مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۹ شماره ۴ صفحه‌های ۵۰۹ تا ۵۱۸ (۱۳۹۷)

پینه‌زایی و کاربرد متیل جاسمونات در افزایش دوپامین پینه‌های گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.)

Callus Induction and Application of Methyl Jasmonate to Increase Dopamine in Calluses of *Portulaca oleracea* L.

فرشته حیدرقلی‌نژاد*، حسین مرادی، مهناز کریمی و وحید اکبرپور[۲]

چکیده

گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) حاوی ماده‌های موثر ارزشمندی مانند دوپامین، نورآدرینالین و امگا-۳ است. افزایش متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله محرک‌های شیمیایی کاربرد گسترده‌ای در کشت بافت گیاهان دارویی دارد. هدف از انجام این آزمایش در ابتدا بررسی نقش تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در تولید پینه خرفه و سپس تعیین مقدار دوپامین پینه گیاه خرفه زیر اثر محرک شیمیایی متیل‌جاسمونات بود. در آزمایش اول اثر بنزیل آمینوپورین (BAP) با غلظت‌های صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر و 2,4-D با غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، بر پینه‌زایی دو ریزنمونه برگی و مریستم بررسی شد. بهترین پینه‌زایی در ریزنمونه برگ با درصد انگیزش پینه ۱۰۰٪، وزن تر ۱۲۱ میلی‌گرم و قطر پینه ۵/۱ میلی‌متر در ترکیب دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد. در آزمایش دوم اثر متیل‌جاسمونات در غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار طی دو، چهار و شش روز بر تولید دوپامین پینه بررسی شد. مقدار دوپامین بعد از تهیه عصاره از تیمارهای مختلف با دستگاه کروماتوگرافی مایع اندازه‌گیری گردید. بالاترین مقدار دوپامین در غلظت ۲۰۰ میکرومولار طی دو روز (۰/۶۸۵ میلی‌گرم بر لیتر) به‌دست آمد. استفاده از متیل‌جاسمونات در تمامی تیمارها سبب افزایش دوپامین نسبت به شاهد شد. بنابراین متیل جاسمونات محرکی موثر در افزایش متابولیت ثانویه در خرفه است.

واژه‌های کلیدی: اکسین، الیسیتور، سیتوکنین، گیاه دارویی، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. از تیره خرفه‌سانان (Portulacacea) می‌باشد. قسمت‌های مختلف این گیاه حاوی متابولیت‌های ثانویه متعددی مانند گالوتامین‌ها[۳]، کوئرستین‌ها[۴] و مقادیر فراوانی از کاتکولامین‌های[۵] نورآدرینالین[۶] و دوپامین[۷] است که نورآدرینالین و دوپامین مهم‌ترین ترکیب‌های این گیاه هستند (۲۸). از ماده‌های موثر موجود در آن در درمان بیماری‌های مختلفی مانند دیابت، بیماری‌های گوارشی، مشکل هاضمه و بیماری‌های قلبی استفاده می‌شود (۱۲). دوپامین یک ترکیب آلی از خانواده کاتکولامین‌ها و فنتیل‌آمین‌هاست که نقش حیاتی در بدن و مغز انسان دارد. در گیاهان به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی است که از

۱- تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۱۷

۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و استادیاران گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (sari.agri201558@gmail.com).

۳- Glutamine ۴- Quercetin ۵- Catecholamine ۶- Noradrenaline ۷- Dopamine

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

پراکسیداسیون چربی در اثر گرما و نور شدید خورشید محافظت می‌کند (۳۰). استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی در شرایط کشت دورن شیشه‌ای سبب شده ماده‌های موثر در شرایط کنترل شده و در مدت زمان کوتاه‌تر تولید شوند. روش‌های متنوعی به‌منظور افزایش ماده‌های موثر در کشت یاخته‌های گیاهی به‌کار می‌رود که از جمله این روش‌ها استفاده از محرک‌های شیمیایی و زنده است (۲۲).

از بافت پینه به‌منظور افزایش گیاهان، انتقال ژن به گیاه و هم‌چنین تولید متابولیت‌های ثانویه و دیگر ترکیب‌های مفید می‌توان استفاده نمود (۱۳). گیاه دارویی خرفه حاوی ماده‌های موثر ارزشمندی است که با استفاده از سیستم کشت بافت و تولید پینه می‌توان در پی تولید این ماده‌های موثر بود و حتی مقدار آن‌ها را با استفاده از انواع محرک‌ها افزایش داد. از جمله محرک‌های شیمیایی پرکاربرد در کشت بافت گیاهان دارویی متیل‌جاسمونات است که اثر آن بر تحریک متابولیت‌های ثانویه در گیاهان مختلف اثبات شده است (۱۰). متیل‌جاسمونات به عنوان مولکولی سیگنالی نقشی کلیدی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کند. در برخی از سیستم‌های انتقال منجر به القای فعالیت آنزیم‌های ویژه‌ای می‌شود که واکنش‌های زیست‌ساختی مربوط به تولید ترکیب‌های دفاعی را کاتالیز می‌کنند (۱۸). متیل‌جاسمونات با ایجاد تنش اکسیداتیو و تحریک فعالیت دفاعی باعث فعال شدن مسیر تولید ترکیب‌های ثانویه در پاسخ به تنش می‌شود، در نتیجه تولید متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (۳۲).

اکسین و سیتوکنین از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و تاثیرگذار بر تقسیم یاخته‌ای در کشت بافت می‌باشند. براساس پژوهش‌های گذشته حضور اکسین و سیتوکنین به‌منظور انگیزش پینه در محیط کشت بافت ضروری است (۲۵). در بررسی پینه‌زایی خرفه به کمک بنزیل آمینو پورین (BAP) و ایندول بوتریک اسید (IBA)[۲] مشخص شد که بهترین پینه از ریزنمونه برگ روی محیط کشت موراشیگی و اسکوک (MS)[۳] با کاربرد ۵ و ۱۰ میکرومولار BAP و ۱۰میکرومولار IBA به‌دست آمد (۲۴). در بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) بهترین تیمار پینه‌زایی غلظت یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP برای ریزنمونه میانگره و دمبرگ در روشنایی بود. پس از این تیمار استفاده از ریزنمونه برگی با تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه یک میلی‌گرم در لیترBAP در شرایط تاریکی و سپس نور، تیمار پربازده‌ای بود (۲). در ریشه‌های موئین خرفه، بهترین تیمار از نظر زمان آغاز پینه‌زایی و وزن تر، کاربرد یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود (۱). در بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla*) بیش‌ترین رشد پینه مربوط به ریزنمونه برگ در ترکیب یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود و کم‌ترین مقدار پینه‌زایی در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد (۱۷). در *Glinus lotoides* بالاترین مقدار تشکیل پینه (۱۰۰٪) در محیط حاوی 2,4-D در غلظت‌های ۰/۵، ۲ و ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر و نفتالین استیک اسید (NAA)[۴] ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌دست آمد (۲۹). در بررسی اثر محرک شیمیایی[۵] در ریشه‌های موئین خرفه، استفاده از ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات پس از ۴۸ ساعت مقدار نورآدرینالین را به هشت برابر افزایش داد (۲۱). اثر متیل‌جاسمونات در کشت سوسپانسیون یاخته‌ای گیاه *Taxus media* Rehd بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد استفاده از متیل‌جاسمونات مقدار تولید تاگزن کل را به ۱۴ برابر افزایش داده است (۱۴).

با توجه به کاربرد و نقش موثر متیل‌جاسمونات در افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی و پژوهش‌های محدودی که در کشت بافت گیاه خرفه به منظور افزایش مقدار ماده‌های موثر انجام شده است، در این

۱- 6- Benzylamino purine
۲- Indole-3- butyric acid
۳- Murashige and skoog medium
۴- Naphtalin asetic acid
۵- Elicitor

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

پژوهش ابتدا از غلظت‌های مختلف 2,4-D و BAP در تولید پینه استفاده شد. سپس برای افزایش دوپامین، اثر غلظت و مدت زمان تیمار الیسیتور متیل‌جاسمونات در بافت پینه خرفه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ابتدا بذرهای خرفه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برای گندزدایی، بذرها در اتانول ۷۰٪ و سپس هیپوکلریت سدیم ۵٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌همراه چند قطره توییین ۲۰ قرار گرفتند. در نهایت بذرها سه بار با آب مقطر گندزدایی شده در زیر لامینارهود آبشویی شدند. بذرهای ضد عفونی شده روی محیط کشت MS حاوی ۳٪ ساکارز و ۰/۷٪ آگار با پی‌اچ ۵/۸ قرار گرفتند. سپس ریزنمونه برای انجام آزمایش از برگ و مریستم انتهایی گیاهچه‌های کشت بافتی ۲۵ روزه تهیه شد. ریزنمونه‌های برگی و مریستم روی محیط کشت MS حاوی سه سطح صفر، یک و دو میلی‌گرم در لیتر BAP و سه سطح صفر، ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس) و شرایط تاریکی به‌مدت ۴۰ روز قرار گرفتند. ویژگی‌های مورد بررسی شامل زمان آغاز پینه‌زایی، درصد انگیزش پینه، وزن تر و قطر پینه بود. اندازه‌گیری قطر پینه با استفاده از کولیس دیجیتال انجام گرفت، به صورتی که پینه از چند جهت اندازه‌گیری و سپس از اندازه‌ها میانگین گرفته شد و عدد میانگین به عنوان قطر پینه ثبت گردید. پینه‌های به‌دست آمده چهار بار به‌فاصله ۲۰ روز یک‌بار روی همان محیط زیرکشت شدند. به‌منظور تیمار پینه‌ها با محرک، محیط کشت MS با ترکیب شیمیایی مناسب تعیین شده از آزمایش اول (دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) مورد استفاده قرار گرفت. تیمارهای متیل‌جاسمونات (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) با استفاده از فیلتر سرسرنگی گندزدایی و به محیط کشت افزوده شد. در هر پتری‌دیش ۱/۵ گرم پینه قرار داده شد که در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. با توجه به دوره زمانی متفاوت در اعمال محرک، پس از گذشت دو، چهار و شش روز از هر تیمار پینه‌ها برداشت و درون هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند. پینه‌های پودر شده در فالکون ریخته شدند و ۱۵ میلی‌لیتر HCl ۰/۱ مولار به آن‌ها افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۹۰ دقیقه در دستگاه حمام اولتراسونیک قرار گرفتند و پس از آن به‌مدت ۴۸ ساعت در یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. نمونه‌ها به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و برای اندازه‌گیری مقدار دوپامین به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC[۱]) به آزمایشگاه منتقل شدند (۱۱).

اندازه‌گیری دوپامین

اندازه‌گیری دوپامین توسط دستگاه HPLC مدل ۱۵۲۵ ساخت کشور آمریکا، شامل دو پمپ، دتکتور UV (برای دوپامین ۲۲۰ نانومتر)، ستون C ۱۸ و نرم افزار Empower انجام شد. فاز متحرک دستگاه شامل پتاسیم هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) ۰/۰۲ مولار، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۳۰ میلی‌مولار و متانول ۷۰٪ در pH سه بود. نمونه‌های استخراج شده در غلظت ۳۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شدند و با سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از ستون C ۱۸ به قطر ذره‌های پنج میکرون و ابعاد ۱۵۰× ۴/۶ میلی‌متر عبور کردند. هر نمونه در طول موج ۲۲۰ نانومتر برای دوپامین طی زمان ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری و شناسایی شد. طیف‌های مربوط به دوپامین با استاندارد مقایسه و مقدار هر یک براساس طیف استاندارد محاسبه شد.

هر دو آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام گردید. آزمایش اول با چهار تکرار و پنج ریزنمونه و آزمایش دوم با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار

۱- High performance liquid chromatography

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

SAS نسخه ۹/۱ و برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌ها آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. هم‌چنین در ترسیم شکل‌ها و جدول‌ها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

نتیجه‌های آزمایش اول (پینه‌زایی)

آغاز پینه‌زایی ریزنمونه‌ها در میان تیمارهای مختلف متفاوت بود. پس از گذشت هشت روز ریزنمونه‌های برگ و مریستم در ترکیب یک و دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D شروع به پینه‌زایی کردند. در دیگر تیمارها به طور میانگین بعد از گذشت ۱۲ تا ۲۰ روز پینه‌زایی دیده شد. هر دو ریزنمونه ابتدا از مقطع برش شروع به تشکیل پینه‌های سفید رنگی کردند که به تدریج گسترده شدند. بعد از گذشت ۴۰ روز دیگر ویژگی‌ها مانند درصد انگیزش پینه، وزن تر و قطر پینه‌ها ارزیابی شد. بین دو ریزنمونه برگ و مریستم اختلاف‌های معنی‌داری دیده شد. اثر نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد و برهمکنش آن‌ها بر ویژگی‌های درصد انگیزش پینه، وزن تر و قطر پینه در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. برای ویژگی زمان آغاز پینه‌زایی برهمکنش سه‌گانه نوع ریزنمونه، BAP و 2,4-D معنی‌دار نبود، اما در این ویژگی برهمکنش نوع ریزنمونه و 2,4-D در سطح پنج درصد و برهمکنش BAP و 2,4-D در سطح یک درصد معنی‌دار شد. براساس نتیجه‌های جدول مقایسه میانگین (جدول ۱)، از نظر درصد انگیزش پینه، وزن تر و قطر پینه، بهترین نوع ریزنمونه و تیمار تنظیم‌کننده رشد گیاهی مربوط به ریزنمونه برگ و ترکیب دو میلی‌گرم در لیتر BAP همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود. در برگ استفاده از غلظت کمتر BAP (یک میلی‌گرم در لیتر) همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D درصد پینه‌زایی، وزن تر و قطر پینه را کاهش داد.

جدول ۱- برش‌دهی اثر سه‌گانه بر اساس نوع ریز نمونه در صفات بررسی شده در گیاه خرفه.

Table 1. Slicing triple effect according to kind of explant in studied traits.

ریزنمونه Explant	BAP (mg L^{-1})	2,4-D (mg L^{-1})	درصد انگیزش پینه Callus induction (%)	وزن تر Fresh weight (mg)	قطر پینه Callus diameter (mm)
مریستم Shoot tip	شاهد Control (0)	control	0^{e}	0^{d}	0^{d}
		0.5	25^{d}	32^{c}	2.8^{ba}
		1.5	0^{e}	0^{d}	0^{d}
	1	control	50^{b}	59^{b}	2.6^{b}
		0.5	75^{a}	106.3^{a}	2.9^{a}
		1.5	0^{e}	0^{d}	0^{d}
	2	control	41.6^{c}	30^{c}	1.9^{c}
		0.5	50^{b}	55.3^{b}	3^{a}
		1.5	0^{d}	0^{d}	0^{d}
برگ Leaf	شاهد Control (0)	control	0^{d}	0^{d}	0^{c}
		0.5	50^{c}	65.3^{b}	3.1^{b}
		1.5	0^{d}	0^{d}	0^{c}
	1	control	50^{c}	63.6^{b}	3.2^{b}
		0.5	66.6^{b}	67.3^{b}	3.2^{b}
		1.5	0^{d}	0^{d}	0^{c}
	2	control	41.6^{c}	34.6^{c}	3.6^{b}
		0.5	100^{a}	121^{a}	5.1^{a}
		1.5	0^{d}	0^{d}	0^{c}

†The different letters indicate significant differences in 1% level of probability using LSD test.

† حرف‌های غیرمشابه نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ با استفاده از آزمون LSD می‌باشد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

در ریزنمونه مریستم، بهترین تیمار از نظر درصد انگیزش پینه و وزن تر تیمار یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به ترتیب با میانگین ۷۵٪ و ۱۰۶ میلی‌گرم بود. در سطح ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D هنگامی که غلظت سیتوکنین از یک به دو میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت مقدار پینه‌دهی کم شد، ریزنمونه‌ها از مسیر پینه‌دهی خارج شده و رشد طولی در مریستم‌ها دیده شد. هم‌چنین افزایش BAP از سطح یک به دو میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مقدار درصد پینه و وزن تر را کاهش داد. بهترین تیمار برای افزایش قطر پینه، کاربرد یک یا دو میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بود (جدول ۱). در هر دو ریزنمونه در تمام تیمارهایی که از 2,4-D به میزان ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب با BAP استفاده شد، پینه‌زایی رخ نداد و ریزنمونه‌ها به تدریج سیاه شدند. در محیط‌های بدون تنظیم‌کننده رشد (شاهد) پینه‌ای تشکیل نشد و ریشه‌های متعددی ایجاد گردید.

در بررسی اثر ریزنمونه و 2,4-D بر زمان آغاز پینه‌زایی، مشخص شد که ریزنمونه‌های مریستم و برگ با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی سریع‌ترین پینه‌زایی (میانگین ۹/۳ روز) را داشتند. در بررسی برهمکنش تنظیم‌کننده‌های رشد بر زمان آغاز پینه‌زایی مشخص شد سطح‌های یک و دو میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با میانگین هشت روز زودتر از دیگر تیمارها در هر دو ریزنمونه پینه‌دهی داشت.

نتیجه‌های آزمایش دوم (اعمال محرک شیمیایی)

براساس نتیجه‌های تجزیه واریانس، اثر غلظت و مدت زمان تیمار با متیل‌جاسمونات و برهمکنش آن‌ها بر مقدار دوپامین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. بیش‌ترین مقدار دوپامین در تیمار متیل‌جاسمونات با غلظت ۲۰۰ میکرومولار طی دو روز و ۱۰۰ میکرومولار طی شش روز به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات طی شش روز نداشت. استفاده از متیل‌جاسمونات در تمام تیمارها سبب افزایش دوپامین نسبت به شاهد گردید (شکل ۱).

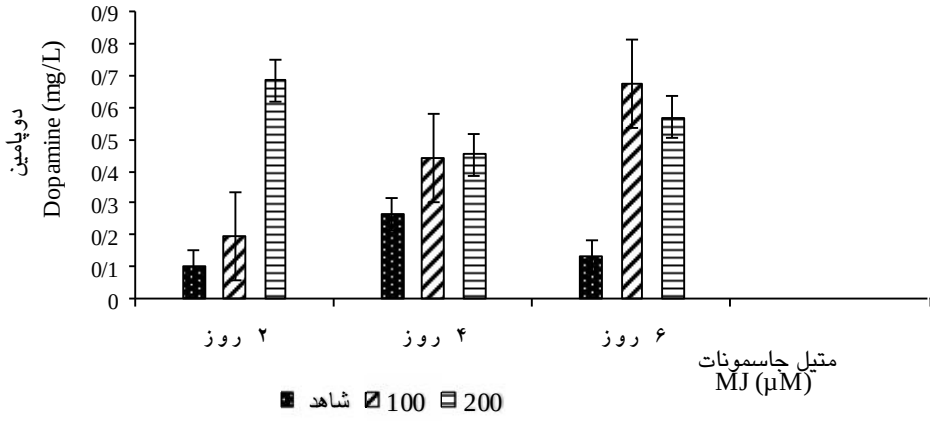

Fig. 1. The interaction of methyl jasmonate concentration and duration of application on the dopamine content in purslane.

شکل ۱- برهمکنش غلظت و مدت زمان تیمار متیل‌جاسمونات بر مقدار دوپامین در گیاه خرفه.

در تیمار ۲۰۰ میکرومولار طی دو روز و ۱۰۰ میکرومولار طی شش روز به‌ترتیب مقدار دوپامین ۶/۸ و پنج برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات تیمارهای زمانی دو و شش روز، دوپامین بیش‌تری نسبت به چهار روز داشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند، هرچند، تیمار زمانی دو روز دوپامین بیش‌تری داشته است. بنابراین، به نظر می‌رسد در غلظت بالاتر (۲۰۰ میکرومولار)، تیمار زمانی کم‌تر

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

مطلوب‌تر است. در غلظت ۱۰۰ میکرومولار با افزایش مدت زمان تیمار به شش روز نسبت به دو و چهار روز افزایش دوپامین بیش‌تر بود. در غلظت کم‌تر (۱۰۰ میکرومولار) افزایش مدت زمان تیمار تا شش روز اثر افزایشی بر مقدار دوپامین داشته است که می‌توان نتیجه گرفت در غلظت پایین‌تر با افزایش مدت زمان تیمار، دوپامین به مقدار بیش‌تری افزایش می‌یابد. براساس نتیجه‌های به‌دست آمده، استفاده از دو سطح متیل‌جاسمونات طی روزهای مختلف سبب افزایش مقدار دوپامین نسبت به شاهد گردید. برهمکنش غلظت و مدت زمان تیمار با محرک شیمیایی نتیجه‌های متفاوتی نشان داد، بنابراین غلظت و مدت زمان تیمار با متیل‌جاسمونات از فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر مقدار دوپامین بوده است.

بحث

بهترین پینه‌زایی در ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌دست آمد. در سطح یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D پینه‌دهی و سایر ویژگی‌های بررسی شده در ریزنمونه برگ کاهش یافت. چنان‌چه مشاهده شد افزایش BAP از یک به دو میلی‌گرم در لیتر در ریزنمونه برگ تاثیر مطلوبی بر پینه‌زایی داشته است. در گیاه *Solanum trilobatum* نیز افزایش BA سبب افزایش پینه‌زایی و پینه‌ها شد (۶). هم‌چنین در استویا (*Stevia rebaudiana*) با افزودن BA به محیط کشت‌های حاوی اکسین تولید پینه افزایش پیدا کرد (۴). در پژوهش حاضر، بهترین پینه‌زایی ریزنمونه مریستم در غلظت یک میلی‌گرم در لیترBAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به دست آمد. استفاده از دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D درصد پینه‌زایی و مقدار وزن تر را کاهش داد. استفاده از سطح بالاتر BAP (دو میلی‌گرم در لیتر) سبب رشد طولی در مریستم‌ها شد. در ریزنمونه مریستم با توجه به قابلیت این بخش از گیاه در رشد و تکثیر، استفاده از سطح بالاتر BAP سبب تحریک رشد طولی شد و بافت گیاهی را از مسیر پینه‌دهی خارج کرد. بنابراین، به نظر می‌رسد برای پینه‌دهی مطلوب در مریستم می‌بایست از سطح پایین‌تری از سیتوکنین در ترکیب با اکسین استفاده نمود. عوامل موثر در انگیزش پینه نوع تنظیم‌کننده‌های رشد به کار رفته و نوع ریزنمونه است (۹). هم‌چنین رشد پینه در یک گونه گیاهی براساس نوع ریزنمونه‌های آن گیاه متفاوت است (۱۹). در تیمارهایی که از BAP و 2,4-D به تنهایی استفاده شد پینه‌هایی تشکیل گردید اما به‌طور قابل‌توجهی کم‌تر از تیمارهایی بود که به طور همزمان از این دو تنظیم‌کننده رشد استفاده شده بود، که مطابق آن در گزارشی (۲۹)، Teshome و Feyssia بیان داشتند استفاده ترکیبی از BAP و 2,4-D به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اثر قابل‌توجهی بر انگیزش پینه دارد. تفاوت‌هایی که در تولید پینه در غلظت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد دیده می‌شود، می‌تواند به خاطر تمایز در بیان ژن‌هایی باشد که تولید پینه را کنترل می‌کنند. علاوه بر آن در برخی از سطح‌های هورمونی برخی از ژن‌ها به‌طور کامل بیان نمی‌شوند (۲۰). ترکیب‌های 2,4-D و BAP می‌تواند تولید پینه را به خوبی تحریک کرده و اثرهای هم‌افزایی را در تشکیل پینه به دنبال داشته باشند (۸). تعادل بین هورمون‌های سیتوکنین و اکسین یک عامل مورفوژنتیکی مهم در تولید پینه می‌باشد (۳). بهترین سطح 2,4-D غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود، که در ترکیب با سیتوکنین بهترین نتیجه را داشت. هنگامی که غلظت آن به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت، عدم پینه‌زایی، تغییر رنگ بافت گیاهی و در نهایت سیاه شدن ریزنمونه‌ها مشاهده شد. خرفه دارای اکسین درونی است و به نظر می‌رسد استفاده از اکسین خارجی در غلظت بالاتر، مازاد بر نیاز یاخته گیاهی بوده و غلظت بالاتر 2,4-D (اکسین) از تقسیم یاخته و تشکیل پینه جلوگیری نمود. بنابراین، ریزنمونه‌هایی که قابلیت تقسیم و تمایزیابی یاخته‌ای را از دست می‌دهند به تدریج از حالت فعال خارج شده و بعد تغییر رنگ تیره در آن‌ها ظاهر می‌شود. در بررسی نقش 2,4-D بر انگیزش پینه در گیاه رز (*Rose chinensis*) مشخص شد محیط MS همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بالاترین پینه‌دهی را داشت (۱۵). در گیاه مرزنگوش (*Origanum vulgare*) بهترین انگیزش پینه در سطح‌های پایین 2,4-D (۰/۵ یا یک میلی‌گرم در لیتر)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

به‌دست آمده است (۷). نتیجه‌های پژوهش حاضر همسو با گزارش‌های بالا، بر سطح‌های کمتر 2,4-D به عنوان سطح مناسب در ترکیب با سیتوکنین برای انگیزش پینه اشاره دارد.

اثر متیل‌جاسمونات بر تولید دوپامین

در پژوهش حاضر استفاده از متیل‌جاسمونات توانست مقدار دوپامین را در تمامی تیمارهای به کار رفته در بافت پینه افزایش دهد. بیش‌ترین مقدار تولید دوپامین در تیمارهای ۲۰۰ میکرومولار طی دو روز و ۱۰۰ میکرومولار طی شش روز تیمار با متیل‌جاسمونات به‌دست آمد. در پژوهشی در ریشه‌های موئین خرفه غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات طی ۴۸ ساعت مقدار دوپامین را به چهار برابر افزایش داد (۵) که در این پژوهش نیز استفاده از متیل‌جاسمونات سبب افزایش در مقدار دوپامین در بافت پینه خرفه شد و استفاده از هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات تاثیر افزایشی در تولید دوپامین داشت، اما افزایش دوپامین در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار طی سه دوره زمانی متفاوت بود. استفاده از غلظت ۲۰۰ میکرومولار طی مدت زمان کم‌تر (دو روز) بیش‌ترین تاثیر را داشت و باعث افزایش ۶/۸ برابری دوپامین شد و در غلظت ۱۰۰ میکرومولار مدت زمان بیش‌تر (شش روز) در افزایش مقدار دوپامین موثرتر بود و مقدار دوپامین را پنج برابر نسبت به شاهد افزایش داد. در گیاه *Eleutherococcus senticosus* بالاترین مقدار کلروژنیک اسید در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌دست آمد (۲۷). در پینه‌های گیاه *Cucumis prophetarum* بالاترین مقدار کوکوربیتاسین پس از سه روز در غلظت ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌دست آمد (۲۶) که مطابق با گزارش‌های بالا در پژوهش حاضر نیز استفاده از ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات طی دو روز دوپامین را به مقدار بیش‌تری نسبت به دیگر تیمارها افزایش داد. استفاده از ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات طی هفت روز مقدار متابولیت‌های ثانویه را در پینه‌های گیاه *Centella asiatica* افزایش داد (۲۳). در این پژوهش نیز استفاده از ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات بعد از شش روز بیش‌ترین تاثیر را بر افزایش مقدار دوپامین داشته است. به نظر می‌رسد متابولیت ثانویه دوپامین در پینه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات نقش دفاعی داشته که استفاده از این محرک بر بیان ژن‌های مسئول ساخت دوپامین تاثیرگذار بوده است. در بررسی اثر متیل‌جاسمونات بر تولید رزمارینیک اسید در گیاه *Agastache rugosa* Kuntze، بالاترین مقدار رزمارینیک اسید در محیط حاوی ۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به‌دست آمد. مقدار این ماده پس از قرارگیری در معرض ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات به ترتیب ۲/۱، ۴/۷ و ۳/۹ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت. نتیجه‌ها نشان داد متیل‌جاسمونات یک اثر مهم بر انباشت و افزایش مقدار رزمارینیک اسید در یاخته‌های تیمار شده دارد (۱۶). استفاده از ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات طی ۱۵ روز در گل راعی (*Hypericum perforatum*) مقدار متابولیت‌های ثانویه را در آن در حدود سه برابر افزایش داد (۳۱). مطابق گزارش‌های بیان شده، متیل‌جاسمونات از جمله محرک‌های موثر در افزایش متابولیت‌های ثانویه است که استفاده از آن در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف می‌تواند اثرهای افزایشی متفاوتی بر ماده‌های موثر در گیاهان دارویی داشته باشد. در کشت پینه به‌دلیل نفوذ بیشتر محرک در یاخته‌ها، فاکتورهای غلظت و زمان اعمال محرک، نقش موثری بر تحریک تولید ماده‌های موثره دارد. در این پژوهش استفاده از متیل‌جاسمونات در هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار در مدت‌های زمانی دو، چهار و شش روز سبب افزایش مقدار دوپامین شده است.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتیجه‌های این پژوهش ریزنمونه برگ گیاه خرفه با کاربرد BAP و 2,4-D بهترین پینه‌زایی را نشان داد. در ریزنمونه برگ استفاده از BAP در غلظت بالاتر به رشد و گسترش پینه کمک کرد، اما در مریستم غلظت بالاتر BAP باعث تولید پینه‌های کم‌تر و رشد طولی ریزنمونه‌ها شد. بنابراین، تعادل تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده در ترکیب با نوع ریزنمونه نقش موثرتری را نشان داد و ریزنمونه‌های برگی روی محیط دارای دو

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D پینه‌های مناسب‌تری را تولید نمودند. استفاده از غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات تاثیر افزایشی بر مقدار دوپامین داشته است. در پژوهش بالا مدت زمان‌های دو، چهار و شش روز همگی باعث افزایش سطح دوپامین نسبت به شاهد شدند. به نظر می‌رسد استفاده از غلظت بالاتر (۲۰۰ میکرومولار) در مدت زمان کم‌تر و همین‌طور استفاده از غلظت کم‌تر (۱۰۰ میکرومولار) طی مدت زمان بیش‌تر در افزایش دوپامین پینه‌های خرفه موثر باشد.

منابع References

۱- پیریان ک. و خ. پیری. ۱۳۹۳. بررسی پینه‌زایی ریشه‌های مویین در گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.). دو ماهنامه علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۰(۲): ۲۳۱-۲۳۸.

۲- سلطانی‌پول م.، ع. محمدی، ح. رهنما و ب. عباس‌زاده. ۱۳۹۰. بررسی کال‌زایی در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*). مجله زراعت و اصلاح نباتات، ۷(۱): ۵۴- ۴۵.

3. Abbasi, B., P.K. Saxena, SJ. Murch and C.Z. Liu. 2007. Echinacea Biotechnology: challenges and opportunities. *In vitro* Cell. Devel. Biotech. Plant. 43(6):481-492.
4. Ahmad, N., H. Fazal and R. Zamir. 2011. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* Bert. Sugar. Technol. 13(2):174-177.
5. Ahmadimoghadam, Y., Kh. Piri, B. Bahramnejad and P. Habibi. 2013. Methyle jasmonate and salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca Oleracea* L. Bull Enviro. Pharma. Sci. 2(6):89-94.
6. Alagumanian, S., V.S. Perumal, R. Rameshkannar and M.V. Rao. 2004. Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. Curr. Sci, 86(4):1478- 1480.
7. Arafeh, R.M., R.A. Shibli, M. Al-Mahmoud and M.A. Shatanwi. 2006. Callusing cell suspension culture and secondary metabolites production in Persian oregano (*Origanum vulgar* L.) and Arabian oregano (*O. syriacum* L.). Jordan J. Agr. Sci. 2(3):274-281.
8. Arda, A., F. Ozen and R. Kiran. 2012. Development of an efficient callus production protocol for *Amsonia orientakis*: A critically endangered medicinal plant. Eur. Asi. J. Biotech. Sci. 6: 105-112.
9. Bakhtiar, Z., M.H. Mirjalilian, and A. Sonboli. 2016. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. Crop Breed. Appl. Bio. 16:48-54.
10. Bulgakov, V.P., G.K. Tchernodea, N.P. Mischenko, M.V. Khodakovskaya, V.P. Glazunov, S.V. RAdchenko, E.V. Zvereva, S.A. FEdoreyev and Y.N. Zhuravlev. 2002. Effect of salicylic acid, methyl Jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes. J. Biotech. 97(3):213-221.
11. Chen, J., Y.P. Shi and J.Y. Liu. 2003. Determination of noradrenaline and dopamin in chines herbal extract from *Portulaca oleracea* L. by high-performance liquid chromatography. J. Chromat. A. 1003:127-132.
12. Dighe, V., O. Dhotre, P. Gaurang and A. Gursale. 2008. Quantification of dopamine in *Portulaca oleracea* L by high-performance thin layer chromatography. J. Plannar. Matogr. 21(3):183-186.
13. Fang,Y., M.A.L. Smith and M.F. Pepin. 1999. Effect of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocvanin producing cell cultures of Ohelo (*Vaccinum phalae*). *In vitro* Cell. Develo. Biotech. Plant, 35(1):106-113.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

14. Hren, M., S. Baebler, M. Camloh, M. Kova, M. Ravnikar and J. Zel. 2006. Yew (*Taxus media* Rehd) cell suspension cultures as a source of taxanes. Acta Physiol. Plant. 28(6):3-8.
15. Jala, A. 2014. Role of 2,4-D on callus induction and shoot formation of increase number of shoot in *Miniature Rose* in vitro. Amer. Trans. Engine. App. Sci. 3(3):207-212.
16. Kim Y.B., J. Kimkwang, M. Romijuddin, H. XU, W. Park, P. Tuan, X. Li, E. Chung, J.H. Lee and U.S. Park. 2013. Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* kuntze treated with methyl jasmonate. PLOS One, 8(5):1-8.
17. Kouhi, L., N. Zare, Z. Asghari and P. Shiekhzadehmossadegh. 2014. The role of plant growth regulators and different explants on reply tissue culture and cell suspention (*Matricari chomomilla* L.). Eco. Crops J. 8(2):203-214.
18. Kozlowski, G., A. Buchala and J.P. Metrax. 1999. Methyl jasmonate protects Norway protects [*Picea abies* (L.) Karst] seedling against pythum against *pythium ultimum* Trow. Physiol. Mol. Plant Patho. 55(1):53-58.
19. Magyar-taboti, K., J. Dobranszki, D.A. Teixeira and J.A. Silva. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 101(3):251-267.
20. Mahmood, I., A. Razzaq, Z. Khan, I.A. Hafez and S. Kaleem. 2012. Evaluation of tissue culture responses of promising Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and development of efficient regeneration system. Pak. J. Bot. 44:277-284.
21. Pirian, K. and Kh. Piri. 2012. Effect of methyle jasmonate and salisilic acid on noradrenalin accumulation in hairy roots of *Portulaca oleracea* L. Inter. Res. J. Appl. Bas. Sci. 3(1):213-218.
22. Rao, S.R. and G.A. Ravishan. 2002. Plant cell cultures chemical factories of secondary metabolites. Biotech. Adv. 20(1):101-153.
23. Rao, S.R., K. Usha and M. Arjun. 2015. Production of secondary metabolites from callus cultures of *Centella asiatica* L. Ann. Phyto. 4(1):74-78.
24. Safdari, Y. and S.K. Kazemitabar. 2009. Plant tissue culture study on two different races of Purslane (*Portulaca oleracea* L). Afr. J. Biotech. 8(21):5906-5912.
25. Saikia, M., K. Shrivastava and S. Sigh. 2013. Effect of culture media and growth hormone on callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam., a medicinally and commercially important tree species North East Indian. Asian J. Biol. Sci. 6(2):96-105.
26. Saker, M., S.E. Gengaihi, A. Kamel and M. Farid. 2010. Influence of differentiation state, salt stress and methyl jasmonate on *In vitro* production of Cucurbitacins from tissue cultures of *Ecballium elaterium* and *Cucumis prophetarum* to Egypt. Medicin. Aroma. Plant Sci. Biotech. 4(1):28.
27. Shohael, A.M., H.N. Murthy, E.J Ham and K.Y. Paek. 2007. Methyle jasmonate induced overproduction of eleutherosides in somatic embryos of Eleutherococcus senticosus cultured in bioreactors. Electro. J. Biotech. 10(4):13.
28. Simopoulos, A.P. 2004. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. Food Rev. Inter. 20(1):77-90
29. Teshome, S. and T. Feyssia. 2015. *In vitro* callus induction and shoot regeneration from leaf explant s of *Glinus lotoides* L. an important medicinal plant. Amer. J. Plant Sci. 6(9):1329-1340.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]
[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

30. Vidal-Gadea, A.G. and J.T. Pierce- Shimomura. 2012. Conserved role of dopamine in the modulation of behavior. Com. Inte. Biotech. 5(5):440-447.
31. Wang, Q.J., L.P. Zheng, Y.H. Sima, H.Y. Yuan and J.Q. Wang. 2013. Methyl jasmonate stimulates 20-hydroxyecdysone production in cell suspention cultures of *Achyranthus bidentata*. Plant Omic. J. 6(2):116-120.
32. Zhao, J., L. Davis and R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotech. Adv. 23(4):283-333.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 19 (4): 509 - 518 (2018)

Callus Induction and Application of Methyl Jasmonate to Increase Dopamine in Calluses of *Portulaca oleracea* L.

F. Heidargholinezhad*, H. Moradi, M. Karimi and V. Akbarpour[1]

Purslane (*Portulaca oleracea* L.) contains valuable ingredients such as dopamine, noradrinalin and omega-3. Increase in secondary metabolites by elicitors is widely used in tissue culture of medicinal plants. The aim of this study was to assess effect of plant growth regulators on callus induction and amount of dopamine in callus tissue of purslane under the influence of methyl jasmonate as an elicitor. For this purpose, in the first experiment the interaction effects of different concentrations of BAP (0, 1, and 2 mg L^{-1}) and 2,4-D (0, 0.5, and 1.5 mg L^{-1}) on two kinds of explants (leaf and meristem) were examined. The best callogenesis was obtained in the leaf explants with maximum callus induction (100%), fresh weight (121 mg), and callus diameter (5.1 mm) by combined application of 2 mg L^{-1} BAP and 0.5 mg L^{-1} 2,4-D. In the second experiment the effects of methyl jasmonate application (0, 100, and 200 µM) on dopamine production of calluses during 2, 4, and 6 days of treatment were investigated. After extract preparation of different treatments, the amount of dopamine was determined by HPLC. The highest amount of dopamine (0.685 mg L^{-1}) was obtained in concentrations of 200 µM after two days of treatment. Application of methyl jasmonate enhanced dopamine content in all treatments compared to the control. Therefore, methyl jasmonate which is an effective elicitor to increase secondary metabolite in purslane.

Keywords: Auxin, Cytokinin, Elicitor, Medicinal plant, Secondary metabolites.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-05-29]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.4.7.3]

1. M.Sc. Student of Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products and Assistant Professors of Department Horticulture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (sari.agri201558@gmail.com).