Archive of SID

مطالعه اثر ترکیبات مختلف هورمونی و اندام های گیاهی بر میزان باززایی گیاه ترشک (*Rumex asetosa* L)

کاوه زرگری، [۱]، علی محمد شکیب [۲] ، منصوره کشاورزی [۳] ، جواد مظفری [۴]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات- تهران

۲- استادیار موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی – کرج

۳- استادیار موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر – کرج

۴- استادیار موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر – کرج

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۲۴ تاریخ پذیرش:۸۷/۲/۱۷

چکیده

گیاه ترشک (*Rumex asetosa* L.) گیاهی دوپایه است که می تواند برای مطالعه ژن های دخیل در تشکیل اعضای گل به عنوان گیاه مدل انتخاب شود. بدین منظور بهینه سازی کشت بافت این گیاه جهت تعیین نقش چنین ژن هایی اجتناب ناپذیر است. از این رو مطالعه تاثیر ترکیبات هورمونی بر ریزنمونه های اندام های مختلف جهت باززایی گیاه ترشک انجام شد. محیط کشت MS بعنوان محیط پایه، انتخاب و تاثیر غلظت های مختلف اکسین های IAA و NAA ، سیتوکینین های BAP و TDZ روی اندامهای دمبرگ، قاعده برگ و پهنک برگ در باززایی گیاه، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ریزنمونه قاعده برگ در ترکیب NAA و BAP به ترتیب با غلظت ۰/۵ و ۳ میلی گرم در لیتر در محیط کشت پایه MS همراه با ۳درصد ساکاروز و ۰/۷ گرم در لیتر آگار، بیشترین باززایی(۳۲ درصد) را داشته است. در استفاده از هورمون TDZ با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر نیز نتیجه مشابهی حاصل شد. این تحقیق در سال ۱۳۸۴ در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی – واحد علوم و تحقیقات انجام گردیده است.

واژه های کلیدی: ترشک، کشت بافت، باززایی، سیتوکینین، اکسین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

خانواده *Polygonaceae* اغلب شامل گونه‌های دائمی با چند گونه یک ساله است. جنس *Rumex* شامل حدود ۲۰۰ گونه است که در نواحی معتدل پراکنده اند (Parker 1991 & Klark). ترشک (*Rumex asetosa* L.) گیاهی دوپایه است که چرخه زندگی خود را در یک سال تمام نموده و بذور تولیدی و نیز ریزوم‌ها منابع لازم برای تکرار رشد و بقای گیاه را تامین می نمایند. در گونه *Rumex* کروموزوم‌های جنسی وجود دارد. تعداد کروموزوم‌های پایه برابر ۱۴ (در پایه ماده) و ۱۵ (پایه نر) است (Ainsworth et al, 1995). تغییرات نر و ماده در گل ها تحت تاثیر عوامل محیطی قرار نمی گیرد. این خصوصیات باعث شده این گیاه برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گیرد (.et al Anisworth 1998). گرچه ژن هایی از این گیاه جداسازی شده اما نقش آن ها در تعیین جنسیت به دلیل نبود روش انتقال ژن در این گیاه انجام نشده است ; Ainsworth,2000) شکیب، ۱۹۹۹). در این راستا روش بهینه باززایی گیاه از طریق کشت بافت ضروری است. شکیب (۱۹۹۹) واکنش بافت های مختلف ترشک شامل ریشه، برگ، دمبرگ و ساقه به تولید کالوس و باززایی گیاه با استفاده از غلظت های مختلف اکسین ها و سیتوکینین ها را مورد بررسی قرار داده است. اکسین های IAA [1] و NAA [2] تولید کالوس ریشه زا نموده اما در محیط حاوی 2,4-D [3] کالوس بدون ریخت زایی تولید نمودند. در مقابل، بافت های کشت شده روی محیط های سیتوکینین، قابلیت باززایی گیاه به شکل مستقیم یا باززایی از طریق کالوس را داشتند. بیشترین فراوانی باززایی گیاه (۱۰۰ درصد) از کشت مستقیم قطعات ساقه روی محیط حاوی TDZ [4] به دست آمده و بررسی های بافت شناسی نشان داد که گیاهان باززایی شده، از سلول های مریستمی منطقه بافت آوندی منشأ گرفته بودند. گیاهان باززایی شده با درصد بالایی ریشه دار شدند و پس از انتقال به شرایط گلخانه، تولید بذر نمودند.

ایزدی دربندی و همکاران (۱۳۸۱) به منظور تعیین مناسب ترین قطعه جدا کشت و

1 - Indole-3-acetic acid
2 - Naphthaleneacetic acid
3 2,4 – Dichlorophenoxy acetic acid
4- Thidiozorone

www.SID.ir

Archive of SID

محیط غذایی برای باززایی گیاه ترشک، جداکشت های برگ، دمبرگ، لپه، محور زیر لپه و ریشه بر روی محیط MS حاوی ویتامین‌ها با ۲ درصد سوکروز و ۰/۸ درصد آگار و ترکیبات متفاوت هورمونی شامل IAA، زئاتین[1] ، BAP و کینتین[2] و نیز جیبرلیک اسید همراه با BAP و IAA را مورد بررسی قرار دادند. آن ها مناسب ترین قطعه جداکشت و محیط غذایی را به ترتیب برگ و محیط MS حاوی ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP تعیین کردند. علاوه بر ژنوتیپ گیاه، ترکیب و نسبت هورمونی مناسب برای باززایی گیاه لازم است. کارایی بالاتر باززایی می تواند امکان دستیابی به گیاهان تراریخته و مطالعه ژن های دخیل در تعیین جنسیت را میسر سازد. در این مطالعه اثر ترکیبات مختلف هورمونی روی یک پایه ماده گیاه ترشک بررسی شده است.

مواد و روش ها

از یک کلون گیاه ماده ترشک که از موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی در اختیار قرار گرفت استفاده شد. این کلون بصورت کشت درون شیشه نگهداری و تکثیر می شد و قطعات گیاهی لازم از این گیاهان تامین گردید. در تمام آزمایش‌ها، محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) دارای ۰/۷ گرم در لیتر آگار[3] و ۳درصد ساکاروز[4] جهت کشت قطعات گیاهی در نظر گرفته شد. قبل از افزودن آگار، pH محیط بین ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم و به حجم نهایی رسید و سپس آگار به آن افزوده شد. سپس محیط های آماده شده در ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۲ اتمسفر، استریل شد. ابتدا به منظور تعیین مناسب ترین قطعه گیاهی که بیشترین میزان باززایی را داشته باشد، قطعات دمبرگ، قاعده برگ و پهنک برگ روی محیط کشت حاوی ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ قطعه گیاهی انجام شد. سپس قطعه گیاهی که بیشترین میزان باززایی را داشت ،به منظور تعیین مناسب ترین غلظت تنظیم کننده های رشد سیتوکینین و اکسین مورد استفاده قرار گرفت. تنظیم کننده‌های رشد

1- Zeatin
2- Kinetin
3 - Agar
4- Surcose

www.SID.ir

Archive of SID

IAA یا NAA- α[1] هر یک بـه نسبت های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی گـرم در لیتر و BAP [2] با غلظت های ۱ ، ۱/۵، ۲ ، ۳ ، ۵ و ۷ میلی گرم در لیتر یا TDZ [3] با غلظت های ۰/۵ ، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر به عنوان تیمارهای آزمایشی به کار برده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۵ تکرار و هر تکرار شامل یک پتری حاوی ۱۰ قطعه گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. دو فاکتور، شامل تنظیم کننده رشد سیتوکینین در ۹ سطح و تنظیم کننده رشد اکسین در ۴ سطح بود. باززایی ریزنمونه ها به صورت چشمی شمارش شد و تعداد باززایی ها توسط برنامه SAS (نسخه ۹) مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. این تحقیق در سال ۱۳۸۴ در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی – واحد علوم و تحقیقات انجام گردیده است.

نتایج و بحث

باززایی فقط در غلظت های ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر IAA، ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IAA و ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA صورت گرفت و در سایر غلظت های BAP قطعات گیاهی فقط تولید کالوس نموده و باززایی در هیچ یک مشاهده نشد. نتایج آزمایش ها نشان داد که در ترکیب ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر IAA ، اگرچه کالوس تولید شد، اما تنها تعداد محدودی از کالوس‌ها باززایـی کردند (شکل ۱).

شکل ۱ – تولید کـالوس از کـشت قاعـده بـرگ گیـاه ترشک در محیط حاوی ۱/۵ میلی گـرم در لیتـر BAP و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر IAA.

Figure 1. Formation of callus from sorrel leaf base in a medium containing 1.5 mg l^{-1} BAP and 0.75 mg l^{-1} IAA

در غلظت هورمونی ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IAA و ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA کلیه قطعات کشت شده، تولید کالوس نموده و بیشترین میزان باززایی به ترتیب

1 α – naphthaleneacetic acid
2- Banzyl aminopurine
3 - Thidiozorone

www.SID.ir

Archive of SID

۲۸درصد و ۳۲درصد ثبت شد (شکل ۲). سایر غلظت های هورمونی BAP همراه با IAA یا NAA فقط تولید کالوس نموده و باززایی در کالوس ها مشاهده نشد و لذا از آزمایش حذف شدند و تیمارهایی که باززایی در آن ها مشاهده شد به صورت طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفتند.

شکل ۲ – باززایی گیاه ترشک در محیط کشت حاوی ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA

Figure 2. Regeneration of sorrel in a medium containing 3 mg l^{-1} BAP and 0. 5 mg l^{-1} NAA

در سه ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA ، ۱ میلی گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA کلیه ریز نمونه ها پس از تولید کالوس، باززایی کردند. مقدار باززایی به ترتیب برابر با ۳۲، ۲۸ و ۳۰ درصد بود (شکل ۳).

نتایج تجزیه واریانس غلظت های مختلف BAP و TDZ و مقایسه میانگین ها توسط آزمون دانکن به ترتیب در جداول ۱ و ۲ مشاهده می شود. ضریب تغییرات آزمایش برابر با ۱۵/۸۷ درصد حاصل شد.

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس غظت های ۱/۵ و ۳ میلی گرم در لیتر هورمون BAP و ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم درلیتر TDZ

Table 1. Analysis of variation for 1.5 and 3 mg l^{-1} BAP and 0.5, 1 and 2 mg l^{-1} TDZ hormone concentration

منبع تغییرات.S.O.V	درجه آزادی.D.F	مجموع مربعات.S.S	میانگین مربعات.M.S	F
تیمار t	4	19.04	4.76	* 29.75
خطای آزمایشی e	20	3.2	0.16	-
کل t	24	22.24	-	-

* معنی دار در سطح احتمال ۱/ درصد * Highly significant at 1% level of probability

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقایسه میانگین های تیمارهای آزمایشی هورمون های BAP و TDZ

Table 2. Means comparison for BAP and TDZ hormone treatments

گروه Group	میانگین تعداد باززایی Regeneration No. Mean	mg/l	تیمار Treatment
a	3.2	0.5	TDZ
a	3	2	TDZ
a	2.8	1	TDZ
a	2.8	3	BAP
b	0.8	1/5	BAP

نتایج تجزیه واریانس غلظت های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر هورمون IAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و مقایسه میانگین ها توسط آزمون دانکن به ترتیب در جداول ۳ و ۴ مشاهده می شود. ضریب تغییرات آزمایش برابر با ۲۰/۷ درصد حاصل شد.

جدول ۳- تجزیه واریانس غلظت های مختلف هورمون های IAA و NAA

Table 3. Analysis of variation of various IAA and NAA hormone concentrations

F	میانگین مربعات M.S.	مجموع مربعات S.S.	درجه آزادی D.F.		منبع تغییرات S.O.V.
* 39.71	9.27	18.53	2	t	تیمار
-	0.23	2.8	12	e	خطای‌آزمایشی
-	-	21.33	14	t	کل

* معنی دار در سطح احتمال ۱/ درصد * Highly significant at 1% level of probability

جدول ۴- مقایسه میانگین های غلظت های مختلف هورمون های IAA و NAA

Table 4. Means comparison of various IAA and NAA hormone concentrations

گروه Group	میانگین تعداد باززایی Regeneration No. Mean	mg/l	تیمار Treatment
a	3.4	0.5	NAA
a	2.8	0.5	IAA
b	0.8	0.75	IAA

www.SID.ir

Archive of SID

توضیح: میانگین هایی که یک حرف مشترک دارند در سطح ۵درصد آزمون دانکن، اختلاف معنی دار ندارند.

N.B: Means with the same letters are not significantly different at 5% level of DMRT

اثر قطعات دمبرگ، قاعده برگ و پهنک گیاه ترشک با استفاده از محیط کشت حاوی ۳ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها به ترتیب در جداول ۵ و ۶ مشاهده می شود. ضریب تغییرات آزمایش برابر با ۱۹/۵۶درصد حاصل شد.

شکل ۳ – باززایی گیاه ترشک در محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA

Figure 3. Regeneration of sorrel in a medium containing 0.5 mg l^{-1} TDZ and 0.5 mg l^{-1} NAA

جدول ۵- تجزیه واریانس باززایی قطعات مختلف گیاهی

Table 5. Analysis of variation of various explants

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی D.F.	مجموع مربعات S.S.	میانگین مربعات M.S.	F
تیمار t	2	8.13	4.07	30.5*
خطای آزمایشی e	12	1.6	0.13	-
کل T	14	9.73	-	-

* معنی دار در سطح احتمال ۱/ درصد * Highly significant at 1% level of probability

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶- مقایسه میانگین های تیمارهای آزمایشی

Table 6- Means comparison for treatments

تیمار Treatment	میانگین تعداد باززایی Regeneration No. Mean	گروه Group
قاعده برگ Leaf base	2.8	a
دمبرگPetiol	1.8	b
پهنک برگLeaf blade	1	c

توضیح: میانگین هایی که یک حرف مشترک دارند در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، اختلاف معنی دار ندارند.

N.B: Means with the same letters are not significantly different at 5% level of DMRT.

با توجه به جدول ۸، میزان باززایی از بافت قاعده برگ از سایر بافت ها بیشتر بود. نتایج حاصل دلالت بر آن دارد که کشت قطعات قاعده برگ در محیط MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۳ یا ۰/۵ میلی گرم در لیتر به ترتیب BAP یا TDZ بیشترین میزان باززایی را دارد و می تواند برای کارهای بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

ایزدی دربندی و همکاران (۱۳۸۱) غلظت ۱/۵ و ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر به ترتیب هورمون های BAP و IAA را مناسب ترین ترکیب هورمونی برای باززایی جداکشت های ترشک اعلام کرد. شکیب و اینزورث (۱۳۷۹) نیز بیشترین میزان باززایی را با هورمون TDZ به دست آوردند که با نتایج حاصل در این آزمایش مطابقت دارد. اختلاف نتیجه حاصل از این آزمایش برای هورمون BAP (۳ میلی گرم در لیتر) با نتیجه حاصل از آزمایش ایزدی دربندی (۱/۵ میلی گرم در لیتر) ممکن است به دلیل واکنش متفاوت جداکشت های مورد استفاده در دو آزمایش باشد. عامل دیگری که می تواند بر روی میزان باززایی جداکشت ها تاثیر گذارد، سن اندام گیاهی است که جداکشت از آن تهیه شده است. برگ ها و دمبرگ های جوان تر و مسن تر ممکن است بر روی نتیجه میزان باززایی تاثیر داشته باشد. همچنین عوامل محیطی همچون نوع محیط کشت مورد استفاده (دست ساز یا کیت آماده) و میزان pH محیط کشت بر میزان باززایی کالوس تاثیرگذاز بوده و لذا لازم است در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرند.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات ریاست و مسئوولین مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات که امکانات اجرای این تحقیق را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

۱. ایزدی دربندی، ع؛ ع. م. شکیب؛ ح. جعفریان. ۱۳۸۱. بهینه سازی کشت بافت گیاه دو پایه ترشک. چکیده مقالات هفتمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. نشر آموزش کشاورزی، صفحه ۴۶۷.

۲. شکیب، ع. م، چ. اینزورث. ۱۳۷۹. باززایی گیاه از طریق کشت بافت در گیاه مدل ترشک.چکیده مقالات ششمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. چاپ نیما، صفحه ۱۹۱.

3. Ainsworth, C., S. Crossley, V. Buchanan-Wollaston, M. Thangavelu and J. Parker. 1995. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *The Plant Cel.* Vol 7, Issue 10, pp. 1583-1598.
4. Ainsworth, C., Parker, J. and V. Buchanan-Wollaston, 1998. Sex determination in plants. *Current Topics in Development*. 38, 167- 223.
5. Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecous plants. *Ann. Bot*. 86, 211-221.
6. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
7. Parker, J.S. and Klark M.S. 1991. Dosage sex-chromosome systems in plants. *Plant Science*. 80, 79-92.
8. Shakib, A. M. 1999. MADS box genes in sorrel (*Rumex acetosa* L.)
9. Ph.D. thesis. University of London.

www.SID.ir