زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره بیست و دوم، زمستان ۱۳۹۳، صفحه ۳۹-۵۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۹/۲۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۱۲/۱۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۷/۲۳

باززایی درون شیشه برخی ژنوتیپ‌های ایرانی یونجه (*Medicago sativa* L.) از طریق جنین‌زایی بدنی

سهراب عابدی [۱]، ناصر زارع [۱]*، رسول اصغری زکریا [۱]، پریسا شیخ‌زاده مصدق [۱] و مجید شکرپور [۲]
[۱] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۲] گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

وجود سیستم بهینه باززایی درون شیشه یکی از پیش‌نیازهای دستکاری ژنتیکی واریته‌ها و ژنوتیپ های گیاهان است. در پژوهش حاضر، جنین زایی بدنی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ چهار ژنوتیپ یونجه به نام‌های ۱۸-۶ (سینتتیک)، ۱۴-۴ (قره یونجه قره قزلو)، ۲۷-۳ (قره یونجه مراغه) و y-6 (Regen-SY) بررسی شد. تشکیل کالوس و جنین‌زایی بدنی به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع ریزنمونه و اثر متقابل ژنوتیپ × محیط کشت قرار گرفت. بیشترین وزن تر کالوس (۰/۴۰۶ گرم) در ریزنمونه‌های برگ ژنوتیپ ۱۴-۴ مشاهده شد. درصد جنین‌زایی بدنی و تعداد جنین در هر کالوس حاصل از ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۴-۴ بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها بود. در ژنوتیپ ۱۸-۶، بیشترین درصد جنین‌زایی بدنی با استفاده از ریزنمونه برگ روی محیط کشت القای حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین به دست آمد. بین جنین‌های حاصل از ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف از نظر فراوانی تبدیل جنین به گیاهچه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و به طور میانگین، ۵۸ درصد از جنین‌های کشت شده روی محیط کشت MS به گیاهچه طبیعی تبدیل شدند. جنین‌زایی بدنی ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ در نسبت‌های بالاتر ۱ به ۵ کینتین به 2,4-D به دست آمد. در حالی که ریزنمونه ژنوتیپ ۱۸-۶ در نسبت ۱ به ۲/۵ از کینتین به 2,4-D فرآیند جنین‌زایی موفقی را نشان نداده بود. جنین های تولید شده از کارآیی خوبی برای تبدیل شدن به گیاهچه برخوردار بودند و از روش ارایه شده در این تحقیق می‌توان در مطالعات مولکولی و مهندسی ژنتیک این گیاه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: جنین‌زایی بدنی (سوماتیک)، باززایی درون شیشه، یونجه (*Medicago sativa* L.)

مقدمه

یونجه گیاهی است علفی از تیره باقلاییان (Fabaceae) با نام علمی *Medicago sativa* L. که نقش عمده‌ای در تغذیه دام، حفاظت و بهبود نیتروژن خاک دارد. خاستگاه آن شمال ترکیه، ترکمنستان و شمال غرب ایران است (Tesfaye *et al.*, 2009؛

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: nzare@uma.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۵۳۳۵۱۰۱۴۰

(Mohammadzadeh *et al*., 2011). امروزه کشت بافت از ابزارهای مهم بیوتکنولوژی در اصلاح، تلاقی‌های بین گونه‌ای، تکثیر بافت‌ها، سلول‌ها و ژنوتیپ‌های خاص، تولید بذور مصنوعی و مهندسی ژنتیک یونجه به شمار می‌رود. همچنین، از کشت بافت یونجه برای ایجاد تنوع سوماکلونال و گزینش گیاهان مطلوب مانند تولید گیاهان یونجه مقاوم به آلومینیوم یا اسید، متحمل به شوری و گیاهان مقاوم به پژمردگی فوزاریوم استفاده شده است (Piccioni *et al*., 1996).

باززایی یونجه در کشت بافت معمولا از طریق جنین‌زایی بدنی مستقیم از سلول‌های ریزنمونه یا غیرمستقیم از سلول‌های کالوس صورت می گیرد. جنین‌زایی بدنی فرآیندی است که در آن سلول‌های بدنی بدون اتحاد گامت‌ها و پس از طی مراحل جنین‌زایی به گیاه کامل تبدیل می‌شود (Perrin *et al*., 2004). یکی از موارد مهم در جنین زایی بدنی توانایی تشکیل جنین هایی است که رشد کرده، به گیاه کامل تبدیل شود (Leroy *et al*., 2000). این پتانسیل عمدتا به شرایط فیزیولوژیک و ژنتیک سلول و بافت، محیط کشت مناسب و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بستگی دارد. توانایی ظهور جنین بدنی تحت شرایط مناسب فیزیولوژی و در پاسخ به علامت القای می‌شود (Feher, 2008). از سوی دیگر، ریزنمونه‌های جدا شده از گیاه مادر، پس از کشت دیگر اتوتروف نیستند. لذا، مواد موجود در محیط کشت برای رشد ریزنمونه‌ها اهمیت خاصی دارد. بنابراین، نوع و غلظت مواد محیط کشت می‌تواند بر چگونگی و رفتار ریزنمونه‌ها از لحاظ جنین‌زایی بدنی اثر داشته باشد (Ivanova *et al*., 1994؛ Burrell *et al*., 2006؛ Rahnama and Takavar, 2012). مهم‌ترین عامل مؤثر در تفاوت بین کشت‌های جنین‌زا و غیرجنین‌زا، سطوح متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی بافت است (Grieb *et al*., 1997).

پاسخ باقلاییان نسبت به اکسین بسته به نوع اکسین استفاده شده متفاوت است (Turgut-Kara and Sule, 2008). در گیاه یونجه 2,4-D یکی از قوی‌ترین اکسین‌هایی است که در القای کالوس‌زایی و تشکیل جنین بدنی نقش دارد (Lakshmanan and Taji, 2000). سیتوکینین ها نیز در همکاری با اکسین جهت القای جنین بدنی مؤثر هستند و در تسریع بلوغ جنین به ویژه در رشد و نمو لپه‌ها مؤثر هستند. علاوه بر این، در بعضی مواقع سیتوکینین‌ها برای رشد جنین و تبدیل آن به گیاهچه لازم هستند (Jimenez and Thomas, 2005). باززایی یونجه معمولا از طریق جنین‌زایی بدنی انجام می‌گیرد و به شدت به ژنوتیپ گیاهی و روش باززایی وابسته است (Zare *et al*., 2009؛ Shao *et al*., 2000).

Iantcheva و همکاران (۲۰۰۱) جنین‌زایی بدنی پنج گونه دیپلوئید یونجه یک ساله را از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ در کشت تعلیقی بررسی کردند. محیط کشت شامل ۱ یا ۴ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی گرم در لیتر کینتین برای جنین‌زایی مناسب تشخیص داده شد. Zare و همکاران (۲۰۰۹) با ارزیابی باززایی پنج رقم یونجه، ژنوتیپ‌هایی با قابلیت باززایی در شرایط درون شیشه را گزینش کردند. با این حال، در برخی از ژنوتیپ‌ها پاسخ جنین‌زایی پایین بود. بنابراین، بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت برای رسیدن به فراوانی باززایی مطلوب ضروری است.

زیست فناوری و به ویژه مهندسی ژنتیک گیاهی

می‌تواند نقش بسیار مهم و مفیدی در اصلاح و ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، افزایش کیفیت پروتئین و هضم‌پذیری، بهبود عملکرد و ارزش غذایی گیاه یونجه داشته باشد. گیاه یونجه به علت اتوتتراپلوئید بودن، خودناسازگاری، دگرگشن بودن (cross pollination)، هتروزیگوسیتی و ناهمگنی بالا در ژرم‌پلاسم، تنوع درون و بین واریته‌ای بالایی برای جنین‌زایی بدنی دارد، به طوری که هنوز بازززایی طیف وسیعی از ارقام یونجه ممکن نشده است. این وضعیت، اصلاح ژنتیکی یونجه با روش‌های زیست‌فناوری را محدود کرده است (Zare *et al*., 2009). به بیان دیگر، وجود یک سیستم مؤثر بازززایی درون شیشه، نخستین گام در بهره‌گیری از روش‌های دستکاری ژنتیکی برای بهبود ویژگی‌های کمی و کیفی واریته‌های بومی و سازگار این گیاه است (Vlahova *et al*., 2005). بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی محیط‌کشت برای جنین‌زایی بدنی غیرمستقیم از ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ ژنوتیپ‌های ایرانی یونجه انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در پژوهش حاضر از چهار ژنوتیپ یونجه به نام‌های ۱۸-۶ (انتخاب شده از رقم سینتتیک دانشگاه تبریز)، ۱۴-۴ (انتخاب شده از رقم قره یونجه قره قزلو)، ۲۷-۳ (انتخاب شده از رقم قره یونجه مراغه) و y-6 (انتخاب شده از رقم Regen-SY) استفاده شد.

محیط کشت: پژوهش حاضر در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. ابتدا پاسخ جنین‌زایی ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ هر چهار ژنوتیپ در محیط کشت القای جنین‌زایی بدنی، شامل محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین ارزیابی شد. با توجه به این که ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ در این آزمایش جنین‌زایی بدنی نشان نداد، تأثیر سطوح مختلف 2,4-D (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت القا، بر جنین‌زایی این ژنوتیپ بررسی شد.

تهیه ریزنمونه: ژنوتیپ‌های استفاده شده از طریق کشت جوانه‌های جانبی در محیط کشت MS جامد فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در شرایط درون شیشه تکثیر و در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور فلوروسنت (۹۰۰ لوکس) نگهداری شدند. دمبرگ‌ها و سه‌برگچه‌ای‌های تازه رشد یافته پس از ۴ تا ۶ هفته توسط اسکالپل تیز در شرایط سترون به قطعات تقریبی ۲۰-۲۵ میلی‌متر مربع و دمبرگ‌ها به قطعاتی با اندازه ۴-۵ میلی‌متر در پتری‌دیش حاوی آب مقطر بریده شدند.

کشت و بازززایی درون شیشه: ریزنمونه‌های تهیه شده بلافاصله روی محیط کشت القای جنین (محیط MS حاوی غلظت‌های متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و کینتین) به ظروف پتری‌دیش ۱۰۰×۲۰ میلی‌متری منتقل شدند. در هر پتری‌دیش پنج عدد از هر ریزنمونه کشت شد. ریزنمونه‌ها پس از سپری شدن مدت زمان القای جنین (سه هفته) به محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شدند تا جنین‌های بدنی تشکیل شوند. پس از سه هفته کالوس‌ها و جنین‌های بدنی تولید شده به مدت دو تا سه هفته برای رشد بیشتر به محیط Boi2Y [محیط Blaydes به اضافه ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول و ۲

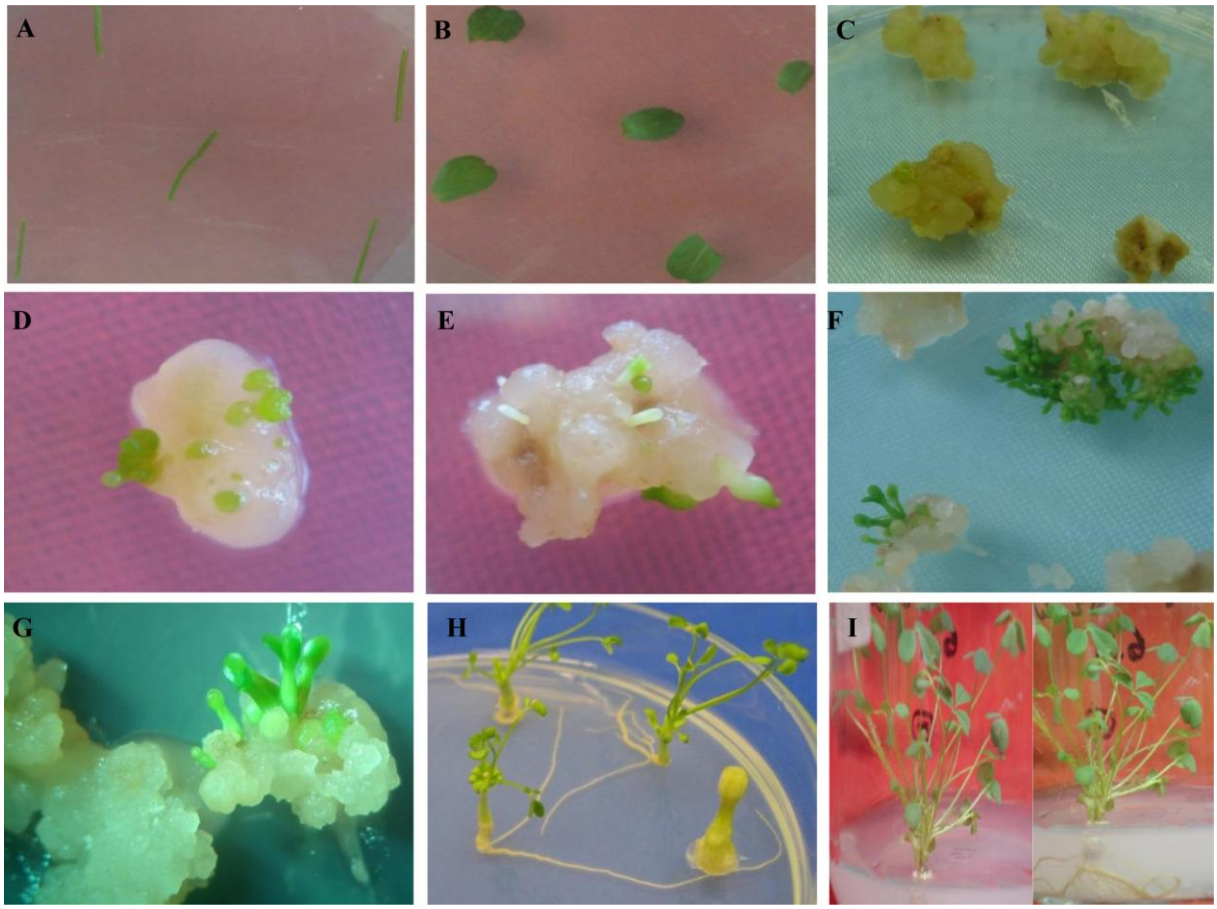
گرم بر لیتر عصاره مخمر (Shao *et al*., 2000)] منتقل شدند. پس از آن، به مدت دو هفته دیگر به محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد منتقل شدند. جنین‌های بالغ (لپه‌ای‌شکل) از کالوس جدا و به منظور تبدیل شدن به گیاهچه (تولید ریشه و ساقه) به محیط MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی منتقل شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. صفاتی نظیر: درصد کالوس‌زایی، وزن تر کالوس‌ها، درصد جنین‌زایی بدنی، تعداد جنین در هر ریزنمونه و درصد تبدیل جنین به گیاهچه در تمامی تیمارها یادداشت شد.

تحلیل داده‌ها: داه‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ تحلیل شد. تمامی داده‌ها میانگین سه تکرار است.

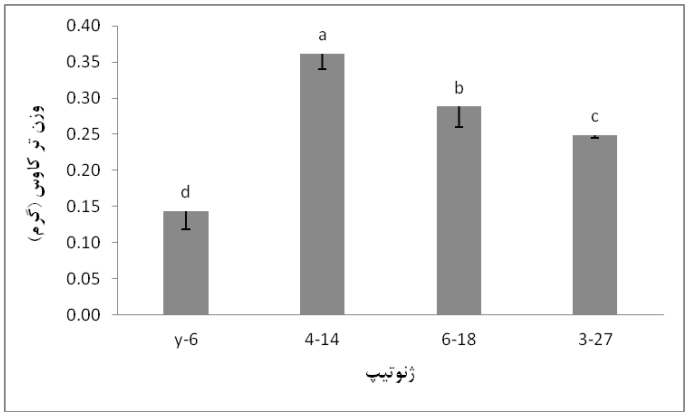
نتایج

تشکیل کالوس: تشکیل کالوس با تغییر شکل و متورم شدن ریزنمونه‌ها ۶ تا ۸ روز پس از کشت ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ آغاز و پس از ۱۴ تا ۲۱ روز تکمیل شد و توده‌های سلولی پیش جنینی شکل گرفتند. کالوس‌های تولید شده زرد مایل به سبز کم‌رنگ و نرم بودند (شکل ۱-A، B و C). تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت معنی‌داری در بین ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها از نظر کالوس‌زایی نشان نداد. ژنوتیپ‌های بررسی شده در محیط کشت حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین کالوس‌زایی خوبی داشتند. تجزیه واریانس داده‌ها در ژنوتیپ ۱۸-۶ تفاوت معنی‌داری در بین محیط کشت‌ها و ریزنمونه‌های استفاده شده از نظر کالوس‌زایی نشان نداد. تشکیل کالوس در تمامی محیط کشت‌ها و از همه ریزنمونه‌ها مشاهده شد.

وزن تر کالوس: وزن تر کالوس‌ها در ریزنمونه‌های برگ به طور معنی داری بیشتر از ریزنمونه‌های دمبرگ بود. از لحاظ وزن تر کالوس بین ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۲ و جدول ۱). کالوس‌های حاصل از ژنوتیپ ۴-۱۴ نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها از رشد (وزن تر) بیشتری برخوردار بودند. همچنین، وزن تر کالوس تحت تأثیر اثر متقابل بین ژنوتیپ و ریزنمونه نیز قرار گرفت. بیشترین وزن تر کالوس در ریزنمونه‌های برگ (۰/۴۰۶ گرم) و دمبرگ (۰/۳۷۳ گرم) ژنوتیپ ۱۴-۴ و کمترین آن در ریزنمونه‌های برگ (۰/۱۹۹ گرم) و دمبرگ (۰/۰۸۹ گرم) ژنوتیپ y-6 مشاهده شد (جدول ۱). در ژنوتیپ ۱۸-۶، ترکیب محیط کشت، نوع ریزنمونه و اثر متقابل بین آنها اثر معنی داری بر وزن تر کالوس داشت. بیشترین وزن تر کالوس به ریزنمونه برگ در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کینتین (۰/۶۵۹ گرم) و محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین (۰/۶۰۰) تعلق داشت. اما کمترین وزن کالوس (۰/۱ گرم) از ریزنمونه دمبرگ در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کینتین و بیشترین وزن کالوس (۰/۲۸۱ گرم) از ریزنمونه دمبرگ محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین به دست آمد. کمترین میزان رشد کالوس در ریزنمونه‌های برگ (۰/۳۲۷) مربوط به محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم بر لیتر کینتین بود که تفاوت معنی‌داری با محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین، در ریزنمونه دمبرگ نداشت (جدول ۲).



شکل ۱- تشکیل کالوس، جنین‌زایی بدنی و بازززایی یونجه در شریط درون شیشه. A و B) به ترتیب ریزنمونه دمبرگ و برگ تازه تهیه شده؛ C) کالوس‌های جنین‌زای ایجاد شده روی محیط القا؛ D) جنین‌های بدنی در مراحل کروی و قلبی شکل؛ E) جنین‌های بدنی در مرحله رشدی نیزه‌ای شکل؛ F و G) جنین‌های بدنی بالغ لپه‌ای شکل؛ H) تبدیل جنین بدنی بالغ به گیاهچه؛ I) گیاهچه‌های حاصل از رشد جنین‌های بدنی بالغ در شرایط درون شیشه



شکل ۲- میانگین وزن تر کالوس تولید شده در ژنوتیپ‌های مطالعه شده یونجه. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

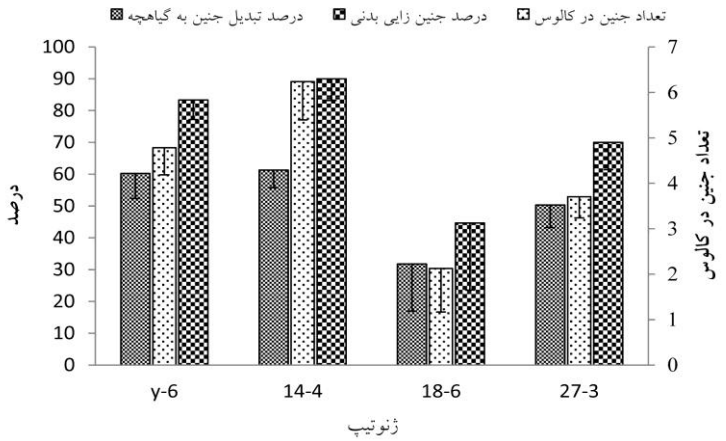
جدول ۱- میانگین وزن تر کالوس و درصد جنین‌زایی بدنی در ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌های مطالعه شده یونجه. حروف متفاوت در هر صفت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

ژنوتیپ	وزن تر کالوس		درصد جنین‌زایی بدنی		تعداد جنین در هر کالوس	
	برگ	دمبرگ	برگ	دمبرگ	برگ	دمبرگ
y-6	۰/۱۹۹^{e}	۰/۰۸۹^{f}	۸۶/۶۶^{ab}	۸۰^{ab}	۴/۵۵^{b}	۵/۰۱۷^{b}
4-14	۰/۴۰۶^{a}	۰/۳۷۳^{c}	۸۰^{ab}	۱۰۰^{a}	۵/۰۵۳^{b}	۷/۴^{a}
6-18	۰/۳۴۸^{b}	۰/۲۲۹^{de}	۹۳^{ab}	۰^{c}	۴/۲۵^{b}	۰c
3-27	۰/۲۵۱^{d}	۰/۲۴۸^{d}	۶۶/۶۶^{ab}	۷۳^{ab}	۳/۴۸۳^{b}	۳/۹۲۷^{b}
میانگین	^{a}۰/۳۰۱	^{b}۰/۲۲۰۸	^{a}۸۱/۶۶	^{b}۶۳/۳۳	^{a}۴/۳۳۴	^{a}۴/۰۸۶

جنین‌زایی بدنی: کالوس‌های جنین‌زا نرم و زرد یا سبز کم رنگ و کالوس‌های غیر جنین‌زا فشرده و متمایل به قهوه‌ای رنگ بودند. در بین کالوس ها هم از نظر زمان جنین‌زایی و تکامل جنین‌ها و هم از نظر تعداد جنین‌های ظاهر شده در هر کالوس تفاوت وجود داشت (شکل ۱-D، E و F). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر ریزنمونه و ژنوتیپ بر جنین‌زایی بدنی یونجه معنی‌دار بود. البته اثر متقابل بین ریزنمونه و ژنوتیپ نیز برای این صفت معنی‌دار به دست آمد. به‌طور کلی، درصد جنین‌زایی بدنی ژنوتیپ‌های ۱۴-۴ و y-6 به طور معنی‌داری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود (شکل ۳). بیشترین درصد جنین‌زایی بدنی از کالوس‌های ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۴-۴ به دست آمد. اما کالوس‌های حاصل از ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ اصلا جنین بدنی تولید نکردند. بین جنین‌زایی بدنی ریزنمونه برگ ژنوتیپ‌های ۱۸-۶ و ۱۴-۴ و ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ ژنوتیپ‌های ۲۷-۳ و y-6 اختلاف چندانی مشاهده نشد. به طوری که کمترین جنین‌زایی بدنی در کالوس‌های ریزنمونه برگ ژنوتیپ ۲۷-۳ (۶۶/۶۶ درصد) و بیشترین آن در کالوس های ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ (۹۳ درصد) به دست آمد (جدول ۱). در ژنوتیپ ۱۸-۶، جنین‌زایی بدنی به طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع ریزنمونه و اثر متقابل آن با ترکیب هورمونی محیط کشت قرار گرفت. بیشترین درصد جنین‌زایی بدنی در ریزنمونه‌های برگ (۹۳/۳۳ درصد) در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین مشاهده شد. در حالی که در این محیط کشت هیچ گونه جنین‌زایی بدنی از ریزنمونه دمبرگ مشاهده نشد. در سایر محیط کشت‌ها تفاوت معنی‌داری بین ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ از نظر درصد جنین‌زایی بدنی وجود نداشت (جدول ۲).

تعداد جنین در کالوس و تبدیل جنین به گیاهچه: بین ژنوتیپ‌ها از نظر تعداد جنین در کالوس و همچنین درصد تبدیل جنین به گیاهچه اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۳). بیشترین میانگین تعداد جنین بدنی تولید شده در هر کالوس (۷/۴ عدد) در ریزنمونه دمبرگ ژنوتیپ ۱۴-۱۴ به دست آمد که به طور معنی‌داری بیشتر از سایر ریزنمونه‌ها و ژنوتیپ‌ها بود (جدول ۱). مرحله نهایی فرآیند جنین‌زایی بدنی قابلیت رشد آنها و تبدیل شدن به گیاهچه کامل است و موفقیت در باززایی گیاه از طریق جنین زایی بدنی تا حد زیادی بستگی به آن دارد. برای این منظور جنین های بالغ (شکل ۱-G) به محیط MS فاقد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی منتقل شدند. در این محیط، مریستم‌های

ریشه‌چه و ساقه‌چه فعال و به گیاهچه‌ای کامل دارای ریشه، شاخه و برگ تبدیل می‌شود (شکل ۱- H و I). به طور کلی، در بررسی حاضر، بین ژنوتیپ‌های استفاده شده از نظر قابلیت و درصد تبدیل جنین به گیاهچه اختلاف معنی داری مشاهده نشد. به طور میانگین، ۵۸ درصد از جنین‌های بدنی بالغ منتقل شده روی محیط کشت MS رشد کردند و به گیاهچه‌های معمولی تبدیل شدند. این امر نشان دهنده کیفیت نسبتا خوب جنین های بدنی تولید شده در این تحقیق است. در ژنوتیپ ۱۸-۶، بین محیط های کشت و نوع ریزنمونه از نظر تعداد جنین در کالوس تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود. اغلب ریزنمونه ها چندین جنین بدنی، برخی از آنها یک جنین بدنی تولید کردند و برخی نیز اصلا جنین تولید نکردند. بیشترین تعداد جنین در کالوس به ریزنمونه برگ (۴/۲۵ عدد) در محیط کشت MS حاوی ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین تعلق داشت (جدول ۲). اما کارآیی تبدیل جنین به گیاهچه تحت تأثیر هیچ کدام از عوامل ریزنمونه، محیط کشت و اثر متقابل قرار نگرفت.



شکل ۳- میانگین درصد جنین‌زایی بدنی و تبدیل جنین به گیاهچه و تعداد جنین در هر کالوس در ژنوتیپ‌های یونجه. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

جدول ۲- میانگین صفات مربوط به القا و تولید جنین بدنی در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ ژنوتیپ ۱۸-۶ یونجه در محیط کشت‌های حاوی سطوح متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی؛ حروف متفاوت در هر صفت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

محیط کشت	وزن تر کالوس			درصد جنین زایی بدنی			تعداد جنین در کالوس		
	دمبرگ	برگ	میانگین	دمبرگ	برگ	میانگین	دمبرگ	برگ	میانگین
MS + 10 mg/L 2,4-D + 1 mg/L Kin	۰/۱۴۳ de	۰/۳۲۷ bc	۰/۲۳۵ b	۲۰ b	۲/۶۶۷ b	۲۳/۳۳ a	۲/۶۶۷ ab	۲/۳۳ abc	۲/۵ a
MS + 10 mg/L 2,4-D + 2 mg/L Kin	۰/۲۸۱ bc	۰/۶ a	۰/۴۴۰ a	۲۰ b	۳۳/۳۳۳ b	۲۶/۶۷ a	۱/۱۶۷ bc	۱/۱۱ bc	۱/۱۳۸ a
MS + 5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L Kin	۰/۱ e	۰/۶۵۹ a	۰/۳۸۰ a	۲۶/۶۷ b	۲۶/۶۶۷ b	۲۶/۶۷ a	۱/۱۶۷ bc	۱ bc	۱/۳۳ a
MS + 5 mg/L 2,4-D + 2 mg/L Kin	۰/۲۲۹ cd	۰/۳۴۸ b	۰/۲۸۸ b	۰ c	۹۳/۳۳۳ a	۴۶/۶۷ b	۰ c	۴/۲۵ a	۲/۱۲۵ a
میانگین	۰/۱۸۸ b	۰/۴۸۴ a		۱۶/۶۶ b	۴۵/۰۰ a		۱/۳۷۵ b	۲/۱۷۳ a	

بحث

تفاوت مشاهده شده بین ژنوتیپ های مختلف از نظر وزن تر کالوس، درصد جنین‌زایی بدنی و تعداد جنین در هر کالوس ممکن است علاوه بر هتروزیگوسیتی شدید، ناهمگنی و دگرگردهافشان بودن گیاه یونجه (Petolescu and Nedelea, 2009)، به متفاوت بودن میزان و تأثیر تنظیم کننده‌های رشد داخلی، متفاوت بودن ژن‌های تنظیم کننده پاسخ به باززایی و تنوع آللی نیز نسبت داده شود (Luica *et al*., 1997؛ Bhaskaran and Smith, 2002). مطالعات متعدد نشان داده است که جنین‌زایی بدنی در یونجه به صورت ژنتیکی تنظیم می‌شود. به طوری که اغلب پژوهشگران اثر غالبیت کامل یا ناقص ژنی و اثر اپیستازی در رابطه با تشکیل کالوس و جنین‌زایی را مؤثر دانسته‌اند (Jimenez and Bangerth, 2001). میزان و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد درونی نقش بسیار مهمی در تنظیم فرآیندهای تمایزیابی دارند. به این علت، برخی از محققان بر این باور هستند که تفاوت اصلی بین ژنوتیپ‌ها از نظر جنین‌زایی بدنی می‌تواند متأثر از درجات متفاوت قابلیت آنها از نظر تولید تنظیم‌کننده‌های رشد درونی باشد (Newman *et al*., 1996؛ Grieb *et al*., 1997). در آزمایشی روی هویج، نشان داده شد که ژنوتیپ‌هایی که توانایی جنین‌زایی بیشتری دارند، از سطوح IAA داخلی بالاتری نیز برخوردار بودند. از سوی دیگر، نشان داده شده است که در پروتوپلاست‌های یونجه میزان IAA درونی هم به شکل آزاد و هم به شکل ترکیبی در پاسخ به 2,4-D افزایش می‌یابد (Pasternak *et al*., 2000). بر اساس یافته‌های Lakshmanan و Taji (۲۰۰۰) مبنی بر نقش اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در تشکیل و رشد کالوس در کشت بافت و به ویژه نقش 2,4-D در القای جنین زایی بدنی و نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های صورت گرفته درگیاهان دیگر، به نظر می‌رسد که در گیاه یونجه این دو گروه از تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس و پیشبرد سلول‌ها به سمت جنین‌زایی بدنی نقش مهمی دارند.

تأثیر سطوح مختلف 2,4-D و کینتین بر ژنوتیپ ۱۸-۶ در تمام صفات بررسی شده به غیر از قابلیت تبدیل جنین به گیاهچه و اثر متقابل غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و ریزنمونه معنی‌دار بود. این امر نشان می‌دهد که ریزنمونه‌ها نسبت به ترکیب غلظت‌های مختلف دو تنظیم کننده رشد 2,4-D و کینتین واکنش متفاوتی نشان می‌دهند. برای نمونه، در غلظت‌های مساوی کینتین، غلظت بالای 2,4-D سبب افزایش رشد کالوس و کاهش جنین‌زایی در ریزنمونه برگ شد. به طوری که در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D مقدار کالوس تولید شده توسط هر ریزنمونه نسبت به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر کینتین و ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D بیشتر بود. اما درصد جنین‌زایی ریزنمونه برگ در محیط دوم به طور معنی داری بیشتر از محیط اول بود (جدول ۲). در حالی که نتایج بررسی های Stuart و همکاران (۱۹۸۵) روی کشت تعلیقی یونجه با غلظت بالای 2,4-D (۱۱ میلی گرم بر لیتر) نشان داد که میزان بالای 2,4-D به تولید جنین‌های بدنی منجر گردید.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر در مورد توانایی تشکیل کالوس و جنین‌زایی بدنی در ریزنمونه‌های برگ و دمبرگ، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در تشکیل کالوس و جنین‌زایی

بدنی مؤثر بوده است و حجم کالوس تأثیر چندانی در پتانسیل جنین زایی ندارد. Radhika و همکاران (۲۰۰۶) معتقدند که 2,4-D مهم ترین نقش را در جنین زایی بدنی دارد و غلظت‌های مختلف آن واکنش‌های متفاوت را باعث می‌شود و نقش مهمی در تغییر سطوح تنظیم‌کننده‌های درونی در ریزنمونه دارد. در ریزنمونه‌های برگ، رابطه‌ای بین غلظت‌های متفاوت 2,4-D و کینتین، با وزن کالوس و تعداد جنین در کالوس وجود داشت. به طوری که وزن کالوس در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D با افزایش کینتین و در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر با کاهش کینتین، افزایش یافت. برعکس، تعداد جنین در کالوس در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر 2,4-D با کاهش کینتین، و در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D با افزایش کینتین، افزایش یافت (جدول ۲). اما در ریزنمونه دمبرگ چنین روند مشخصی وجود نداشت. این تغییرات را می‌توان به میزان غلظت و اثر تنظیم کننده‌های درونی در اندام‌های مختلف گیاه نسبت داد (Radhika *et al.*, 2006). Mitten و همکاران (۱۹۸۴) گزارش کردند که برای باززایی بایستی ابتدا کالوس در محیط کشت حاوی 2,4-D زیاد و کینتین کم تشکیل شود سپس در محیط فاقد تنظیم کننده‌های رشد زیرکشت شود. Zhao و همکاران (۲۰۰۱) معتقدند مقادیر اندک سیتوکینین در محیط کشت حاوی اکسین تأثیر مطلوبی بر تشکیل کالوس دارد. به طوری که در بسیاری از گونه‌های دیگر استفاده از مقادیر اندک سیتوکینین توصیه شده است. البته بر اساس مطالعه Gurel و همکاران (۲۰۰۱) روی چغندر قند، با افزایش کینتین به محیط کشت‌های دارای 2,4-D وزن تر و وزن خشک کالوس‌ها افزایش یافت. Bingham و همکاران (۱۹۷۵) گزارش کردند که نسبت اکسین و سیتوکینین در محیط کالوس‌زایی تأثیر بسیار زیادی در جنین‌زایی دارد. تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی نظیر تنظیم‌کننده‌های رشد داخلی گیاه، همان مسیر متابولیسمی را طی می‌کند که ممکن است برای گیاه مفید یا مضر باشد. بنابراین، نتایج متفاوتی از کاربرد آنها در غلظت‌های متفاوت می‌توان انتظار داشت (Rashid *et al.*, 2004). بنابراین، با توجه به هدف مورد نظر در کشت بافت، نوع ژنوتیپ و ریزنمونه مورد نظر، باید از ترکیب تنظیم کننده‌های رشدی مناسب استفاده گردد.

جمع‌بندی

به طور کلی، پژوهش حاضر روش مناسبی را برای باززایی درون شیشه‌ای ژنوتیپ‌های انتخاب شده از ارقام ایرانی یونجه معرفی می‌کند که علاوه بر مهیا نمودن درصد بالای جنین زایی بدنی و همچنین تعداد جنین در هر ریزنمونه، جنین های حاصل نیز از کیفیت خوبی برای تبدیل شدن به گیاهچه برخوردار هستند.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Bhaskaran, S. and Smith, R. H. (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review. Crop Science

30: 1328-1337.

Bingham, E. T., Hurley, L. V., Kaatz, D. M. and Saunders, J. W. (1975) Breeding alfalfa which regenerates from callus in culture. Crop Science 15: 719-721.

Burrell, A. M., Lineberger, R. D., Rathore, K. S. and Byrne, D. H. (2006) Genetic variation in somatic embryogenesis of Rose. Horticultural Science 41: 1165-1168.

Feher, A. (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. Acta Biologica 52: 53-56.

Grieb, B., Schfer, F., Imani, J., Mashayekhi, K., Arnholdtschmitt, B. and Neumann, K. H. (1997) Changes in soluble proteins and phytohormone concentrations of cultured carrot petiole explants during induction of somatic embryogenesis (*Daucus carota* L.). Journal of Applied Botany and Food Qulity 71: 94-103.

Gurel, S., Gurel, E. and Kaya, Z. (2001) Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. Turkish Journal of Botany 25: 25-33.

Iantcheva, A., Vlahova, M., Hanhtrinh, T., Brown, S. C., Slater, A., Elliott, M. C. and Atanassov, A. (2001) Assessment of polysomaty, embryo formation and regeneration in liquid media for various species of diploid annual *Medicago*. Plant Science 160: 621-627.

Ivanova, A., Velcheva, M., Denchev, P., Atanassov, A. and Vanonckelen, H. A. (1994) Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. Plant Physiology 92: 85-89.

Jimenez, V. M. and Bangerth, F. (2001) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. Physiologia Plantarum 111: 389-395.

Jimenez, V. M. and Thomas, C. (2005) Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. Plant Cell Monographs 2: 103-118.

Lakshmanan, P. and Taji, A. (2000) Somatic embryogenesis in leguminous plants. Plant Biology 2: 136-148.

Leroy, X. J., Leon, K., Charles, G. and Branchard, M. (2000) Culiflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. Plant Cell Reports 19: 1102-1107.

Luica, A., Felix, F. I., Federizzi, L. C., Lange, C. E. and Handel, L. (1997) Genetics of regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Genetics 15: 473-479.

Mitten, D. H., Sato, S. J. and Skokut, T. A. (1984) *In vitro* regenerative potential of alfalfa germplasm source. Crop Science 24: 943-945.

Mohammadzadeh, F., Monirifar, H., Saba, J., Valizadeh, M., Razbanhaghighi, A., Malekizanjjani, B., Barghi, M. and Tarhriz, V. (2011) Genetic variation among Iiranian alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations based on RAPD markers. Bangladesh Journal of Plant Taxonomy 18: 93-104.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Newman, P. O., Krishnaraj, S. and Saxena, P. K. (1996) Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. International Journal of Plant Sciences 157: 554-560.

Pasternak, T., Miscolzi, P., Ayaydin, F., Dudits, T. and Feher, A. (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-drived cells of alfalfa.

Journal of Plant Growth Regulation 32: 129-141.

Perrin, M., Gertz, C. and Masson, J. E. (2004) High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19 grapevine genotypes grown worldwide. Plant Science 167: 1343-1349.

Petolescu, C. and Nedelea, G. (2009) Genetic divercity analysis of the *in vitro* regenerated alfalfa plants using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Romanian Biotechnological Letters 14: 4882-4886.

Piccioni, E., Rosellini, D., Falcinelli, M. and Standardi, A. (1996) Micropropagation of mother plants of lucerne (*Medicago sativa* L.) for somatic embryogenesis. Euphytica 89: 193-200.

Radhika, K., Sujatha, M. and Rao, N. T. (2006) Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. Biologia Plantarum 50: 174-179.

Rahnama, H. and Takavar, S. (2012) Plant regeneration from mature embryo derived callus of corn (Zea mays L.). Journal of Plant Biology 13: 71-84 (in Persian).

Rashid, B., Husnain, T. and Riazuddin, S. (2004) *In vitro* shoot tip culture of cotton (*Gossypium hirsutum*). Pakistan Journal of Botany 36: 817-823.

Shao, C. Y., Russinova, E., Iantcheva, A., Atanassov, A., McCormac, A., Chen, D. F., Elliott, M. C. and Slater, A. (2000) Rapid transformation and regeneretion of alfalfa (*Medicago sativa* L.) via direct somatic embryogenesis. Journal of Plant Growth Regulation 31: 155-166.

Stuart, D. A., Nelson, J., Strickland, S. G. and Nichol J. W. (1985) Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures. In: Tissue culture in forestry and agriculture (Eds. Henke, R. R., Hughes, K. W., Constanin M. P. and Hollaender, A.) 59-73. Plenum, New York.

Tesfaye, M., Kevin, A. T., Silverstein, B., Bruna, B. D., Bucciarelli, B., Samac, D. A and Vance, P. V. (2006) The affymetrix medicago geneChip® array is applicable for transcript analysis of alfalfa (*Medicago sativa*). Functinal Plant Biology 33: 783–788.

Turgut-Kara, N. and Sule, A. (2008) *In vitro* plant regeneration from embryogenic cell suspension culture of *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). African Journal of Biotechnology 7: 1250-1255.

Vlahova, M., Stefanova, G., Petkov, P., Barbulova, A., Petkova, D., Kalushkov, P. and Atanassov, A. (2005) Genetic modification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) for quality improvement and production of novel compounds. Biotechnology and Biotechnological Equipment 19: 56-62.

Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Mohammadi, A., Malboobi, M. and Habashi, A. (2009) Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. Journal of Food, Agriculture and Environment 7: 567-572.

Zhao, J., Zhu, W. H. and Hu, Q. (2001) Effects of light and plant growth regulators on the biosynthesis of vindoline and other indole alkaloids in *Catharanthus roseus* callus cultures. Journal of Plant Growth Regulation 33: 43-49.

In vitro regeneration of some Iranian alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes via somatic embryogenesis

Sohrab Abedi [1], Nasser Zare [1]*, Rasoul Asghari Zakaria [1], Parisa Sheikhzadeh Mosaddegh [1] and Majid Shokrpour [2]

[1] Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

[2] Department of Horticulture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

An effective *in vitro* regeneration system is one of the prerequisites for genetic manipulation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties and genotypes. In this research, somatic embryogenesis of four alfalfa genotypes, 6-18 (synthetic), 4-14 (Kara Yonje- Karakozlu), 3-27 (Kara Yonje Maraghe) and y-6 (Regen-SY), were investigated using leaf and petiole explants. Formation of callus and somatic embryogenesis was significantly influenced by the explant type and interaction of genotype and culture medium. Petiole explants of genotype 4-14 produced the highest yield of callus (0.406 gr fresh weight of callus). Percentage of somatic embryogenesis and the number of embryos per callus in petiole explants of genotype 4-14 was higher than those of other genotypes and explants. In genotype 6-18, the highest percentage of somatic embryogenesis was achieved on MS medium containing 5 mg/L 2,4-D and 2 mg/L kinetin. There was no significant differences between genotypes and explants in terms of embryo conversion to plantlet, and on average, 58% of somatic embryos converted to plantlet on MS medium. The petiole explants of genotype 6-18 did not exhibit somatic embryogenesis response in medium containing low ratio of 2,4-D:Kinetin (5 mg/L 2,4-D and 2 mg/L kinetin). While, these explants showed somatic embryogenesis in higher ratio of 2,4-D:Kinetin (5:1). The plantlet conversion efficiency of somatic embryos produced through this study was relatively higher and therefore, the method presented in this study could be used in alfalfa genetic manipulation and molecular studies.

Key words: Somatic embryogenesis, *In vitro* regeneration, Alfalfa, *Medicago sativa* L.

* Corresponding Author: nzare@uma.ac.ir