محلول‌های غذایی پایه عناصر پرمصرف

محلول پایه عناصر پرمصرف در غلظت ۱۰ برابر تهیه شد. برای این منظور ابتدا هر نمک جداگانه به میزان ۱۰ برابر غلظت آنها در محیط کشت اصلی، توزین شد در بشر حاوی مگنت قرار داده شد و با مقداری آب مقطر حل گردید. پس

1 –Murashige & Skoog

Family name: Nedaei Name: Soheila

Title of Thesis: Investigation of *Portulaca oleracea* L. genotypes response to plant growth regulators in *in vitro* condition

Supervisor(s): Mehdi mohebodini
Advisor(s): Esmaeil chamani

Graduate Degree: **M.Sc.**
Major: **Horticultural Sciences** Specialty: **Biotechnology and Molecular Genetic of Horticultural Crops**
University of **Mohaghegh Ardabili** Faculty of **Agriculture and Natural Resources**
Graduation date: **2016/02/17** Number of pages: **86**

Abstract:

The common purslane, *Purtulaca oleracea* L. is an herbaceous annual plant belongs to family Portulacaceae. purslane as a medicinal plant, having valuable secondary metabolites, such as noradrenaline, dopamine and omega -3, is used as anti –cencer, antioxidant, and blood purifier factor. The present research is to determine suitable concentration of plant growth regulators (auxin and cytokinin) for the production the *in vitro* plantlet in hypocotyle, cotyledon, internod and leaf explants in the three Iranian purslane genotypes (mashhad, yasuj and parsabad) was performed. The purslane seeds were cultured on MS basal medium after sterilized. Explants were cultured on MS basal medium with BAP, IBA and NAA plant growth regulators for callus induction, regeneration and rooting. This experiment was factorial based on complete randomized design with three replications. Data were analyzed with SPSS 16 based on Duncan multiple range test. The result of this experiment showed that the combination of auxin and cytokinin makes a better callus formation of each three genotypes in the hypocotyle, cotyledon, internod and leaf explants of purslan medicinal plant. The maximum average weight of callus achieved in media containing 3 mg/l BAP in combination with 1 mg/l IBA in hypocotyl explants of mashhad genotype (1/25 gr). No shoot regeneration was observed in leaf explants of mashhad, yasuj and parsabad genotypes. Regeneretion was produced in hypocotyl explants of mashhad and yasuj genotypes in combination BAP plus NAA. Shoot regeneration from cotyledon explants of parsabad genotype and hypocotyl explant of mashhad and parsabad genotypes was observed in combination BAP plus IBA. The maximum shoot regeneration was observed in 3 mg/l BAP with 55/55 percent from internod explants of yasuj genotypes.

Keywords: Purslane *(Portulaca oleracea* L.*)*, Plant growth regulator, Explant, Callus induction

University of Mohaghegh Ardabili

Faculty of Agriculture and Natural Resources

Department of Horticultural Science

Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of M.Sc. In Biotechnology and Molecular Genetic of Horticultural Crops

Title:

Investigation of Purslane (*Portulaca oleracea* L.) genotypes response to plant growth regulators in *in vitro* condition

Supervisor:

Mehdi Mohebodini (Ph.D)

Advisor:

Esmaeil Chamani (Ph.D)

By:

Soheila Nedaei

February – 2016