

High frequency plantlet regeneration in the dioecious plant sorrel

علی ایزدی دربندی^۱ و علی محمد شکیب^۲

Polygonaceae

(*Rumex acetosa L.*)

MS

(IAA)

/

(Kin)

(TDZ)

(BAP)

(Zeatin)

(NAA)

IAA BAP

(GA₃)

BAP

/ IAA

/

(MS)

(Proliferation)

(*Rumex acetosa L.*)

به عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنتیکی و مولکولی تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گیرد (Ainsworth et al., 1998; Parker et al., 1991). تا کنون 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 پذیرش: ۱۳۸۳/۳/۱۰

ترشک با نام علمی (*Rumex acetosa L.*) گیاهی علفی و دوپایه از خانواده پلی گوناسه است که از طریق رویشی (ریزوم) و زایشی (بذر) می‌تواند از دیاد گردد. ویژگی‌های این گیاه از جمله تعداد کم کروموزم، دوپایه بودن، وجود کروموزم‌های جنسی و کوتاه بودن دوره رشد و نمو موجب شده است تا

تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۳/۲۱

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

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. ریزنمونه ها شامل برگ، دمبرگ، لپه، محور زیرلپه و ریشه از گیاهچه های حاصل انتخاب شدند. آزمایش ها تعیین مناسب ترین نوع ریزنمونه و محیط کشت باززایی گیاه به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (سه پتری دیش شیشه ای $9 \times 1/5$ سانتیمتر) و پنج ریزنمونه در هر پتری دیش انجام گردید. به این ترتیب واکنش کالوس دهی و باززایی بافت های گیاهی در طی چهار آزمایش روی محیط کشت یادشده با ترکیبات هورمونی متفاوت به شرح زیر بررسی گردید. تجزیه واریانس داده ها نیز پس از تبدیل آن ها ($0.5 + x^{0.5}$) انجام گرفت.

کشت ریزنمونه ها در محیط کشت حاوی ایندول-۳-استیک اسید (IAA) با سه غلظت ۷۵/۰ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر و کینتین (Kin) با دو غلظت ۱/۰ و ۲/۰ میلی گرم در لیتر.

کشت ریزنمونه ها در محیط کشت:

حاوی IAA با دو غلظت صفر و ۰/۰ میلی گرم در لیتر و ز آتین (Zeatin) با دو غلظت صفر و یک میلی گرم در لیتر.

کشت ریزنمونه ها در چهار محیط:

کشت زیر حاوی اکسین های IAA یا آلفا- نفتالین استیک اسید (NAA) با غلظت ۷۵/۰ میلی گرم در لیتر و سیتوکینین تیدیازارون (TDZ) با غلظت های ۱ و ۱/۰ میلی گرم در لیتر. در این آزمایش ریزنمونه نوک ساقه (Shoot - apex) نیز به همراه بخشی از بافت های اطراف آن کشت گردید.

محیط TI1: حاوی ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر IAA و ۱ میلی گرم در لیتر TDZ.

محیط TI2: حاوی ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر IAA و ۱/۰ میلی گرم در لیتر TDZ.

محیط TN1: حاوی ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر TDZ.

نیازمند روش مناسب کشت بافت و باززایی گیاه می باشد. 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 هیپو کوتیل روی محیط کشت حاوی هورمون های ۴، ۲- دی کلروفونوکسی استیک اسید (2,4-D) و کینتین (Kin) و ایندول-۳- استیک اسید (IAA) کالوس تولید شده است که این کالوس ها عموماً ریشه زا بوده و گیاه باززایی نشد اما ریزازدیادی با کشت جوانه انتهایی انجام شد. اندام زایی از کالوس های حاصل از جوانه های جانبی از گونه دیگری به نام *R. acetosella* توسط همین نویسنده گزارش گردید. جنبه های رویشی از این کالوس ها در محیط کشت دارای BAP، IAA و ۶ درصد ساکارز به دست آمد (Culafic et al., 1987 a). باززایی و تولید گیاه از طریق کشت قطعات ساقه های گلدهنده توسط شکیب (Shakib, 1999) گزارش گردیده است ولی استفاده از این بافت ها مستلزم شرایط مناسب از نظر درجه حرارت پایین (سرما) و دوره نوری (روز بلند) برای تحریک و رشد ساقه های گلدهنده می باشد. لذا استفاده از بافت های رویشی (نظیر برگ) که به راحتی در دسترس می باشند، بسیار مطلوب است. در این مطالعه نتایج پیشرفت در روش باززایی گیاه با استفاده از بافت های رویشی گزارش می گردد.

بذور حاصل از تلاقی یک رقم اصلاح شده ترشک (که تنها تولید پایه های ماده می نماید) و تیپ وحشی آن (به عنوان پایه نر) ضد عفونی سطحی گردید. برای این منظور ابتدا بذور را با آب مقطر استریل ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتیگراد شستشو داده و سپس ۲۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد و ۲۰ دقیقه در محلول ۲/۵ درصد هیپو کلریت سدیم تجاری (۵ درصد) قرار گرفتند که پس از هر

رعايت حالت افقی و عمودی به ترتیب برای برش های طولی و عرضی درون پارافین در داخل مکعب های کاغذی انجام شد. از نمونه های قالب گیری شده با دستگاه میکروتوم و زاویه برش ۱۰ درجه، برش های ۱۰ میکرومتری تهیه شد. نمونه های حاضر پس از شستشو با گزیلول، نسبت متعادل گزیلول اتانل و آبدهی با سری اتانل ۱۰۰ تا ۲۵ درجه با هماتوکسیلین دلافیلد جهت رنگ آمیزی هسته ها به مدت ۱۵ دقیقه تیمار شدند. این نمونه ها پس از آبگیری مجدد با سری اتانل ۲۵ تا ۹۶ درجه با فاست گرین به مدت ۲۰ تا ۶۰ ثانیه رنگ آمیزی شدند. مشاهده نهایی پس از شستشو متواالی با الكل مطلق، نسبت متعادل الكل : گزیلول و گزیلول خالص انجام شد. با این روش رنگ آمیزی، هسته، هستک قرمز رنگ می شود و دیگر قسمت های سلول سبز رنگ می گردد. نگهداری درازمدت از طریق ریختن یک قطره کانادابالزال و خشک کردن آن ممکن می گردد. مشاهدات میکروسکوپی بر روی نمونه های تهیه شده از مراحل مختلف القای کالوس، توسعه آن، تشکیل هسته های اولیه سلول های فعل، شکل گیری آغازی های اولیه و تبدیل به جوانه نوساقه صورت گرفت.

: در این آزمایش ریزنمونه های مختلف

تمایل ضعیفی به کالوس دهی نشان دادند ولی ریشه زایی در همه آن ها مشاهده گردید و باززایی از این نمونه ها به دست نیامد.

: در این آزمایش ریزنمونه های ریشه

تولید تعداد زیادی ریشه جانبی گردند. ریزنمونه های لپه و محور زیر لپه تمایل ضعیفی به کالوس دهی داشتند ولی بعد از چهار هفته رشد آن ها متوقف گردید و تیره و نارنجی رنگ شدند. ریزنمونه های برگ و دمبرگ همگی کالوس تشکیل دادند. از این ریزنمونه ها پس از نه هفته کالوس های بزرگی تشکیل شد که درصد باززایی از کالوس های تولید شده در محیط کشت حاوی IAA و

محیط 2: حاوی ۷۵ میلیگرم در لیتر NAA و ۱۵ میلیگرم در لیتر TDZ.

: کشت ریزنمونه ها در چهار محیط کشت زیر حاوی IAA با سه غلظت ۰/۰، ۷۵/۵ و ۱ میلیگرم در لیتر و ۶-بنزیل آمینو پورین (BAP) با دو غلظت ۱/۵ و ۲/۵ میلیگرم در لیتر.

محیط 1: MS1: حاوی ۰/۵ میلیگرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلیگرم در لیتر BAP.

محیط 2: MS2: حاوی ۷۵ میلیگرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلیگرم در لیتر BAP.

محیط 3: MS3: حاوی ۱ میلیگرم در لیتر IAA و ۱/۵ میلیگرم در لیتر BAP.

محیط 4: MS4: حاوی ۱ میلیگرم در لیتر IAA و ۲/۵ میلیگرم در لیتر BAP.

کشت ها در شرایط ۲۵ درجه سانتیگراد و روشنایی ۱۶ 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 کالوس دهی و باززایی و درصد باززایی ریزنمونه ها از هفته پنجم به بعد ارزیابی شدند. درصد نهایی باززایی از ریزنمونه ها در هفته نهم ثبت گردید. گیاهان باززایی شده برای تولید ریشه به محیط MS فاقد هورمون منتقل شدند.

به منظور مشاهده میکروسکوپی روند تغییرات ایجاد شده در جدا کشت برگ روی محیط کشت MS2 از زمان کشت، تولید کالوس تا باززایی گیاهچه آن، نمونه گیری از بافت های کشت شده آن در زمان های متفاوت (هفته اول تا نهم) انجام گرفت. نمونه ها در محلول تثیت کننده FAA (شامل ۹۰ درصد الكل ۵۰ درجه، ۵ درصد اسید استیک گلاسیال و ۵ درصد فرمالین) به مدت ۲۴ ساعت و در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از آبگیری با سری اتانل ۲۵ تا ۱۰۰ درجه، نمونه ها در گزیلول قرار گرفتند و سپس درون پارافین ذوب شده و در آون ۵۸ درجه تیمار شدند. قالب گیری با

سیتوکتین TDZ کاللوس‌ها رشد بیشتری داشتند. ریزنمونه ریشه مثل آزمایشات قبل هیچ پاسخی به کاللوس‌دهی 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.

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

در این آزمایش ریزنمونه‌های گیاهی در محیط‌های کشت واکنش‌های متفاوت کاللوس‌دهی و باززایی نشان دادند.

ریزنمونه‌های لپه، محور زیرلپه، دمبرگ و برگ در همه چهار محیط کشت بطور ۱۰۰ درصد کاللوس تشکیل دادند. البته میزان رشد کاللوس‌ها در محیط‌های حاوی IAA نسبت به محیط‌های حاوی NAA بیشتر بود و کاللوس‌های بزرگتری تشکیل شدند. با افزایش میزان

جدول ۱- درصد باززایی نوساقه از کاللوس‌های 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

رشدی مناسبی را برای گیاهچه‌ها تأمین نکرد. در محیط کشت TI1 فراوانی باززایی نسبتاً بالا بود و گیاهچه‌های حاصل نسبت به سایر محیط‌ها رشد سریع تری داشتند که

گیاهچه‌های باززا شده از ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت TN1 دارای رشد بطئی و خفیف بودند، و با وجود درصد نسبتاً مطلوب باززایی، این محیط شرایط

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

Table 2. Effect of explants and hormones 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.

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 سه گانه و دو گانه اکسین در ریزنمونه، به منظور تعیین بهترین اثر متقابل سه گانه، 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 سه گانه شامل جداکشت برگ با یک میلیگرم در لیتر IAA و یک میلیگرم در لیتر TDZ تغیین گردید.

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.

چندین نوساقه نیز به وجود آورdenد. 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 زیارت‌دیادی 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 سیتوکین TDZ، اثر متقابل سه گانه 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 اثرباره نوع اکسین مصرفی (NAA یا IAA) تفاوتی نشان نداد در حالی که اثرات

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

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

Medium Explant	محیط کشت ریزنمونه	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

قسمت بالای آن (نzdیک لپه) تشکیل گردید و بیشترین درصد باززایی (۲۵٪) در محیط کشت MS1 بود. نمونه‌های باززا شده در محیط MS4 با 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 پهنه ک به دمبرگ (تجمع رگبرگ‌ها) صورت گرفت (شکل های ۱ تا ۶). بیشترین درصد باززایی (۸۱٪) در محیط MS2 دیده شد که از هر ریزنمونه چندین شاخه باززا به وجود

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 زیرلپه، کالوس‌ها از

GA₃ به محیط MS2 تأثیری در کالوس دهی ریزنمونه های برگ ندارد ولی افزایش میزان ساکاراز از ۲ به ۳ درصد موجب کاهش تشکیل و رشد کالوس ها شد.

آمد. محیط MS3 نیز با درصد باززایی ۶۳٪ در مرحله بعدی قرار گرفت که تعدادی از نمونه های باززایی شده آن نیز دارای چندین شاخه باززا بودند. آزمایش نشان داد که افروden/۰.۵ میلیگرم در لیتر

جدول ۴- اثر ریزنمونه، IAA و BAP در باززایی

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

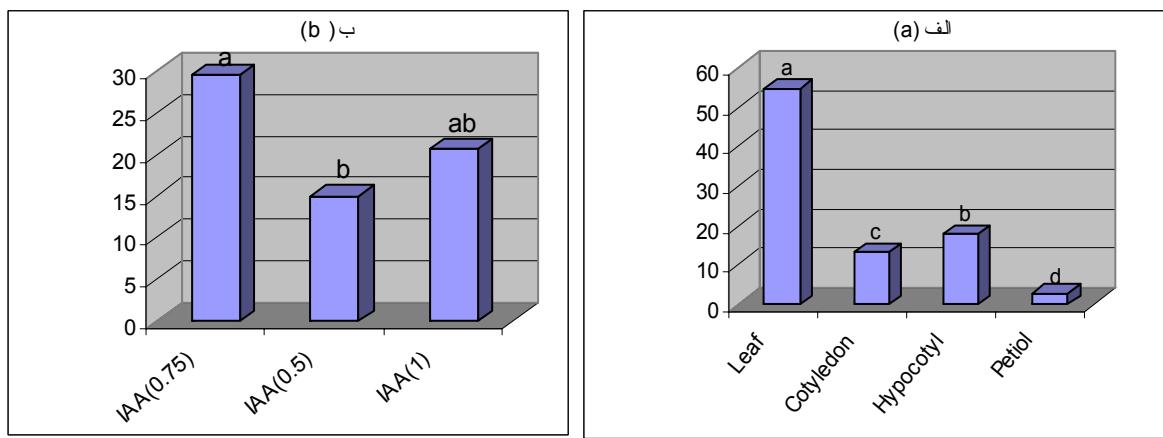
S. O. V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربوط MS	مقدار احتمال prob.value
Explant	ریزنمونه	3	0.56**	0.0001
IAA		2	0.0461*	0.0267
EXP x IAA		6	0.0369*	0.013
BAP		1	0.0004 ns	0.8531
EXP x BAP		3	0.0524**	0.0085
Error	خطا	32	0.0113	
$R^2 = 0.71$		C.V. = 8.59%		

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

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

MS2 تعیین گردید. میزان باززایی ریزنمونه لپه در محیط کشت های ۲ و MS4 و MS2 اختلاف معنی داری نداشتند، ولی باززایی بین این ها با دو محیط کشت دیگر اختلاف معنی دار نشان داد. در نهایت بر اساس گروه بندی دانکن و حداکثر باززایی ثبت شده مناسب ترین اثر متقابل این ریزنمونه مانند ریزنمونه برگ در محیط کشت MS2 بود. با توجه به معنی دار شدن اثرات اصلی عامل های ریزنمونه و IAA آزمون مقایسه میانگین دانکن (نمودار ۱) برای سطوح (غیر تصادفی) عامل های ریزنمونه و IAA انجام شد. نتایج نشان داد که بین میانگین باززایی ریزنمونه ها در کلیه تیمارها اختلاف معنی داری 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 معنی داری بود در حالی که بین این سطوح و سطح یک میلیگرم در لیتر اختلاف معنی داری دیده نشد.

نتایج تجزیه واریانس میزان باززایی از ریزنمونه های مختلف روی ترکیبات مختلف هورمونی (جدول ۴) نشان داد که بین ریزنمونه ها اختلاف بسیار معنی داری وجود دارد و اثرات متقابل این عامل با هورمون های IAA و BAP نیز معنی دار گردید. سطوح عامل BAP اختلافی نشان ندادند در حالی که سطوح عامل IAA در سطح ۵ درصد معنی دار گردید. با توجه به معنی دار شدن اثرات متقابل دو گانه، مقایسات مستقل، برای هر یک از ریزنمونه ها در چهار محیط کشت انجام گرفت و گروه بندی بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد برای هر آزمایش به دست آمد. نتایج نشان داد که میزان باززایی ریزنمونه های دمبرگ و محور زیرلپه در همه محیط های کشت اختلاف معنی داری نداشتند، همچنین میزان باززایی ریزنمونه برگ در محیط های کشت MS2 و MS3 اختلاف معنی داری نداشتند، اما باززایی در MS2 و MS4 اختلاف معنی دار داشت. در نتیجه با MS1 و MS4 اختلاف معنی دار داشت. در نتیجه مناسب ترین اثر متقابل ریزنمونه برگ در محیط کشت



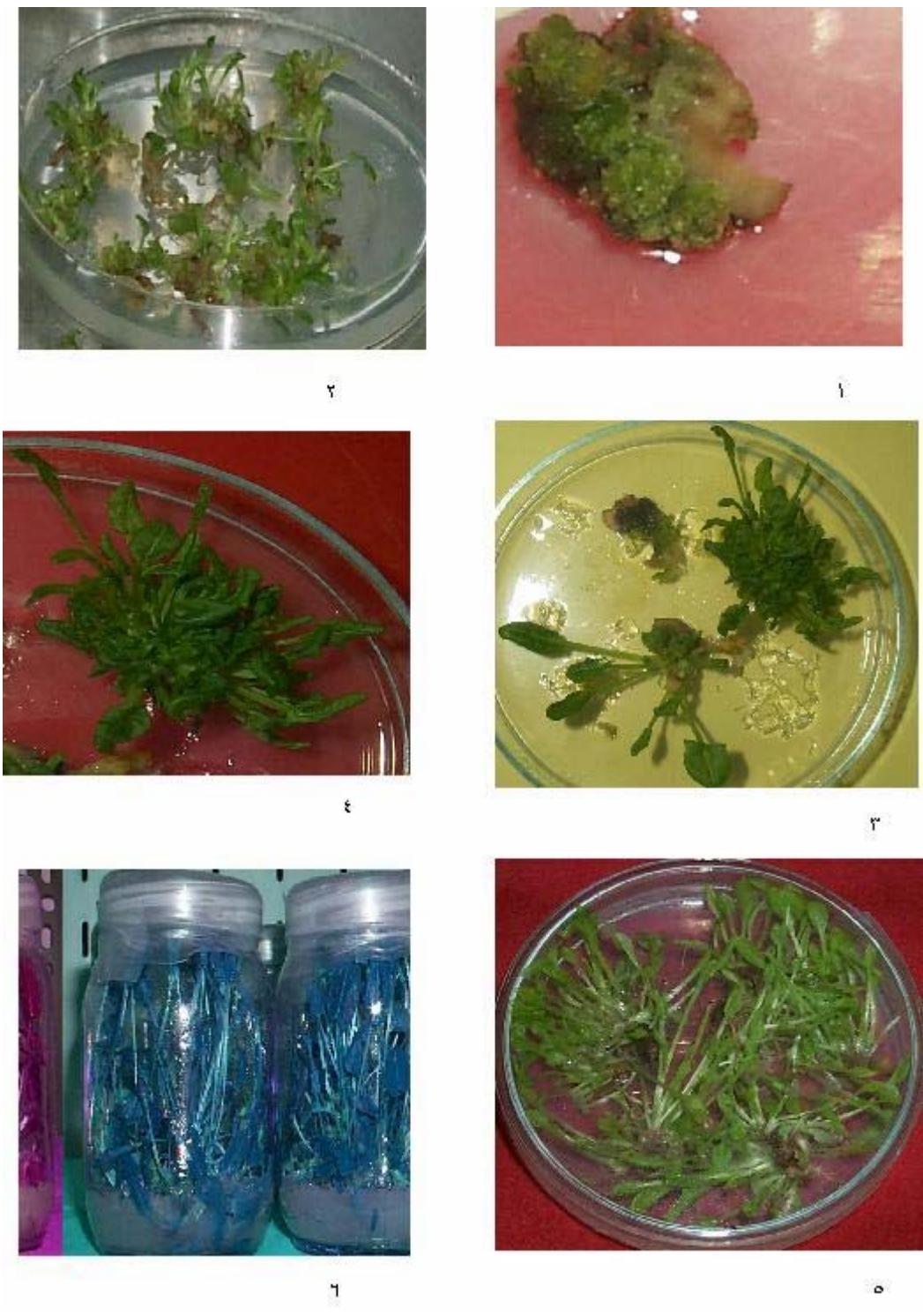
نمودار ۱- مقایسه میانگین باززایی در سطوح ریزنمونه (الف) و IAA (ب) از طریق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد

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

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 کاملاً تمايز یافته دیده شد. پایان هفته پنجم تا انتهای هفته ششم سلول‌های فعال در بخش‌های میانی کالوس به صورت دوازیر متعدد مرکز 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.

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 و محیط کشت جهت باززایی گیاه با درصد بالا معرفی می‌گردد.

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



شکل ۱ تا ۶: القای کالوس از ریزنمونه برگ (۱)، باززایی از کالوس (۲)، رشد بیشتر نوساقه‌ها (۳)، ایجاد چندین نوساقه (۴)، تکثیر گیاهچه باززایی شده (۵) و انتقال آن به محیط ریشه زایی (۶).

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).

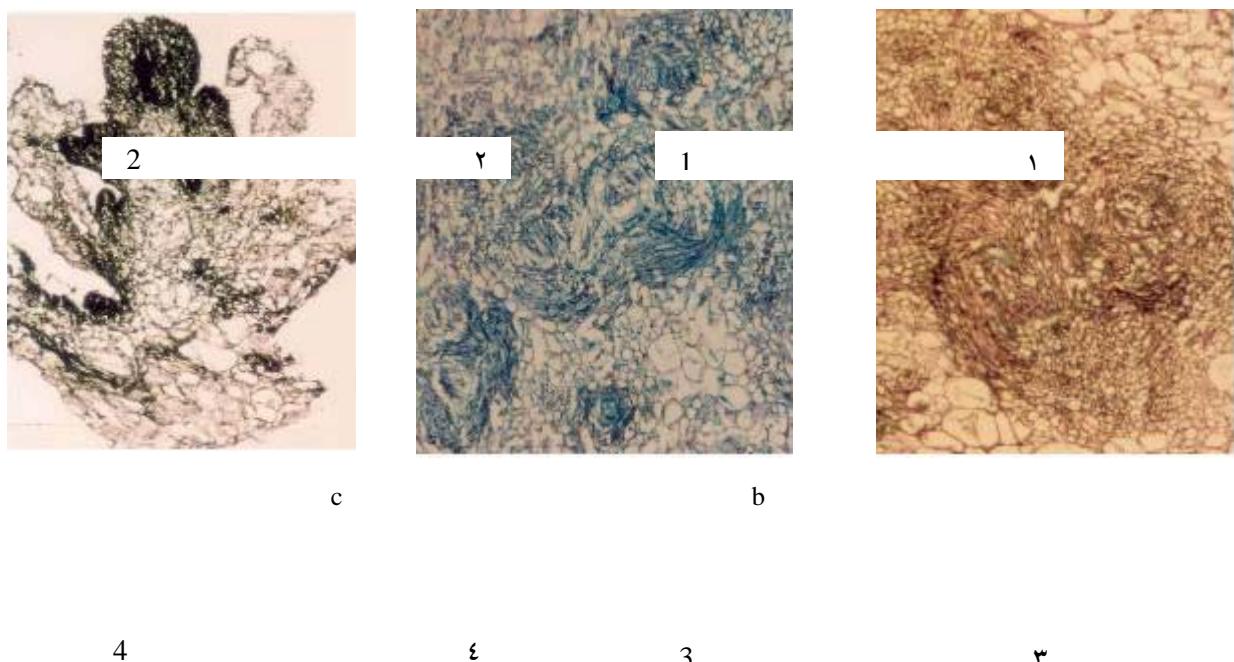


Fig. 7. Histology of callus growth stages and shoot primordial formation, (a) Formation of active cells nuclei, (b) Extension of the nuclei and formation of the first primordial, (c) Formation of shoot primordial.

References

- Ainsworth, C., Crossley, S., Buchanan-Wollaston, V., Tangavelu, M., Parker, J. 1995. Male and female flowers of the dioecious plant corolla show different patterns of male bias gene expression. *Plant Cell* **7**: 1585-1595.
- Ainsworth, C., Parker, J., Buchanan-Wollaston, V. 1998. Sex determination in plants. *Current Topics in Developmental Biology* **38**: 167-223.
- C c ب cic, R., م b ب n of Somat a الف
- development in *Rumex acetosella* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur*. **11**: 133-139.

- 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.

High frequency plantlet regeneration in a dioecious plant as Sorrel

A. Izadi Darbandie¹ and A. M. Shakib²

ABSTRACT

Sorrel [*Rumex acetosa* L. (Polygonaceae)] is a dioecious perennials species which is being used as a model plant in sex determination molecular genetic studies. In this study for determination of the most suitable explant and medium for regeneration in this species, explants from different organs such as leaf, petiol, cotyledon, hypocotyle and root were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with vitamins, 2% sucrose, 0.8% agar and different compositions of hormones. Auxins; IAA, NAA and cytokinins; Zeatin, BAP, TDZ and Kinetin as well as IAA and BAP with Gibberellic Acid were added to culture media. Experiments were carried out as factorial in completely randomized design. Callus induction and regeneration from explants were evaluated. The most suitable explants and medium for regeneration were leaf and MS medium supplemented with 0.75 mg l^{-1} IAA and 1.5 mg l^{-1} BAP, respectively. The highest callus induction and regeneration was obtained from the leaf explants at the rate of 100% and 81%, respectively. Regenerates from the leaf explants on this medium had proliferated status. Histological studies confirmed that the origin of regeneration was from active and condensed cells that had developed from central parts of callus followed by marginal cells to form single or proliferated primordial. These results suggest new, simple, short and efficient regeneration method in this model species which can be used in genetic studies and gene transformation.

Key words: Sorrel (*Rumex acetosa* L), Explant, Callus induction, Regeneration, Media, Plantlet.

1 and 2- MSc. In Plant Breeding & Research Assist. Prof. of Ag. Biotech. Res. Institute. Karaj, Iran.

