فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۵، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۲۸۳-۲۷۳ (۱۳۸٦)

مطالعه کشت بافت در گیاه دو پایه ترشک (*Rumex acetosa* L.)

علی‌محمد شکیب[۱]، مانا احمد راجی[۱]، مهناز عروجلو[۱] و علی ایزدی‌دربندی[۲]
۱- مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی- کرج، صندوق پستی: ۳۱۵۳۵-۱۸۹۷، E-mail: a_shakib@abrii.ac.ir
۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد.

چکیده

ترشک (*Rumex acetosa* L.)، به عنوان یک گیاه علفی مرتعی به‌دلیل دو پایه بودن، دارا بودن کروموزومهای جنسی و دوره رشد و نمو کوتاه به‌عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت بکار می‌رود. در این تحقیق قابلیت باززایی ریزنمونه‌های لپه، محور زیرلپه، دمبرگ، برگ و بافت ساقه گل‌دهنده، روی محیط‌های کشت دارای ترکیبات مختلف اکسین و سیتوکینین، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بافتهای کشت شده روی محیط‌های دارای اکسین تنها تولید کالوس نمودند. بافتهای کشت شده روی محیط‌های دارای سیتوکینین‌ها به‌صورت منفرد یا در ترکیب با اکسین‌ها واکنش باززایی نشان دادند. بیشترین میزان باززایی (۱۰۰ درصد) از کشت ریزنمونه‌های ساقه گل‌دهنده روی محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ بدست آمد. بافتهای برگ و دمبرگ پس از ساقه به‌ترتیب ۳۵ و ٤۰ درصد باززایی روی محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و NAA نشان داد. بیشترین تعداد باززایی ساقه به‌ازای هر ریزنمونه ۸ عدد روی محیط حاوی TDZ شمارش گردید. مطالعات بافت‌شناسی از نمونه‌های کشت شده نشان داد که سلولهای مریستمی اطراف بافت آوندی و رشد و گسترش آنها منشأ باززایی ساقه است. ریشه‌زایی روی محیط MS بدون هورمون انجام گرفت و گیاهان باززایی شده پس از انتقال به گلدان رشد نموده و تولید گل‌آذین و پس از گرده‌افشانی تولید بذر نمودند.

واژه‌های کلیدی: ترشک (*Rumex acetosa* L.)، ریزنمونه، کالوس‌دهی، باززایی، کشت بافت و گیاهان دوپایه

مقدمه

ترشک (*Rumex acetosa* L.)، گیاهی علفی و چند ساله از خانواده Polygonaceae است که از طریق رویشی (ریزوم) و زایشی (بذر) می‌تواند ازدیاد گردد. این گیاه گونه‌ای مرتعی است، هرچند واریته‌هایی از آن برای مصارف خوراکی اصلاح شده‌اند. ترشک به‌دلیل چند خصوصیت، مانند دو پایه بودن، دارا بودن کروموزومهای جنسی، تعداد کم کروموزوم و دوره رشد و نمو کوتاه به‌عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ainsworth *et al.*,1995; Parker & Clark, 1991). تعدادی ژن در ارتباط با نمو اعضای گل از این گیاه جداسازی شده است (Ainsworth *et al.*, 1995). هرچند نقش دقیق آنها نیازمند روش مناسب انتقال ژن به ترشک است. انتقال ژن به این گیاه، مستلزم روش مناسب کشت بافت و باززایی گیاه کامل می‌باشد. در زمینه کشت بافت ترشک، اولین گزارش توسط Culafic و همکاران (۱۹۸۷ b) منتشر شد که در آن با استفاده از کشت ریزنمونه‌های جوانه، لپه و

محور زیر لپه روی محیط کشت حاوی هورمونهای 2,4-D، Kin و IAA کالوس تولید شد. این کالوسها عموماً ریشه‌زا بوده و قابلیت باززایی گیاه نداشتند، اما ریزازدیادی با کشت جوانه انتهایی انجام شد. جنین‌زایی رویشی از گونه دیگری به نام *R. acetosella* روی محیط کشت دارای BAP، IAA و ٦ درصد ساکارز بدست آمد (Culafic *et al*., 1987 a). شکیب (۱۹۹۹) واکنش بافتهای مختلف را به اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها بررسی کرد که در آن باززایی روی محیط‌های دارای سیتوکینین و یا در ترکیب با اکسین‌های ضعیف مانند IAA و NAA مشاهده شد. ایزدی و شکیب (۱۳۸۳) استفاده از بافتهای رویشی نظیر لپه، دمبرگ، برگ و ریشه را مورد بررسی قرار دادند که منجر به تولید کالوس و باززایی گیاه از این بافتها شد. در این مطالعه اثرات جداکشت‌های مختلف و ترکیبات هورمونی روی قابلیت باززایی گیاه ترشک گزارش شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی شامل ریزنمونه‌های لپه، محور زیرلپه، دمبرگ، برگ و بافت ساقه گل‌دهنده جدا شده از گیاهان ترشک جهت کشت استفاده گردید. برای ضدعفونی سطحی بافتها از محلول ۲۰ درصد مایع سفید کننده تجاری به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد و سپس سه بار با آب مقطر استریل هر بار به مدت ۲ تا ۳ دقیقه شستشو داده شدند. ریزنمونه‌ها شامل قطعات حدود ۰/۵ سانتیمتری از لپه، محور زیرلپه، برگ، دمبرگ، و ساقه گل‌دهنده جدا و روی محیط‌های کشت قرار داده شدند. محیط‌های کشت شامل محیط پایه MS به‌اضافه اکسین‌های 2,4-D، NAA و IAA به‌ترتیب با غلظت صفر، ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و نیز سیتوکینین‌های BAP، 2iP، Zeatin و Kin به‌ترتیب با غلظت صفر، ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر و TDZ به غلظت ۰/۱ و ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی یا در ترکیب با NAA و IAA به غلظت صفر، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بود. بررسیها در قالب آزمایشهای کاملاً تصادفی دارای ۳ تا ۵ تکرار با ۲۰ قطعه جداکشت در هر تیمار و آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۵ قطعه جداکشت در هر تکرار انجام گرفت. کشتها در شرایط ۲۵ درجه سانتیگراد و ١٦ ساعت نور قرار داده شدند و هر ۵ هفته یکبار واکشت شدند. ارزیابی بر اساس فراوانی باززایی و تعداد باززایی در هر قطعه جداکشت بود. برای بررسیهای بافت‌شناسی نمونه‌گیری از بافتهای کشت شده در فواصل زمانی صفر، ۱۲، ٢٤ و ٣٦ روز در محلول تثبیت کننده (فرمالین: اسید استیک: اتانل به نسبت ۵:۱۵:۸۰) به مدت ۵ روز قرار گرفت. آبگیری در سری اتانل ۵۰ :٦۰:۷۰:۸۰:۹۰: ۱۰۰:۱۰۰ هریک ٢٤ ساعت انجام و سپس در محلول هیستوکلیر(Histoclear) به‌مدت ٢٤ ساعت قرار داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها در پارافین در ٦۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و به‌مدت ۳ روز و هر روز به پارافین تازه جابه‌جا شدند. نمونه‌ها بعد از قالب‌گیری با ضخامت ۷ میکرومتر برش و پس از گذاشتن روی لام با دلافید هماتوکسیلین و ایوسین رنگ‌آمیزی و مورد مشاهده قرار گرفتند. گیاهان باززایی شده روی محیط بدون هورمون ریشه‌دار و به گلدان منتقل و در گلخانه نگهداری شدند.

نتایج

ریزنمونه‌های مختلف کشت شده بر روی محیط‌های دارای 2,4-D، NAA و IAA تولید کالوس در محلهای

برش نمودند. افزایش غلظت اکسین، فراوانی تشکیل کالوس را بیشتر نمود. بالاترین میزان تشکیل کالوس ۱۰۰ درصد (بر اساس تعداد نمونه‌هایی که کالوس تولید نمودند به کل نمونه‌های کشت شده) در غلظت بالاتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بدست آمد. واکنش بافتهای مختلف به تولید کالوس اغلب مشابه و کالوس تولید شده به رنگ زرد روشن و بافت نرم بود. میزان باززایی از کالوس تشکیل شده روی ریزنمونه‌های ساقه روی محیط با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA برابر ۲۵درصد بود. ریشه‌های نابجا روی سطح کلیه بافتهای کشت شده روی محیط دارای NAA و IAA در غلظت بالاتر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ٤ تا ٥ روز پس از کشت ظاهر شدند. این پدیده در محیط‌های دارای 2,4-D ایجاد نشد.

ریزنمونه‌های لپه، محور زیرلپه، دمبرگ و برگ روی محیط دارای ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ در ترکیب با NAA و IAA با غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل کالوس در همه چهار محیط کشت به‌طور ۱۰۰ درصد مشاهده شد. با افزایش میزان سیتوکنین (TDZ) کالوس‌ها رشد بیشتری داشتند. باززایی در ریزنمونه‌های لپه، محور زیرلپه در هیچ یک از محیط‌های کشت رخ نداد. نتایج باززایی از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در جدول ۱ ارائه گردیده است. با توجه به جدول بالاترین درصد باززایی به‌ترتیب از دمبرگ (٤۰٪) روی محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ریزنمونه برگ (۳۵٪) روی محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل گردید.

جدول ۱ – درصد باززایی ساقه از کالوس‌های برگ و دمبرگ در محیط کشت MS حاوی TDZ، IAA و NAA

محیط کشت / ریزنمونه	TDZ (۱ mg/l) و IAA (۰/۷۵ mg/l)	TDZ (۱/۵ mg/l) و IAA (۰/۷۵ mg/l)	TDZ (۱ mg/l) و NAA (۰/۷۵ mg/l)	TDZ (۱/۵ mg/l) و NAA (۰/۷۵ mg/l)
برگ	۳۵	۱۰	٦	٦
دمبرگ	۱۳	۰	٤۰	۱۰

گیاهچه‌های باززایی شده از ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۷۵ میلی‌گرم IAA دارای رشد بطئی و خفیف بودند و با وجود درصد نسبتاً مطلوب باززایی، این محیط شرایط رشدی مناسبی را برای گیاهچه‌ها تأمین نکرد. در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۷۵ میلی‌گرم NAA فراوانی باززایی نسبتاً بالا بود و گیاهچه‌های حاصل نسبت به سایر محیط‌ها، رشدی سریعتر داشتند. تعداد نوساقه‌های حاصل و سرعت باززایی از این ریزنمونه در محیط کشت‌های حاوی NAA نسبت به IAA بیشتر بود.

جدول ۲- اثر نوع ریزنمونه و هورمونهای NAA، IAA و TDZ بر روی باززایی ترشک

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار احتمال
ریزنمونه	۱	۰/ ۰۰۲۲ ns	۰/٤۹۹۱
TDZ	۱	۰/۰۷۳۷ **	۰/۰۰۱۲
ریزنمونه x TDZ	۱	۰/۰۱۱ ns	۰/۱٤۸٤
اکسین	۱	۰/۰۰۲۵ ns	۰/٤۷۹۸
اکسین x ریزنمونه	۱	۰/۰۷۳۷ **	۰/۰۰۱۲
اکسین x TDZ	۱	۰/۰۰ ns	۰/۹٦۹۱
اکسین x ریزنمونه x TDZ	۱	۰/۱۰۰ ****	۰/۰۰۱۲
خطا	۱٦	۰/۰۰٤۸	

R^2 = ۰/۷۱ C.V.=۸/۵۹ %

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

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 اثر ساده نوع اکسین مصرفی (IAA یا NAA) تفاوتی نشان نداد، در حالی‌که اثرات متقابل آنها معنی‌دار شدند، اما سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ فاکتور اصلی و مؤثر 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 مقایسه‌های 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.

در مقابل، قطعات دمبرگ روی محیط‌های دارای BAP، 2iP و Zeatin به تنهایی یا در ترکیب با NAA و IAA تا ۳٦ درصد باززایی نشان دادند. تعداد ۱ تا ۲ جوانه بر روی هر ریزنمونه تولید شد. کالوس سبز روشن با بافت سفت در محلهای برش و قاعده بافت سه هفته پس از کشت تشکیل شد. قابلیت باززایی تا ۳ واکشت دیده شد. تفاوت معنی‌داری بین قابلیت باززایی بین تیمارهای دارای ۲ و ۵ میلی‌گرم در لیتر سیتوکنین دیده نشد (جدول ۳). افزایش سیتوکنین زمان باززایی را به تأخیر انداخت. همه ترکیبات NAA و IAA با سیتوکنین‌ها باززایی را القا نمود.

ریزنمونه‌های دمبرگ روی محیط دارای صفر تا ۵ میلی‌گرم BAP، 2iP و Zeatin به تنهایی یا در ترکیب با ۰/۰۱ – ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و IAA تولید کالوس نمودند. از این کالوس‌ها باززایی با فراوانی ۳۰ تا ۳۳ درصد صورت گرفت (جدول ٤). تفاوت معنی‌داری بین سیتوکنین‌ها و غلظتهای مختلف دیده نشد. اضافه کردن NAA و IAA به محیط‌های دارای سیتوکنین‌ها اثر معنی‌داری نشان ندادند (جدول ٤). در بعضی مواقع باززایی

مستقیم بدون کالوس از قسمت بالایی ریزنمونه روی محیط‌های حاوی BAP و TDZ صورت گرفت. بالاترین فراوانی باززایی (۱۰۰ درصد) از کشت ریزنمونه ساقه روی محیط‌های دارای TDZ مشاهده شد (جدول ۵). بیشترین تعداد از هر قطعه (۸/۸ عدد) بر روی محیط کشت حاوی TDZ تولید شد (جدول ۵). ساختارهای جوانه ساقه در سطح قطعه کشت شده ۳ هفته پس از کشت پدیدار شد (شکل ۱). این ساختارها ابتدا ایجاد بافتهای برگ مانند نمود و برگهای حقیقی ۳ هفته بعد بوجود آمد. ساقه‌های باززایی شده در مدت ٦ تا ۸ هفته به ۲ تا ۳ سانتیمتر رسید که قابل جدا سازی از بافت اولیه و انتقال به محیط ریشه‌زایی بود (شکل ۱).

جدول ۳- اثر غلظتهای مختلف و انواع متفاوت هورمونها (2iP، BAP و Zeatin) بر باززایی از دمبرگ

سیتوکینین	غلظت میلی‌گرم در لیتر	درصد باززایی
2iP	۲	۳۳/۳ ±۱/٦۷
	۵	۳٦/٦ ±۳/۳
BAP	۲	۳۰ ±۲/۸۹
	۵	۳۱/٦ ±۳/۳۳
Zeatin	۲	۳۳/۳ ±۱/٦۷
	۵	۳٦/٦ ±۳/۳

اعداد جدول زیر میانگین ± SE با ۳ تکرار و هریک با ۲۰ ریزنمونه می‌باشد. در سطح P<۰/۰۵ تفاوت بین تیمارها معنی‌دار نیست.

جدول ٤- اثر غلظتهای متفاوت و انواع مختلف هورمون (2ip، BAP و Zeatin) در ترکیب با IAA و NAA بر باززایی از دمبرگ

سیتوکینین	NAA(mg/l)	IAA(mg/l)	درصد قطعات باززایی
2iP 2(mg/l)	۰/۰۱	-	۳۳/۳± ۱/٦۷
	۰/۱	-	۳۳/۳± ۳/۳۳
	-	۰/۰۱	۳۰ ± ۲/۸۹
	-	۰/۱	۳۱/۳± ۱/٦۷
BAP 2 (mg/l)	۰/۰۱	-	۳۳/۳± ۱/٦۷
	۰/۱	-	۳۱/٦± ۱/٦۷
	-	۰/۰۱	۳۱/٦۷± ۱/٦۷
	-	۰/۱	۳۳/۳± ۳/۳۳
Zeatin 2 (mg/l)	۰/۰۱	-	۳۱/٦± ۱/٦۷
	۰/۱	-	۳۰ ± ۲/۸۹
	-	۰/۰۱	۳۱/٦± ۱/٦۷
	-	۰/۱	۳۰ ± ۲/۸٦

اعداد جدول میانگین±SE با ۳ تکرار هریک با ۲۰ قطعه می‌باشد. در سطح P<۰/۰۵ تفاوت بین تیمارها معنی‌دار نیست.

جدول ۵- اثر غلظتهای مختلف سیتوکینین بر باززایی از قطعات ساقه

سیتوکینین (mg/l)		درصد باززایی	میانگین تعداد ساقه به‌ازای هر قطعه
TDZ	۰	۳۱/٦± ٤/٤a	۱/۸ ± ۰/۱ c
	۰/۱	۱۰۰ ± ۰ a	٤ ± ۰/۵۷ b
	۱	۱۰۰ ± ۰ a	۸/۸ ± ۰/۰۱ a
2iP	۲	۹۸/۳ ± ۱/٦۷ a	۵/۸ ± ۰/۱۵ bc
	۵	۹۵ ± ۲/۸۹ a	۵/۹ ± ۰/۱٤ bc
BAP	۲	۹۵ ± ۲/۸۹ a	۵/۷ ± ۰/۰۵ bc
	۵	۹۵ ± ۲/۸۹ a	۵/۸ ± ۰/۱۷ bc
Zeatin	۲	۹۵ ± ۲/۸۹ a	۵/۸ ± ۰/۱۷ bc
	۵	۹۵ ± ۲/۸۹ a	۵/۸ ± ۰/۱۵ bc
Kinetin	۲	۳٦/٦ ± ۱/٦۷ b	۲/٦ ± ۰/۱۵ c

اعداد جدول میانگین ± SE با ۳ تکرار هریک با ۲۰ ریزنمونه می‌باشد. اعداد با حروف مختلف، تفاوت معنی‌داری در سطح P< ۰/۰۱ دارند.

اثر ترکیب سیتوکینین‌ها و NAA بر باززایی در جدول ٦ آورده شده است. تفاوت بین TDZ، 2iP، Zeatin و BAP در ترکیب با NAA تفاوت معنی‌داری بجز TDZ با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نشان نداد. نتایج مشابه‌ای نیز برای تعداد جوانه باززایی شده از هر ریزنمونه مشاهده شد. بررسیهای بافت‌شناسی نشان داد که بافتهای کالوس تولید شده روی ترکیبات حاوی 2,4-D از واحدهای دانه مانند تشکیل شده است که سلولهای غیر مریستمی در مرکز و اطراف آنها را سلولهای مریستمی فرا گرفته است. ساختارهای جوانه ساقه روی سطح برش یافته قطعات کشت شده پس از حدود ۳ هفته ظاهر شد. این ساختارها ابتدا بافتهای برگ مانند و سپس برگهای حقیقی را ظرف ۳ تا٤ هفته تشکیل دادند. این ساقه‌ها، حدود ٦ تا ۷ هفته از آغاز کشت به اندازه ۲ تا ۳ سانتیمتر رسیدند، از بافت اولیه ریزنمونه و کالوس جدا و برای ریشه‌زایی به محیط بدون هورمون انتقال یافتند.

جدول ٦- اثرات غلظتهای مختلف سیتوکینین، در ترکیب با NAA بر باززایی قطعات ساقه

سیتوکینین (mg/l)		NAA (mg/l)	درصد باززایی	میانگین تعداد ساقه به‌ازای هر قطعه
TDZ		۰/۱	۲۵ ± ۲/۸۹ c	۱/۷ ± ۰/۱ c
	۰/۱	۰/۱	٦۰ ± ۵ b	۱/۹ ± ۰/۱۱ c
	۱	۰/۱	۸٦/٦ ± ۳/۳ a	٤/۱ ± ۰/۱۱a
2iP	۲	۰/۱	۵۳/۳ ± ٤/٤ b	۳/۹٦ ± ۰/۰۸ ab
	۵	۰/۱	۵۰ ± ۲/۸۹ b	۳/۹٦ ± ۰/۰۸ ab
Zeatin	۲	۰/۱	۵۱ ± ٤/٤ b	۳/۹ ± ۰/۱ ab
	۵	۰/۱	۵۵ ± ۲/۸۹ b	۳/۹٦ ± ۰/۱۲ ab
BAP	۲	۰/۱	۵۱/٦ ± ٤/٤ b	۳/٦ ± ۰/۱ b
	۵	۰/۱	۵۸/۳ ± ۱/۷٦ b	۳/٦٦ ± ۰/۰٦ ab

اعداد جدول میانگین ± SE با ۳ تکرار هریک با ۲۰ ریزنمونه می‌باشد. اعداد با حروف مختلف، تفاوت معنی‌داری در سطح P< ۰/۰۱ دارند.

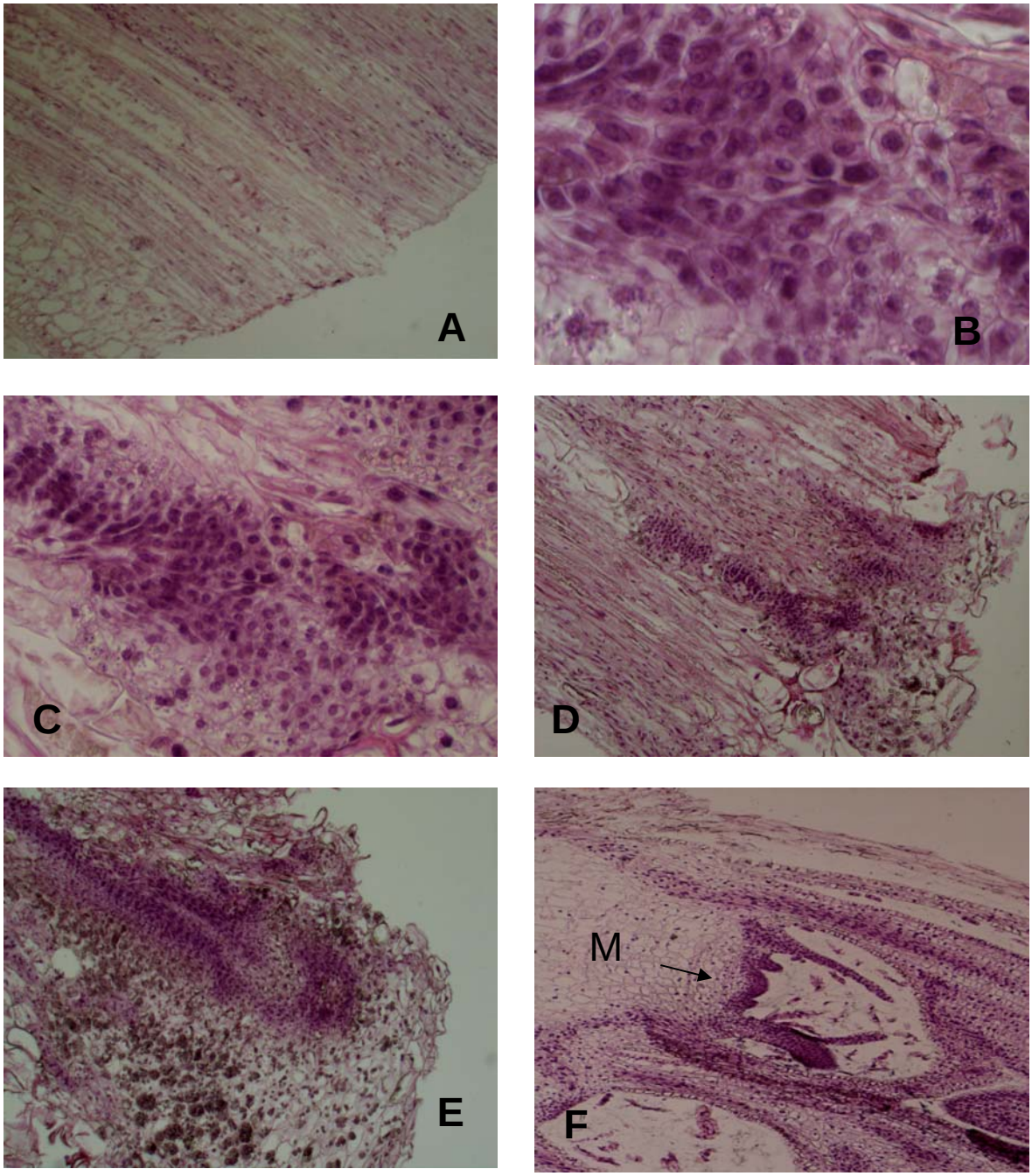
مشاهده‌های بافت‌شناسی نشان داد که جوانه‌های ساقه از سلولهای مریستمی واقع در منطقه بافت آوندی منشأ گرفت (شکل ۲ -A). این سلولها پس از تقسیمات متوالی، تولید توده‌ای از سلولهای فعال با هسته بزرگ را نمود که در رنگ‌آمیزی پر رنگ بودند. این توده سلولی به سمت انتهای بالایی قطعه جداکشت رشد نموده و تولید ساختارهای جوانه‌های ساقه نمودند (شکل ۲ -D). در این مرحله ساختارهای جوانه قابل رؤیت روی سطح قطعه بودند (شکل ۲ -E). این ساختارها سپس سازمان یافته و تشکیل جوانه ساقه با مریستم انتهایی و پیش آغازی برگ نمودند (شکل ۲ -F). شاخه‌های باززایی شده پس از انتقال به محیط بدون هورمون در مدت ۵ هفته ریشه تولید کردند. گیاهان ریشه‌دار شده به مخلوط ورمی‌کولیت منتقل و پس از دو هفته سازگاری، به گلدان انتقال یافتند. گیاهان تا مرحله تولید گل‌آذین و تولید بذر، در گلخانه نگهداری شدند (شکل ۱-F).

بحث

باززایی گیاه در ترشک با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف گزارش شده است. اولین گزارشها در این زمینه توسط Culafic و همکاران (b ۱۹۸۷) روی دو گونه ترشک منتشر شد که در گونه *R. acetocella* باززایی گیاه از طریق جنین زایی رویشی بدست آمد اما در گونه *R. acetosa* باززایی تنها از طریق رشد جوانه‌ها روی محیط دارای BAP و Kin مشاهده شد. گیاهچه‌های حاصل بخوبی قادر به ریشه زایی نبوده و در تیمار با IBA حدود ۲۰ درصد ریشه‌زایی نشان دادند. شکیب اثر اکسین‌ها و سیتوکینین‌های مختلف را روی بافتهای برگ و دمبرگ مورد بررسی قرار داد که در آن اکسین‌ها عموماً تولید کالوس نمودند، اما قابلیت باززایی آنها خیلی پایین بود. بافتها روی محیط‌های کشت دارای اکسین‌های ضعیف مانند، IAA و NAA اندامهای ریشه مانند تولید نمودند. بافتهای برگ و دمبرگ روی محیط‌های کشت دارای BAP، kin و Zeatin (۲ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر) تا ۳۰ درصد باززایی داشتند. ایزدی و شکیب (۱۳۸۳) قابلیت بافتهای ریشه، محور زیر لپه، لپه، برگ و دمبرگ را با استفاده ترکیبات مختلف اکسین و سیتوکینین (غلظتهای مختلف BAP و IAA) مورد بررسی قرار دادند. بافتهای ریشه، محور زیر لپه، لپه واکنش مناسبی نشان ندادند، اما قابلیت باززایی از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ روی محیط دارای BAP و IAA (به‌ترتیب ۱/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر) به‌ترتیب ۳۵ و ٤۰ درصد بود. گیاهچه‌های حاصل در واکشت‌های بعدی روی همین محیط، قابلیت پرآوری از طریق رشد جوانه‌های جانبی نشان دادند که برای تکثیر قابل استفاده است. در تحقیق حاضر، بیشترین باززایی از ریزنمونه ساقه گل‌دهنده (۱۰۰ درصد) بدست آمد. هرچند دسترسی به ساقه تنها در زمان ایجاد ساقه گل‌دهنده مقدور است که نیازمند شرایط مناسب برای سرمادهی و روز بلند است. در شرایط مناسب، ۱۰۰ درصد ریزنمونه‌ها باززایی نمودند و با فراوانی بیش از ۸ جوانه باززایی شده به‌ازای هر ریزنمونه کشت شده داشتند. سیتوکینین‌ها ایجاد باززایی در ریزنمونه‌های مختلف را تسریع و تسهیل نمودند. اما تفاوت معنی‌داری در کارایی آنها وجود داشت. هورمونهای 2iP، BAP و Zeatin اثرات مشابه نشان دادند. معمولاً ۲ میلی‌گرم در لیتر از این هورمونها برای باززایی مناسب بود. در حالی‌که Kin کمترین اثر بر میزان باززایی را نشان داد، ولی TDZ بیشترین کارایی در باززایی داشت. مشاهده‌های بافت‌شناسی نشان داد که ساقه‌های باززایی

شده از سلولهای مریستمی اطراف بافت آوندی احتمالاً از سلولهای کامبیوم منشأ گرفته بود. ساقه‌های بازززایی شده بخوبی روی محیط بدون هورمون ریشه‌دار شده و پس از انتقال به خاک مستقر شدند. با توجه به این نتایج، امکان بازززایی گیاه ترشک از بافتهای مختلف در زمان رشد رویشی و زایشی وجود دارد.

شکل ۱- تولید کالوس و بازززایی در گیاه ترشک. (A) تولید کالوس و بازززایی جوانه از قطعه جدا کشت برگ، (B و C) جوانه بازززایی شده از جدا کشت ساقه، (D) ریشه‌زایی در گیاه بازززایی شده، (E) رشد گیاهان بازززایی شده پس از انتقال به خاک و (F) تولید بذر از گیاهان بازززایی شده.



شکل ۲- بافت‌شناسی مراحل باززایی گیاه، در ترشک. (A) برش ساقه در زمان قبل از کشت، (B و C) فعال شدن سلولهای مریستمی، ۱۲ روز پس از کشت روی محیط باززایی، (D) ایجاد هسته‌های اولیه نمو پیش جوانه، (E) رشد پیش‌جوانه و (F) ایجاد جوانه‌های در حال باززایی با ایجاد مریستم انتهایی جوانه (M).

منابع مورد استفاده

ایزدی دربندی، ع. و شکیب، ع. م.، ۱۳۸۳. باززایی گیاهچه با فراوانی بالا در گیاه دوپایه ترشک. مجله علوم زراعی ایران، ٦ (۲): ۱۷۱-۱۷۹.

Ainsworth, C., Crossley, S., Buchanan-Wollaston, V., Tangavelu, M. and 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.

Culafic, L., Budimir, S., Vujicic, R. and Nelskovic, M., 1987a. Induction of somatic embryogenesis and embryo development in *Rumex acetosella* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 11: 133-139.

Culafic, L., Samofalova, A. and Nesieovic, M., 1987b. *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.

Study of tissue culture in dioecious sorrel

A.M. Shakib[1], M. Ahmad-Raji[1], M. Orujloo[1] and A. Izadi-Darbandi[2]

1- Agricultural Biotechnology Research Institute, Iran. E-mail: a_shakib@abrii.ac.ir
2- College of Agriculture, Shahed University.

Abstract

Sorrel (*Rumex acetosa* L.) is a perennial species, being used as a model plant in molecular genetic studies of sex determination, because of several characteristics such as dioecy, sex chromosomes and short life cycle it is In this study regeneration potentials of different tissues such as cotyledon, hypocotyl, leaf, petiole and flowering stem cultured on media containing different cytokinin and auxins combinations are presented. The results showed callus induction in cultured tissues on media containing auxins. Tissues cultured on media containing cytokinins alone or in combinations with auxins showed regeneration response. The highest regeneration rate 100% was obtained from stem segments cultured on medium containing 1 mg/l TDZ. Leaf and petiole after stem had regeneration rate of 35% and 40 % on medium containing 1 mg/l TDZ and 0.75 mg/l IAA and NAA. The highest number of regenerants per explant was 8.8 using stem segments cultured on medium containing TDZ. Histological observations showed that regenerated shoots originated from the cells in the area of the vascular tissues. Regenerated shoots rooted on medium without hormone and plants produced seeds after growth in glasshouse conditions.

Key words: Sorrel (*Rumex acetosa* L), explant, callus induction and regeneration tissue culture**.**