Archive of SID

"مجله علوم زراعی ایران"
جلد ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۳

باززایی گیاهچه با فراوانی بالا در گیاه دوپایه ترشک
High frequency plantlet regeneration in the dioecious plant sorrel

علی ایزدی دربندی[۱] و علی محمد شکیب[۲]

چکیده

ترشک (*Rumex acetosa* L.) یک گونه دوپایه و چند ساله از خانواده Polygonaceae است که به عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنتیک مولکولی تعیین جنسیت به کار می‌رود. در این تحقیق به منظور دستیابی به مناسب‌ترین نوع ریزنمونه و محیط کشت برای باززایی این گیاه، ریزنمونه‌های برگ، دمبرگ، لپه، محور زیر لپه و ریشه بر روی محیط MS حاوی ویتامین‌ها با دو درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار و ترکیبات متفاوت هورمونی کشت شدند. اکسین‌های ایندول ۳- استیک اسید(IAA) ، آلفا-نفتالین استیک اسید(NAA) و سیتوکینین‌های زآتین (Zeatin) ، ٦-بنزیل آمینو پورین(BAP) ، تیدیازارون (TDZ) و کینتین (Kin) و نیز جیبرلیک اسید(GA_3) همراه باBAP وIAA به محیط‌های کشت اضافه گردید. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. کالوس‌دهی و باززایی کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های کشت شده ارزیابی شدند. مناسب‌ترین نوع ریزنمونه و محیط کشت به ترتیب برگ و محیط موراشیگ و اسکوگ(MS) حاوی ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلیگرم در لیترBAP تعیین گردید. میزان کالوس‌دهی و باززایی از ریزنمونه برگ در این محیط کشت به ترتیب ۱۰۰ و۸۱ درصد ثبت گردید. نمونه‌های باززایی شده از ریزنمونه برگ در این محیط دارای چندین نوساقه (Proliferation) بودند. مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که ایجاد سلول‌های فعال و متراکم از بخش‌های مرکزی کالوس و گسترش آن‌ها به سمت حاشیه آن با تشکیل آغازی‌های منفرد یا متجمع منشا باززایی نوساقه است. نتایج حاصل ارایه‌گر روشی نوین، ساده، کوتاه و در عین حال کارآمد در باززایی این گیاه مدل جهت مطالعات ژنتیکی وانتقال ژن است.

واژه‌های کلیدی: ترشک (*Rumex acetosa* L.) ، ریزنمونه، کالوس‌دهی، باززایی.

مقدمه

ترشک با نام علمی(*Rumex acetosa* L.) گیاهی علفی و دوپایه از خانواده پلی‌گوناسه است که از طریق رویشی(ریزوم) و زایشی(بذر) می‌تواند ازدیاد گردد. ویژگی‌های این گیاه از جمله تعداد کم کروموزم، دوپایه بودن، وجود کروموزم‌های جنسی وکوتاه بودن دوره رشد و نمو موجب شده است تا به عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گیرد (Ainsworth et al.,1998; Parker et al.,1991). تاکنون تعدادی ژن که در تشکیل اعضای گل دخالت دارند از این گیاه جداسازی شده که نیازمند تعیین نقش دقیق آن‌ها از طریق انتقال به گیاه است (Ainsworth et al.,1995) . انجام انتقال ژن در این گیاه

تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۳/۳/۱۰

۱ و ۲- به ترتیب کارشناس ارشد سابق و عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج.

www.SID.ir

Archive of SID

نیازمند روش مناسب کشت بافت و باززایی گیاه می‌باشد. در زمینه کشت بافت ترشک اطلاعات زیادی وجود ندارد. اولین گزارش در این زمینه توسط کالافیک و همکاران (Culafic et al., 1987 b) منتشر شد که در آن با استفاده از کشت جوانه، کوتیلدون و هیپوکوتیل روی محیط کشت حاوی هورمون‌های ۲،٤-دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و کینتین (Kin) و ایندول ۳-استیک اسید(IAA) کالوس تولیدشده است که این کالوس‌ها عموما ریشه‌زا بوده وگیاه باززایی نشد اما ریزازدیادی با کشت جوانه انتهایی انجام شد. اندام‌زایی از کالوس‌های حاصل از جوانه‌های جانبی از گونه دیگری به نام *R. acetosella* توسط همین نویسنده گزارش گردید.جنین‌های رویشی از این کالوس‌ها در محیط کشت دارای BAP ، IAA و ٦ درصد ساکارز به‌دست آمد(Culafic et al., 1987 a). باززایی و تولید گیاه از طریق کشت قطعات ساقه‌های گلدهنده توسط شکیب (Shakib, 1999) گزارش گردیده است ولی استفاده از این بافت‌ها مستلزم شرایط مناسب از نظر درجه حرارت پایین(سرما) و دوره نوری (روز بلند) برای تحریک و رشد ساقه‌های گلدهنده می‌باشد. لذا استفاده از بافت‌های رویشی (نظیر برگ) که به راحتی در دسترس می‌باشند، بسیار مطلوب است. در این مطالعه نتایج پیشرفت در روش باززایی گیاه با استفاده از بافت‌های رویشی گزارش می‌گردد.

مواد و روش‌ها

بذور حاصل از تلاقی یک رقم اصلاح شده ترشک (که تنها تولید پایه‌های ماده می‌نماید) و تیپ وحشی آن (به عنوان پایه نر) ضدعفونی سطحی گردید. برای این منظور ابتدا بذور را با آب مقطر استریل ۵۰ تا ٦۰ درجه سانتیگراد شستشو داده و سپس ۲۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و ۲۰ دقیقه در محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم تجاری (۵ درصد) قرار گرفتند که پس از هر مرحله سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذور سپس روی محیط MS حاوی ۲ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار کشت گردید تا جوانه زده و تولید گیاهچه نمایند. ریزنمونه‌ها شامل برگ، دمبرگ، لپه، محور زیرلپه و ریشه از گیاهچه‌های حاصل انتخاب شدند. آزمایش‌ها تعیین مناسب ترین نوع ریزنمونه و محیط کشت باززایی گیاه به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار(سه پتری‌دیش شیشه‌ای ۹ × ۱/۵ سانتیمتر) و پنج ریزنمونه در هر پتری‌دیش انجام گردید. به این ترتیب واکنش کالوس‌دهی و باززایی بافت‌های گیاهی در طی چهار آزمایش روی محیط کشت یادشده با ترکیبات هورمونی متفاوت به شرح زیر بررسی گردید. تجزیه واریانس داده‌ها نیز پس از تبدیل آن‌ها($x^{0.5}+0.5$) انجام گرفت.

آزمایش اول: کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی ایندول ۳- استیک اسید(IAA) با سه غلظت ۰/۰،۷۵/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر و کینتین (Kin) با دو غلظت ۱/۵ و۲/۵ میلیگرم در لیتر.

آزمایش دوم: کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت حاوی IAA با دو غلظت صفر و۰/۵میلیگرم در لیتر و زآتین (Zeatin) با دو غلظت صفر و یک میلیگرم در لیتر.

آزمایش سوم: کشت ریزنمونه‌ها در چهار محیط کشت زیر حاوی اکسین‌های IAA یا آلفا- نفتالین استیک اسید(NAA) با غلظت ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر و سیتوکنین تیدیازارون(TDZ) با غلظت‌های ۱ و۱/۵ میلیگرم در لیتر. در این آزمایش ریزنمونه نوک ساقه (Shoot - apex) نیز به همراه بخشی از بافت‌های اطراف آن کشت گردید.

محیط TI1 : حاوی ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر IAA و ۱ میلیگرم در لیترTDZ.

محیط TI2 : حاوی ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلیگرم در لیترTDZ.

محیط TN1 : حاوی ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر NAA و ۱ میلیگرم در لیترTDZ.

www.SID.ir

Archive of SID

محیط TN2 : حاوی ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلیگرم در لیتر TDZ.

آزمایش چهارم: کشت ریزنمونه‌ها در چهار محیط کشت زیر حاوی IAA با سه غلظت ۰/۰،۷۵/۵ و ۱ میلیگرم در لیتر و ٦- بنزیل آمینو پورین (BAP) با دو غلظت ۱/۵ و ۲/۵ میلیگرم در لیتر.

محیط MS1 : حاوی ۰/۵ میلیگرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلیگرم در لیتر BAP.

محیط MS2 : حاوی ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلیگرم در لیتر BAP.

محیط MS3 : حاوی ۱ میلیگرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلیگرم در لیتر BAP.

محیط MS4 : حاوی ۱ میلیگرم در لیتر IAA و ۲/۵ میلیگرم در لیتر BAP.

کشت‌ها در شرایط ۲۵ درجه سانتیگراد و روشنایی ١٦ ساعت با شدت نور سه هزار تا چهار هزار لوکس قرار گرفتند و هر پنج هفته یکبار روی محیط اولیه خود واکشت شدند. سرعت و کیفیت کالوس‌دهی و باززایی و درصد باززایی ریزنمونه‌ها از هفته پنجم به بعد ارزیابی شدند. درصد نهایی باززایی از ریزنمونه‌ها در هفته نهم ثبت گردید. گیاهان باززایی شده برای تولید ریشه به محیط MS فاقد هورمون منتقل شدند.

بررسی‌های بافت‌شناسی

به منظور مشاهده میکروسکوپی روند تغییرات ایجاد شده در جداکشت برگ روی محیط کشت MS2 از زمان کشت، تولیدکالوس تا باززایی گیاهچه آن، نمونه‌گیری از بافت‌های کشت شده آن در زمان‌های متفاوت (هفته اول تا نهم) انجام گرفت. نمونه‌ها در محلول تثبیت کننده FAA (شامل ۹۰ درصد الکل ۵۰ درجه، ۵ درصد اسید استیک گلاسیال و ۵ درصد فرمالین) به مدت ٢٤ ساعت و در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از آبگیری با سری اتانل ۲۵ تا ۱۰۰ درجه، نمونه‌ها در گزیلول قرار گرفتند و سپس درون پارافین ذوب شده و در آون ۵۸ درجه تیمار شدند. قالب‌گیری با رعایت حالت افقی و عمودی به ترتیب برای برش‌های طولی و عرضی درون پارافین در داخل مکعب‌های کاغذی انجام شد. از نمونه‌های قالب‌گیری شده با دستگاه میکروتوم و زاویه برش ۱۰ درجه، برش‌های ۱۰ میکرومتری تهیه شد. نمونه‌های حاضر پس از شستشو با گزیلول، نسبت متعادل گزیلول اتانل و آبدهی با سری اتانل ۱۰۰ تا ۲۵ درجه با هماتوکسیلین دلافیلد جهت رنگ‌آمیزی هسته‌ها به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شدند. این نمونه‌ها پس از آبگیری مجدد با سری اتانل ۲۵ تا ۹٦ درجه با فاست‌گرین به مدت ۲۰ تا ٦۰ ثانیه رنگ‌آمیزی شدند. مشاهده نهایی پس از شستشو متوالی با الکل مطلق، نسبت متعادل الکل : گزیلول و گزیلول خالص انجام شد. با این روش رنگ‌آمیزی، هسته، هستک قرمز رنگ می‌شود و دیگر قسمت‌های سلول سبز رنگ می‌گردند. نگهداری درازمدت از طریق ریختن یک قطره کانادابالزام و خشک کردن آن ممکن می‌گردد. مشاهدات میکروسکوپی بر روی نمونه‌های تهیه شده از مراحل مختلف القای کالوس، توسعه آن، تشکیل هسته‌های اولیه سلول‌های فعال، شکل‌گیری آغازی‌های اولیه و تبدیل به جوانه نوساقه صورت گرفت.

نتایج و بحث

آزمایش اول: در این آزمایش ریزنمونه‌های مختلف تمایل ضعیفی به کالوس‌دهی نشان دادند ولی ریشه‌زایی در همه آن‌ها مشاهده گردید و باززایی از این نمونه‌ها به‌دست نیامد.

آزمایش دوم: در این آزمایش ریزنمونه‌های ریشه تولید تعداد زیادی ریشه جانبی کردند. ریزنمونه‌های لپه و محور زیرلپه تمایل ضعیفی به کالوس‌دهی داشتند ولی بعد از چهار هفته رشد آن‌ها متوقف گردید و تیره و نارنجی رنگ شدند. ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ همگی کالوس تشکیل دادند. از این ریزنمونه‌ها پس از نه هفته کالوس‌های بزرگی تشکیل شد که درصد باززایی از کالوس‌های تولید شده در محیط کشت حاوی IAA و

www.SID.ir

Archive of SID

Zeatin به ترتیب ۴۰٪ و ۲۰٪ گردید. گیاهچه‌های حاصل دارای رشد کندی بودند.

آزمایش سوم: در این آزمایش ریزنمونه‌های گیاهی در محیط‌های کشت واکنش‌های متفاوت کالوس‌دهی و باززایی نشان دادند.

ریزنمونه‌های لپه، محور زیرلپه، دمبرگ و برگ در همه چهار محیط کشت بطور ۱۰۰ درصد کالوس تشکیل دادند. البته میزان رشد کالوس‌ها در محیط‌های حاوی IAA نسبت به محیط‌های حاوی NAA بیشتر بود و کالوس‌های بزرگتری تشکیل شدند. با افزایش میزان سیتوکنین TDZ کالوس‌ها رشد بیشتری داشتند. ریزنمونه ریشه مثل آزمایشات قبل هیچ پاسخی به کالوس‌دهی نشان نداد و تنها چندین ریشه جانبی از آن‌ها به وجود آمد. ریزنمونه‌های لپه، محور زیرلپه و ریشه در هیچ یک از محیط‌های کشت باززایی نداشتند. نتایج باززایی از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در جدول ۱ ارایه گردیده است. با توجه به جدول بالاترین درصد باززایی به ترتیب از دمبرگ (۴۰٪) روی محیط کشت TN1 و برگ (۳۵٪) روی محیط کشت TI1 حاصل گردید.

جدول ۱- درصد باززایی نوساقه از کالوس‌های برگ و دمبرگ در محیط‌های کشت دارای TDZ، IAA و NAA

Table 1. Shoot regeneration percentage from calli of leaf and petiol on media containing TDZ, IAA and NAA

Medium Explant	محیط کشت ریزنمونه	TI1	TI2	TN1	TN2
Leaf	برگ	35	10	6	6
Petiol	دمبرگ	13	0	40	10

گیاهچه‌های باززا شده از ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت TN1 دارای رشد بطئی و خفیف بودند، و با وجود درصد نسبتا مطلوب باززایی، این محیط شرایط رشدی مناسبی را برای گیاهچه‌ها تأمین نکرد. در محیط کشت TI1 فراوانی باززایی نسبتاً بالا بود و گیاهچه‌های حاصل نسبت به سایر محیط‌ها رشد سریع‌تری داشتند که

جدول۲- اثر ریزنمونه و هورمون‌های NAA،IAA و TDZ روی باززایی

Table 2. Effect of explants and hormons NAA, IAA and TDZ on regeneration

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	مقدار احتمال Prob. value
Explant	ریزنمونه	1	0.0022 ns	0.4991
TDZ		1	0.0737**	0.0012
EXP x TDZ		1	0.011 ns	0.1484
Auxin	اکسین	1	0.0025 ns	0.4798
EXP x Auxin		1	0.0737**	0.0012
TDZ x Auxin		1	0.00 ns	0.9691
EXP x TDZ x Auxin		1	0.100**	0.0012
Error	خطا	16	0.0048	

$R^2 = 0.71$ C.V. = 8.59%

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: Non significant, significant at the 5% and 1% levels of probability, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

چندین نوساقه نیز به وجود آوردند. ریزنمونه نوک ساقه که به همراه بخشی از بافت‌های اطراف آن در محیط‌های فوق کشت گردید پس از دو هفته ۱۰۰ درصد باززا شدند که از هفته سوم به بعد هریک از ریزنمونه‌ها دارای چندین نوساقه شدند. لذا از آن برای زیرازدیادی سریع پایه‌های مورد نظر می‌توان استفاده کرد. تعداد نوساقه‌های حاصل و سرعت باززایی از این ریزنمونه در محیط کشت‌های حاوی NAA نسبت به IAA بیشتر بود.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های باززایی شده برای دو ریزنمونه برگ و دمبرگ (جدول ۲) نشان داد که اثر سیتوکنین TDZ، اثر متقابل سه‌گانه آن با تیمارهای اکسین و ریزنمونه و هم‌چنین اثر متقابل ریزنمونه در اکسین معنی‌دار بود و سایر اثرات اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. در این آزمایش اثرساده نوع اکسین مصرفی (IAA یا NAA) تفاوتی نشان نداد در حالی که اثرات متقابل آن‌ها معنی‌دار شدند اما سطح یک میلیگرم در لیتر TDZ موجب اصلی در معنی‌دار شدن این عامل و اثر متقابل آن با سایر عامل‌ها بود. با توجه به معنی‌دار شدن اثرات متقابل سه‌گانه و دوگانه اکسین در ریزنمونه، به منظور تعیین بهترین اثر متقابل سه‌گانه، آزمون مقایسات مستقل عامل اکسین در سطوح متفاوت ریزنمونه و TDZ انجام شد که تنها اثر آن برای ریزنمونه برگ با یک میلیگرم در لیتر TDZ در سطح ۵٪ معنی‌دار گردید. بدین ترتیب بر اساس آزمون دانکن، مناسب‌ترین اثر متقابل سه‌گانه شامل جداکشت برگ با یک میلیگرم در لیتر IAA و یک میلیگرم در لیتر TDZ تعیین گردید.

آزمایش چهارم: در این آزمایش ریزنمونه‌های گیاهی در محیط‌های کشت واکنش‌های متفاوت کالوس‌دهی و باززایی نشان دادند که درصد باززایی هر یک در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳- درصد باززایی ریزنمونه‌های مختلف در محیط های کشت دارای IAA و BAP

Table 3. Regeneration percentage of different explants on media containing IAA and BAP

Medium Explant	محیط کشت ریز نمونه	MS1	MS2	MS3	MS4
Leaf	برگ	35	81	63	40
Petiol	دمبرگ	0	5	7	0
Cotyledon	لپه	0	22	0	19
Hypocotyl	محور زیرلپه	25	10	16	20
Root	ریشه	0	0	0	0

قطعات ریشه در هیچ یک از محیط‌ها کالوس تشکیل نداد و تنها ریشه‌های جانبی در آن‌ها به وجود آمد. از بافت‌های دمبرگ در عرض دو تا سه هفته در همه محیط‌ها کالوس‌های شادابی به وجود آمد ولی پس از هفته پنجم اکثر کالوس‌ها کدر شدند و بیشترین درصد باززایی(۷٪) در محیط MS3 بود. همه ریزنمونه‌های لپه در محیط‌های کشت کالوس تشکیل دادند. میزان تشکیل کالوس بستگی به سطح هورمون IAA داشت. بیشترین درصد باززایی(۲۲٪) از این ریزنمونه در محیط MS2 صورت گرفت. در کشت محور زیر لپه، کالوس‌ها از قسمت بالای آن (نزدیک لپه) تشکیل گردید و بیشترین درصد باززایی(۲۵٪) در محیط کشت MS1 بود. نمونه‌های باززا شده در محیط MS4 با ۲۰٪ باززایی دارای چندین نوساقه از هر ریزنمونه بودند. ریزنمونه‌های برگ در همه محیط‌های کشت واکنش بالایی(۱۰۰ ٪) به کالوس‌دهی نشان دادند. باززایی اغلب از کالوس‌های ایجاد شده در محل اتصال پهنک به دمبرگ (تجمع رگبرگ‌ها) صورت گرفت (شکل های ۱ تا ٦). بیشترین درصد باززایی (۸۱٪) در محیط MS2 دیده شد که از هر ریزنمونه چندین شاخه باززا به وجود

www.SID.ir

Archive of SID

آمد. محیط MS3 نیز با درصد باززایی ۶۳٪ در مرحله بعدی قرار گرفت که تعدادی از نمونه‌های باززایی شده آن نیز دارای چندین شاخه باززا بودند. آزمایش نشان داد که افزودن ۰/۵ میلیگرم در لیتر GA_3 به محیط MS2 تأثیری در کالوس‌دهی ریزنمونه‌های برگ ندارد ولی افزایش میزان ساکارز از ۲ به ۳ درصد موجب کاهش تشکیل و رشد کالوس‌ها شد.

جدول ٤- اثر ریزنمونه، IAA و BAP در باززایی

Table 4. Effect of explant, IAA and BAP on regeneration

S. O. V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS	مقدار احتمال prob.value
Explant	ریزنمونه	3	0.56**	0.0001
IAA		2	0.0461*	0.0267
EXP x IAA		6	0.0369*	0.013
BAP		1	0.0004 ns	0.8531
EXP x BAP		3	0.0524**	0.0085
Error	خطا	32	0.0113	

$R^2 = 0.71$ C.V. = 8.59%

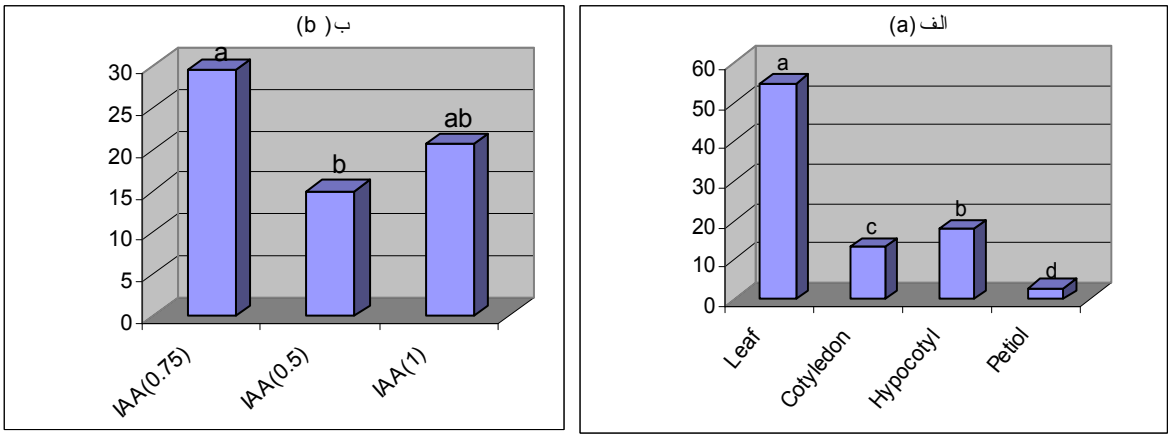
ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, * and **: Non significant, significant at the 5% and 1% levels of probability, respectively.

نتایج تجزیه واریانس میزان باززایی از ریزنمونه‌های مختلف روی ترکیبات مختلف هورمونی (جدول ٤) نشان داد که بین ریزنمونه‌ها اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد و اثرات متقابل این عامل با هورمون‌های IAA و BAP نیز معنی‌دار گردید. سطوح عامل BAP اختلافی نشان ندادند در حالی که سطوح عامل IAA در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید. با توجه به معنی‌دار شدن اثرات متقابل دوگانه، مقایسات مستقل، برای هریک از ریزنمونه‌ها در چهار محیط کشت انجام گرفت و گروه‌بندی بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد برای هر آزمایش به دست آمد. نتایج نشان داد که میزان باززایی ریزنمونه‌های دمبرگ و محور زیرلپه درهمه محیط‌های کشت اختلاف معنی‌داری نداشتند، هم‌چنین میزان باززایی ریزنمونه برگ در محیط‌های کشت MS2 و MS3 اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما باززایی در MS2 با MS1 و MS4 اختلاف معنی‌دار داشت. در نتیجه مناسب‌ترین اثر متقابل ریزنمونه برگ درمحیط کشت MS2 تعیین گردید. میزان باززایی ریزنمونه لپه در محیط کشت‌های MS2 و MS4 اختلاف معنی‌داری نداشتند، ولی باززایی بین این‌ها با دو محیط کشت دیگر اختلاف معنی‌دار نشان داد. در نهایت بر اساس گروه‌بندی دانکن و حداکثر باززایی ثبت شده مناسب‌ترین اثر متقابل این ریزنمونه مانند ریزنمونه برگ در محیط کشت MS2 بود. با توجه به معنی‌دار شدن اثرات اصلی عامل‌های ریزنمونه و IAA آزمون مقایسه میانگین دانکن (نمودار ۱)برای سطوح (غیر تصادفی) عامل‌های ریزنمونه و IAA انجام شد. نتایج نشان داد که بین میانگین باززایی ریزنمونه‌ها در کلیه تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد و ریزنمونه برگ بالاترین باززایی را در همه ترکیبات هورمونی داشت. بین دو سطح ۰/۵ و ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر عامل IAA اختلاف معنی‌داری بود در حالی که بین این سطوح و سطح یک میلیگرم در لیتر اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱- مقایسه میانگین باززایی در سطوح ریزنمونه (الف) و IAA (ب) ازطریق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد

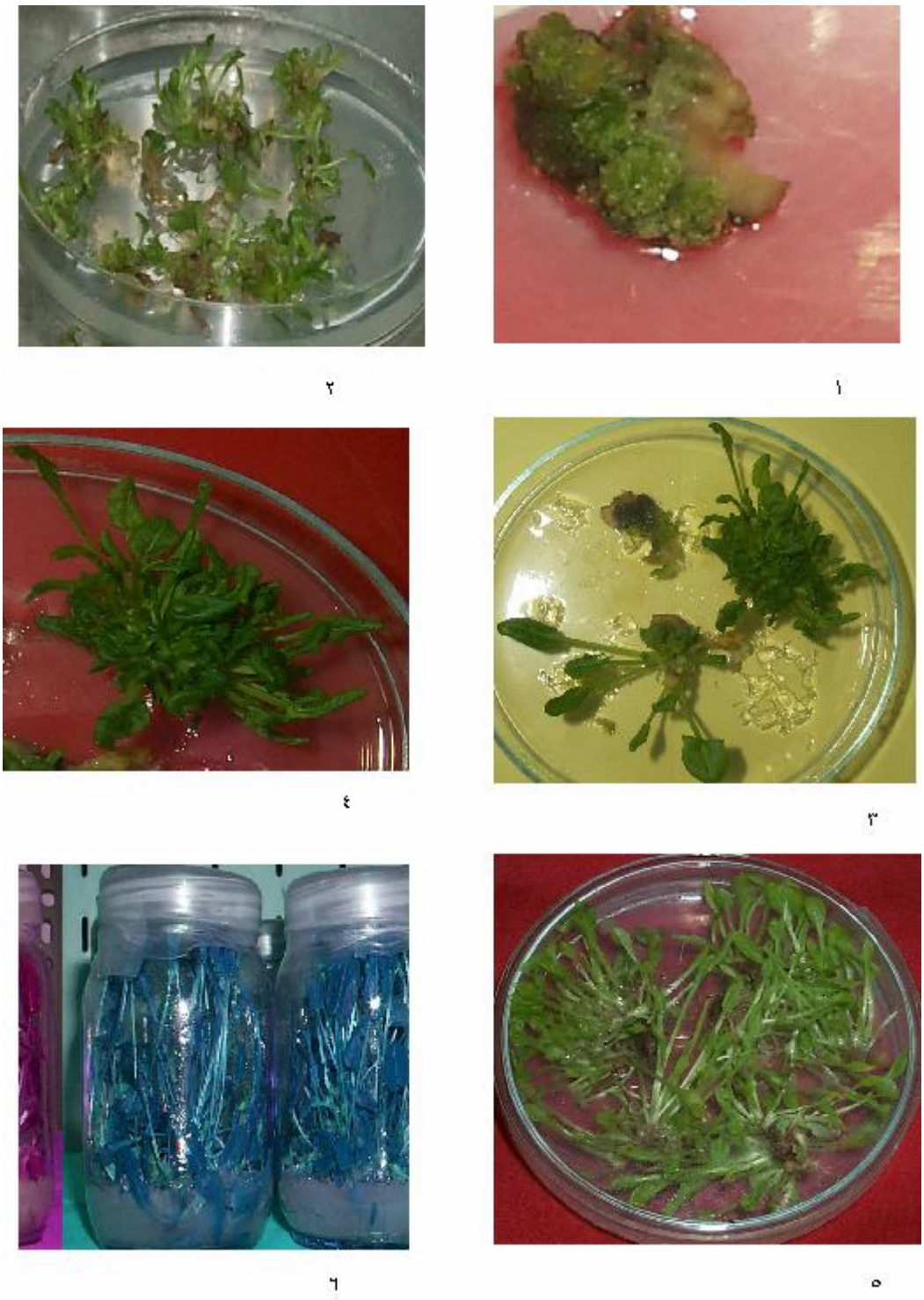
Fig. 1. Comparison of regeneration means for explant (a) and IAA levels (b) Dunkan test (a = 5%)

با توجه به اختلاف بسیار بالادر میزان باززایی ریزنمونه برگ از سایر ریزنمونه‌ها و تعیین سطح بهینه ۰/۷۵ میلیگرم در لیتر جهت هورمون IAA و غیرمعنی‌دار شدن سطوح BAP و ثبت بیشترین درصد باززایی در محیط MS2 نسبت به کلیه محیط کشت‌های مورد مطالعه در این تحقیق ریزنمونه برگ (که به راحتی و همیشه در دسترس می‌باشد) و محیط MS2 به ترتیب به عنوان مناسب‌ترین ریزنمونه ومحیط کشت جهت باززایی گیاه با درصد بالا معرفی می گردد.

مشاهدات میکروسکوپی روند کالوس‌دهی و باززایی از ریزنمونه برگ بر روی محیط کشت مناسب آن یعنی MS2 را مشخص نمود. مقطع بافت برگ (محل اتصال پهنک به دمبرگ) در زمان برش دارای سلول‌های پارانشیمی و دستجات آوندی در مرکز آن مشخص بود. کالوس‌های اولیه که در محل برش بافت برگ تشکیل گردیده بود (نمونه‌های هفته دوم) دارای سلول‌های درشت، نامتمایز با فاصله بین سلولی بالا بودند. در هفته سوم تا چهارم حجم کالوس‌ها گسترش یافته و هسته‌های اولیه سلول‌های فعال با اندازه‌های کوچک و فواصل بین سلولی کمتر مشاهده گردید (شکل ۷، الف) و در برخی از نواحی کالوس دستجات آوندی کاملا تمایز یافته دیده شد. پایان هفته پنجم تا انتهای هفته ششم سلول‌های فعال در بخش‌های میانی کالوس به صورت دوایر متحدالمرکز گسترش یافته ولی سلول‌های حاشیه‌ای حالت نامتمایز را حفظ کرده بودند. نمونه‌های تهیه شده در هفته هفتم گسترش هسته‌های فعال سلولی را به سمت حاشیه کالوس و شکل‌گیری مراحل اولیه آغازی‌های شاخه را از آنها نشان داد (شکل ۷، ب) و در هفته هشتم تا نهم آغازی‌های کامل به صورت منفرد یا تجمعی شکل گرفتند که از آن‌ها یک یا چندین نوساقه به وجود آمد (شکل ۷، پ). نتایج کارآمد این تحقیق امکان انجام انتقال ژن به گیاه فوق را میسر می‌سازد.

www.SID.ir

Archive of SID

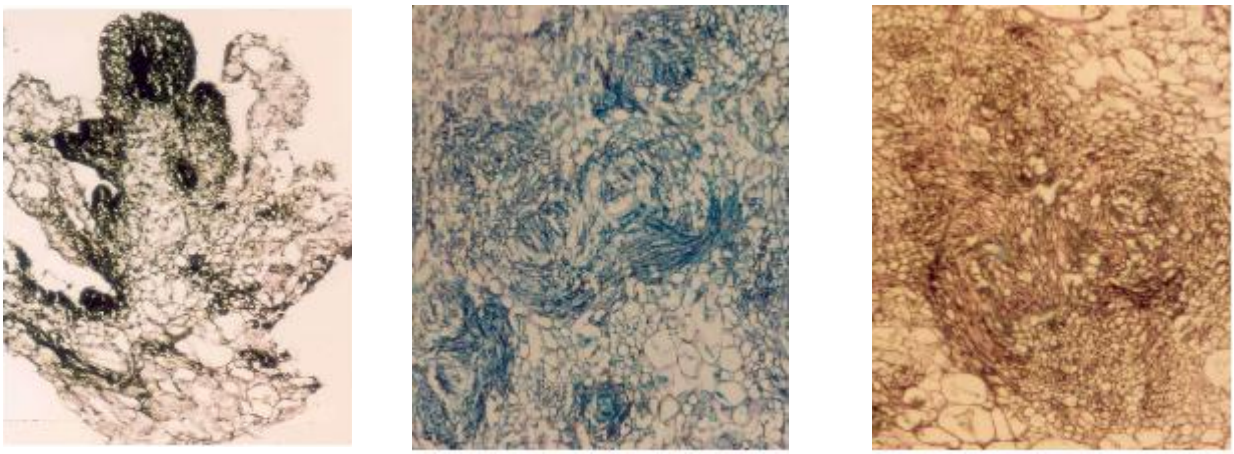


شکل۱ تا ٦: القای کالوس از ریزنمونه برگ (۱)، باززایی از کالوس (۲)، رشد بیشتر نوساقه‌ها (۳)، ایجاد چندین نوساقه (٤)، تکثیر گیاهچه باززایی شده (٥) و انتقال آن به محیط ریشه زایی (٦).

Fig. 1-6: Callus induction from leaf explant (1), Regeneration from callus (2), More growth of the regenerated shoots (3), Proliferation (4), Propagation of a regenerated plant (5) and it's transferring to the root induction medium (6).

www.SID.ir

Archive of SID



c b

شکل ۷- بافت‌شناسی مراحل رشد کالوس و تشکیل آغازی‌های نوساقه.

الف- تشکیل هسته‌های اولیه سلول‌های فعال، ب- گسترش این هسته‌های اولیه و شکل‌گیری آغازی‌های اولیه

پ- ایجاد آغازی‌های نوساقه.

Fig. 7. Histology of callus growth stages and shoot primordial formation, (a) Formation of active cells nuclei, (b) Extension of the nuclei and formation of the first primordial, (c) Formation of shoot primordial.

References

Ainsworth, C., Crossley, S., Buchanan-Wollaston, V., Tangavelu, M., Parker, J. 1995. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. The Plant Cell **7:** 1583-1598.

Ainsworth, C., Parker, J., Buchanan-Wollaston, V. 1998. Sex determination in plants. Current Topics in Developmental Biology **38:** 167-223.

C c پ cic, R., ۱ b ب n of Soma a الف /o development in *Rumex acetosella* L. Plant Cell , Tissue and Organ Cultur. **11:** 133-139.

www.SID.ir

Archive of SID

Culafic, L., Samofalova, A., Nesieovic, M. 1987 b. In Vitro Organogenesis in two dioecious species, *Rumex acetosella* L. and *R. acetosa* L. (Polygonaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture **11:** 125-131.

Parker, J. S. and Clark, M. S. 1991. Dosage sex chromosom system in plants. Plant Science, **80:** 79-92.

Shakib, A. M. 1999. MADS-box genes in sorrel (*Rumex acetosa* L.). Ph.D Thesis, University of London.

www.SID.ir