دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۷۳-۶۳ (۱۳۸۹)

تأثیر برخی تنظیم‌کننده‌های رشد، منبع کربن و اسیدهای آمینه بر جنین‌های رویشی حاصل از کشت سوسپانسیون گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

عاطفه پزشکی[۱]، مرتضی ابراهیمی*[۲]، مجتبی خیام‌نکوی[۳]، سعید کدخدایی[٤]

۱- کارشناس ارشد، بیوتکنولوژی، دانشگاه مازندران

۲*- نویسنده مسؤل مکاتبات، کارشناس ارشد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان

پست الکترونیک: o_m_abrahimi@ yahoo.com

۳- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

٤- مربی پژوهش، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۸/۰۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۰۳/۲۳

چکیده

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای جهان است که نقش بسیار مهمی در تأمین علوفه، تثبیت نیتروژن و کاهش فرسایش خاک دارد. این گیاه خودناسازگار و دگرگشن است و بدین ترتیب نگهداری و تکثیر ژنوتیپ‌های مطلوب آن دشوار بوده و تولید بذر مرغوب و یکدست در این گیاه با مشکلات زیادی مواجه است. یکی از تکنیک‌هایی که در حل این مشکل می‌تواند کاربرد فراوانی داشته باشد، جنین‌زایی رویشی می‌باشد. بنابراین شناسایی عوامل موثر بر جنین‌زایی رویشی از اهمیت خاصی برخوردار است. این آزمایش به منظور ارزیابی اثر دو تنظیم کننده رشد 2,4-D (۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و کینتین (۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر)، نوع منبع کربن (ساکارز و مالتوز) و اسید آمینه‌های گلوتامین و سرین بر روی جنین رویشی یونجه در کشت سوسپانسیون سلولی جنین‌زای یونجه با استفاده از ٤ ریزنمونه (هیپوکوتیل، کوتیلیدون، دمبرگ و برگ) به اجرا درآمد. در بین تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر صفات اندازه‌گیری شده مشاهده گردید. بین غلظت 2,4-D مورد استفاده در کشت سوسپانسیون و تعداد جنین شمارش شده در مرحله بلوغ، رابطه مستقیمی وجود داشت، به نحوی که افزایش 2,4-D سبب کاهش تعداد جنین رویشی گردید. وجود کینتین در محیط باعث افزایش معنی‌داری در جنین‌زایی رویشی شد. علی‌رغم اثر معنی‌دار اسیدهای آمینه گلوتامین و سرین بر روی نمو جنین، استفاده از این اسیدهای آمینه در محیط کشت سوسپانسیون سبب کاهش معنی‌دار جنین‌زایی رویشی در کشت مایع گردید. وجود مالتوز در محیط مایع بیش از هر فاکتور دیگری سبب بلوغ جنین‌های رویشی و افزایش تعداد جنین در کشت سوسپانسیون شد. در بین ٤ نوع ریزنمونه مورد بررسی نیز از نظر قابلیت جنین‌زایی رویشی تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بیشترین و کمترین تعداد جنین به‌ترتیب متعلق به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و دمبرگ بودند.

واژه‌های کلیدی: کشت سوسپانسیون سلولی، جنین‌زایی رویشی، محیط کشت B5، تنظیم کننده رشد و یونجه.

مقدمه

یونجه یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای جهان به‌شمار می‌رود و به لحاظ تولید و کیفیت علوفه مناسب، تثبیت نیتروژن و کاهش فرسایش خاک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Esfandiari *et al*., 2008). این گیاه خودناسازگار و دگرگشن بوده و به لحاظ خصوصیات اتوتتراپلوئیدی در فرایند تقسیم میوز با مشکل مواجه می‌باشد. از این رو روش‌های مرسوم اصلاحی برای تولید ارقام پرمحصول، در یونجه کارایی چندانی ندارند. بدلیل وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین جمعیت‌های گیاه یونجه بعضاً ژنوتیپ‌های بسیار ممتازی مشاهده می‌گردد که از آنها می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی استفاده نمود (Farshadfar *et al*., 2008). اما نگهداری و تکثیر این ژنوتیپ‌های مطلوب دشوار بوده و تولید بذر مرغوب و یکدست در این گیاه با مشکلات زیادی مواجه است. یکی از تکنیک‌هایی که در این مورد کاربرد فراوانی دارد، جنین‌زایی رویشی می‌باشد. جنین‌زایی رویشی به‌عنوان فرایندی که در آن سلول‌های رویشی بدون اتحاد گامت‌ها از طریق طی نمودن مراحل جنین‌زایی به گیاه کامل نمو می‌یابند، تعریف می‌شود (Redenbaugh *et al*., 1991). همه این مراحل در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام می‌شود (McKersie & Bowlay, 1993). فرایند جنین‌زایی رویشی به ٤ مرحلهٔ القاء کالوس‌های جنین‌زا، تکثیر کالوس‌های جنین‌زا، نمو و بلوغ تقسیم می‌شود. بعد از القاء کالوس جنین‌زا، تعدادی از سلول‌های بافت ریزنمونه خاصیت توتی‌پتنسی (totipotency) را کسب کرده و در صورت انتقال این توده‌های سلولی به محیط بدون هورمون، مراحل نمو طی شده و به جنین کامل تبدیل می‌گردند (McKersie *et al*., 1994). نکته قابل توجهی که در این زمینه وجود دارد این است که به محض تشکیل توده‌های پیش‌جنینی در مرحله القاء، این توده‌های سلولی قدرت تکثیر دارند، بدین معنی که جمعیت‌های سلولی که خاصیت توتی‌پتنسی را کسب کرده‌اند می‌توانند در صورت وجود اکسین برای ماه‌ها و سال‌ها بازکشت شوند و این قابلیت تا آنجایی باقی می‌ماند که با حذف هورمون، جنین نمو یابد (McKersie & Bowley, 1993). این حقیقت که هم رشد سلول‌های جنین‌زا و هم نمو بعدی جنین‌های رویشی می‌تواند در محیط کشت مایع صورت گیرد، امکان مکانیزه کردن تولید انبوه جنین رویشی را فراهم کرده است (Kurz, *et al*., 1982).

کشت سوسپانسیون مقدمه‌ای برای تولید انبوه جنین رویشی و توسعه بیوراکتورها می‌باشد. اولین گزارش کشت‌های جنین‌زا در مقیاس انبوه توسط Backs-Husemann و همکاران (۱۹۷۰) بر روی کشت سلول‌های هویج در ظروف ۲۰ لیتری گزارش شد، که منجر به تشکیل تعداد زیادی جنین گردید. سیستم مکانیزه‌ای که اغلب برای کاربرد سیستم‌های جنین‌زا توصیف شده بود، بیورآکتوری با قابلیت به‌هم‌زدن محیط کشت است. این سیستم کشت انبوه، در ابتدا برای فرمانتورهای میکروبی توسعه یافت، اما جدیداً برای رویاندن سلول‌های گیاهی در مقیاس انبوه تغییر داده شده است (Koch, 1996; Martin, 1980). به طوری‌که Drew (۱۹۸۰) در یک لیتر محیط کشت سوسپانسیون هویج ۱/۳۵ میلیون جنین رویشی شمارش نمود. همین‌طور Lupotto (۱۹۸٦) با این روش توانست کشت‌های جنین‌زای بلندمدت یونجه را با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل و با جنین‌زایی مستقیم در یک محیط بدون تنظیم کننده رشد و بدون وجود کالوس نگهداری کند. در

بسیاری از کشت‌ها، هیپوکوتیل به‌عنوان منبع اولیه کلن، قابلیت نگهداری قدرت جنین‌زایی سوماتیکی خود را در چند دوره دارد (Lupotto, 1986). بنابراین در مقایسه با دیگر روش‌های ریزازدیادی (اندام‌زایی)، جنین‌زایی رویشی و تکثیر آن با استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی و متعاقب آن استفاده از تکنیک‌هایی چون بذر مصنوعی، پتانسیلی را برای سیستم‌های تکثیر در حجم بالا و مقیاس انبوه ارائه می‌کند که می‌تواند منجر به صرفه‌جویی معنی‌داری در نیروی کار و هزینه گردد. از آنجایی که عوامل مختلفی بر قابلیت جنین‌زایی رویشی گیاه یونجه و تکثیر انبوه آن با استفاده از کشت سوسپانسیون سلولی مؤثر هستند، شناسایی آنها می‌تواند در بهینه‌سازی دستورالعمل تکثیر این گیاه از طریق کشت سوسپانسیون سلولی از اهمیت بالایی برخوردار باشد. بنابراین، این آزمایش به‌منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)، کینتین، ترکیبات آلی، گلوتامین، سرین و قند مالتوز بر تکثیر توده‌های پیش‌جنینی در محیط کشت سوسپانسیون و نمو جنین‌ها در مراحل بعدی تمایز، با هدف افزایش کمیت و کیفیت جنین‌های رویشی حاصل، انجام گردید.

مواد و روشها

این آزمایش بصورت فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار به اجرا در آمد. تمامی مواد و هورمون‌های مورد استفاده در این آزمایش ساخت شرکت Duchefa بود. به‌منظور تهیه ریزنمونه، بذرهای یونجه رقم رنج لندر (Rangelander) (از جمله ارقام مورد استفاده جهت مطالعات مربوط به جنین‌زایی رویشی یونجه) به‌مدت ۱ دقیقه با الکل ۹٦ درصد استریل شده و پس از آن با آب‌مقطر شستشو گردیدند و به‌مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به‌همراه یک قطره توین (Tween) ۲۰ ضدعفونی شدند. سپس بذرهای سترون شده در زیر لامینارفلو با آب‌مقطر سترون شستشو و به‌مدت یک شب در دمای اتاق (۲۵^{o} C) و در تاریکی قرار داده شد. بذرها به محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) منتقل و به مدت ۲٤ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از آن برای ادامه رشد به اتاق رشد با شدت نور ۷۵$\mu Em^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲۵ ^{o} C و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. از این گیاهچه‌های رشد کرده در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌منظور تهیه ریزنمونه استفاده گردید. نمونه‌برداری از قسمت‌های مختلف گیاهچه ازجمله لپه‌ها، محور زیرلپه، دمبرگ و برگ‌ها صورت گرفت. به‌منظور کشت ریزنمونه، محور زیرلپه به قطعات ۰/۵ cm، لپه‌ها (کوتیلدون) از وسط به دو قسمت مساوی، دمبرگ به قطعات ۱ cm و برگ‌ها با کمک اسکالپل به‌صورت قطعات ریز درآورده شدند.

القاء کالوس: ریزنمونه‌ها بر روی محیط کالوس‌زایی SHk (Schenk & Hildebrandt, 1972) تغییریافته حاوی ٤۳۵۰ میلی‌گرم سولفات پتاسیم، ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین کشت گردیدند. نمونه‌ها در دمای ۲۵^{o} C و شدت نور ۷۵$\mu Em^{-2}s^{-1}$ با دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاق رشد نگهداری شدند. بعد از ۱٤ روز بر روی ریزنمونه‌ها کالوس تشکیل شد و توده‌های سلولی پیش‌جنینی شکل گرفتند.

کشت سوسپانسیون: کالوس‌های حاصل از مرحله القاء جهت بررسی تأثیر تیمارهای مختلف بر تکثیر و رشد و نمو توده‌های پیش‌جنینی، به محیط کشت سوسپانسیون منتقل گردیدند. محیط کشت سوسپانسیون مورد استفاده براساس بررسی‌های مقدماتی و انتخاب ترکیبات مؤثر صورت گرفت. بر این اساس، در این مرحله از ۹ محیط کشت مایع B5 (Gamborg *et al.*, 1968) به شرح جدول ۱ استفاده گردید:

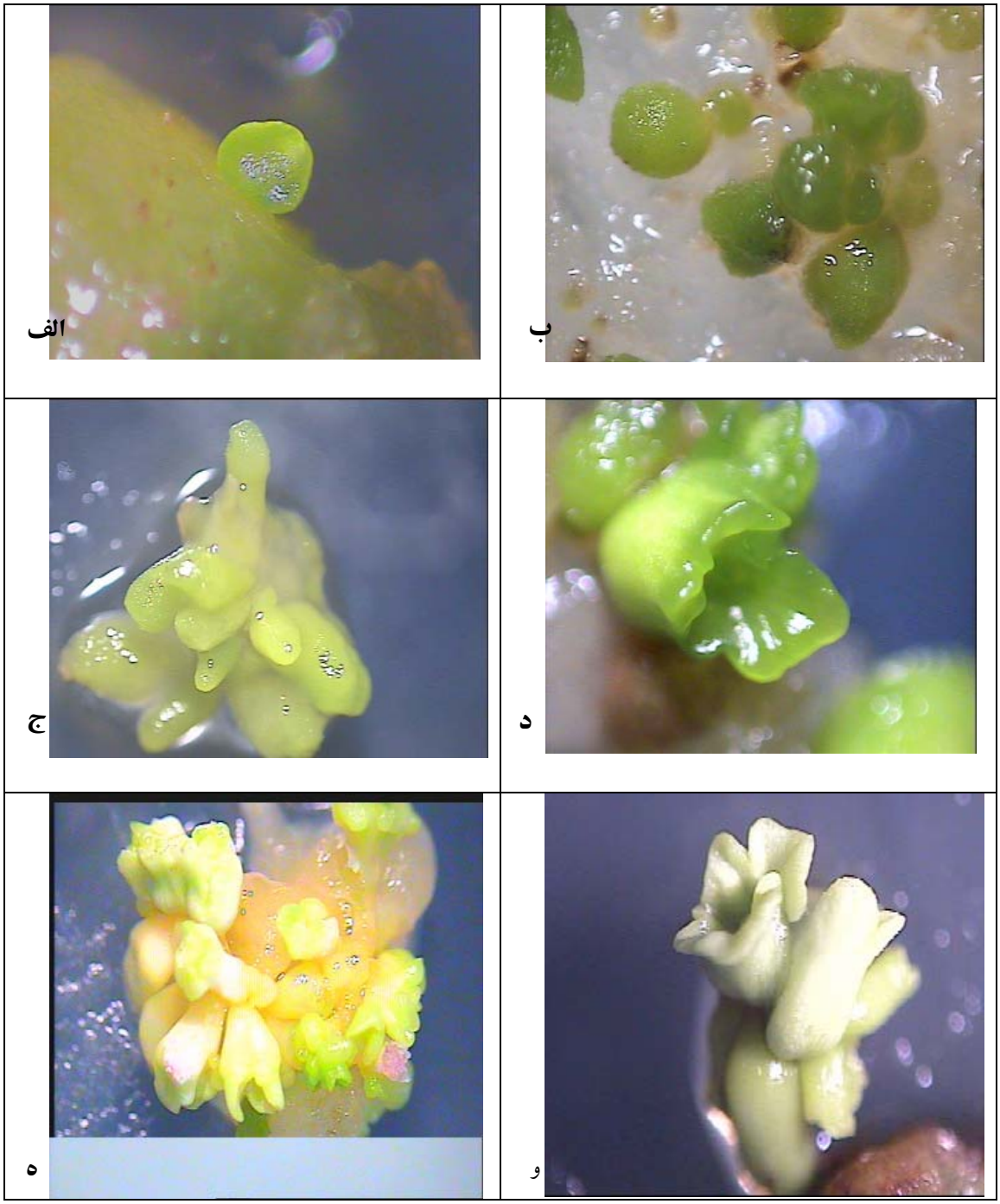
جدول ۱- فهرست ترکیبات مورد استفاده در ۹ محیط کشت سوسپانسیون آزمایش با محیط پایه B5

نام ترکیب	B5s1 (1)	B5s2 (2)	B5s3 (3)	B5s4 (4)	B5s5 (5)	B5s6 (6)	B5s7 (7)	B5s8 (8)	B5s9 (9)
2,4-D (mg/l)	۱	۰/۵	۱	۱	۰/۵	۱	۱	۰/۵	۱
Kinetin (mg/l)	–	–	۰/۱	–	–	۰/۱	–	–	۰/۱
گلوتامین (mg/l)	–	–	–	٤۰۰	٤۰۰	٤۰۰	–	–	–
سرین (mg/l)	–	–	–	۵۰	۵۰	۵۰	–	–	–
ساکارز (g/l)	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۱۰	۱۰	۱۰
مالتوز (g/l)	–	–	–	–	–	–	۱۰	۱۰	۱۰

به هر ۵۰ سی‌سی محیط کشت مایع، ۱ گرم کالوس اضافه شد. محیط‌های مایع در درون شیکر انکوباتور با دور ۱۱۵rpm و در دمای ۲۵° C و با شدت نور ۳۵^{1} $\mu Em^{-2}s^{-}$ و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به‌مدت ۱٤ روز قرار داده شدند. بعد از طی زمان لازم، جهت بررسی تأثیر تیمارهای فوق بر کمیت و کیفیت جنین‌های حاصل، محیط کشت سوسپانسیون غربال شده و جنین‌های رویشی به محیط کشت نمو جامد انتخابی Boi2Y (Bingham *et al.*, 1972) با دمای ۲۵° C، شدت نور $۳۵\mu Em^{-2}s^{-1}$ و دوره نوری ۸-۱٦ انتقال داده شدند. بعد از ۱۰ روز و در پایان این مرحله تعداد جنین کروی، قلبی، خنجری و لپه‌ای شکل مربوط به هر یک از محیط‌های کشت سوسپانسیون در هر پتری به‌طور جداگانه شمارش و ثبت گردید (شکل ۱).

نتایج

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌های اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری را (در سطح احتمال ۱٪) بین تمامی تیمارها نشان داد (جدول۲).



شکل ۱- مراحل مختلف نمو جنین از کالوس. الف- مرحله کروی شکل؛ ب- مرحله قلبی شکل؛ ج- جنین خنجری شکل؛ د- مرحله لپه ای شکل جنین؛ ه- جنین بالغ؛ و- جنین در مرحله خشک کردن

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس تأثیر محیط کشت سوسپانسیون، نوع ریزنمونه و اثر متقابل این دو بر تعداد جنین کروی، قلبی، خنجری و لپه‌ای شکل حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

منابع تغییر	درجه آزادی	مرحله کروی	مرحله قلبی	مرحله خنجری	مرحله لپه ای
انواع محیط کشت سوسپانسیون	۸	۱۶۲۲/۳۷**	۶۸۰/۹۳**	۶۰۵۳/۷۳**	۵۱۹۵/۵۶**
ریزنمونه	۳	۲۱۲۶۹/۵۹**	۳۷۱۶/۱۳**	۲۵۹۷۷/۲۵**	۱۸۱۱۰/۱۳**
محیط کشت سوسپانسیون × ریزنمونه	۲۴	۹۸۸/۳۵**	۳۸۱/۹**	۲۵۳۸/۴۳**	۲۰۶۱/۷۷**
خطای آزمایش	۱۴۴	۱۴/۲۹	۲/۷۳	۱۸/۲۹	۲/۷۵
ضریب تغییرات		۱۲/۷۱۴	۱۴/۵۳۰۴۶	۱۳/۹۷۳۷۷	۱۰/۵۴۷۷۶

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد (۱٪)،

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای محیط کشت و ریزنمونه بر روی تعداد جنین کروی، قلبی، خنجری و لپه ای شکل در محیط Boi2Y I با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪

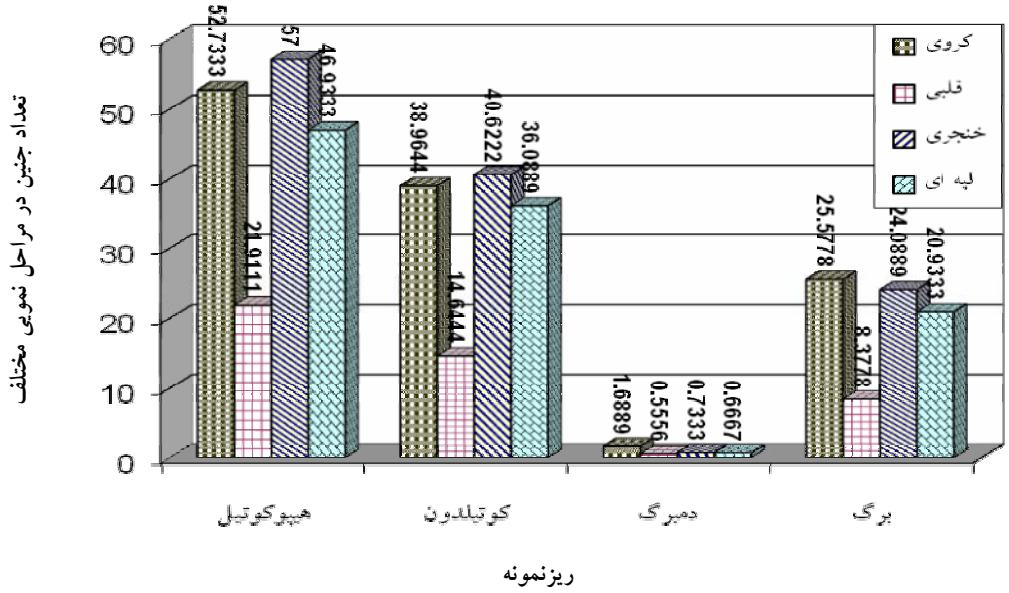
شماره محیط کشت	کروی شکل	شماره محیط کشت	قلبی شکل	شماره محیط کشت	خنجری شکل	شماره محیط کشت	لپه‌ای شکل
۲	۳۸/۲۵A	۲	۲۱A	۸	۵۳/۱۰A	۹	۴۳/۳A
۳	۳۷/۳۵A	۸	۱۶/۰۵B	۹	۵۰/۷۰A	۸	۴۵/۷۰A
۸	۳۶/۲۰A	۹	۱۵/۱BC	۷	۴۴/۳B	۷	۳۹/۸۵B
۷	۳۳/۴۵B	۳	۱۴/۸۵C	۲	۳۶/۳C	۱	۳۱C
۹	۳۳/۱۰B	۴	۱۰/۱۰D	۱	۳۵/۲C	۲	۲۹/۸C
۱	۳۱/۷۷B	۶	۸/۶۵E	۳	۲۰/۰۵D	۳	۱۵/۳D
۴	۲۳/۹۰C	۱	۷/۶۵EF	۶	۱۶/۷E	۴	۱۴/۱D
۶	۲۳/۱۵C	۷	۷/۱F	۴	۱۵/۹E	۶	۱۱/۳E
۵	۱۰/۵۰D	۵	۱/۸۵G	۵	۱۳/۲F	۵	۰/۲F
هیپوکوتیل	۵۲/۷۳A		۲۱/۹۱A		۵۷A		۴۶/۹۳A
کوتیلیدون	۳۸/۹۶B		۱۴/۶۴B		۴۰/۶۲۲B		۳۶/۰۸B
برگ	۲۵/۵۷C		۸/۳۷C		۲۴/۰۸۸۹C		۲۰/۹۳C
دمبرگ	۱/۶۸D		۰/۵۵D		۰/۷۳۳۳D		۰/۶۶D

میانگین‌های دارای حروف لاتین مشترک با همدیگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

بالاترین تعداد جنین کروی در محیط نمو مربوط به محیط‌های کشت سوسپانسیون شماره ۲، ۳ و ۸ (میانگین تعداد جنین در هر پتری به‌ترتیب ۳۸/۲۵، ۳۷/۳۵ و ۳۶/۲) و بیشترین تعداد جنین قلبی در محیط شماره ۲ (میانگین تعداد جنین در هر پتری ۲۱) مشاهده گردید. محیط کشت سوسپانسیون شماره ۸ تأثیر معنی‌داری در افزایش تعداد جنین خنجری شکل در محیط نمو داشت و بیشترین تعداد جنین در مرحله لپه‌ای نیز مربوط به محیط ۸ و ۹

بود (میانگین تعداد جنین در هر پتری به‌ترتیب ۴۵/۷ و ۴۶/۳). کمترین تعداد جنین در تمامی مراحل جنینی در محیط نمو و در محیط کشت سوسپانسیون شماره ۵ مشاهده شد (جدول ۳).

در بررسی تأثیر ریزنمونه بر تعداد جنین‌های حاصل، بیشترین تعداد جنین در تمامی مراحل جنینی مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل و کمترین تعداد متعلق به ریزنمونه دمبرگ بود (نمودار ۱ و جدول ۳).



نمودار ۱- تأثیر نوع ریزنمونه بر تولید مراحل مختلف جنینی در محیط کشت بلوغ-I (تعداد در هر پتری ثبت شده است)

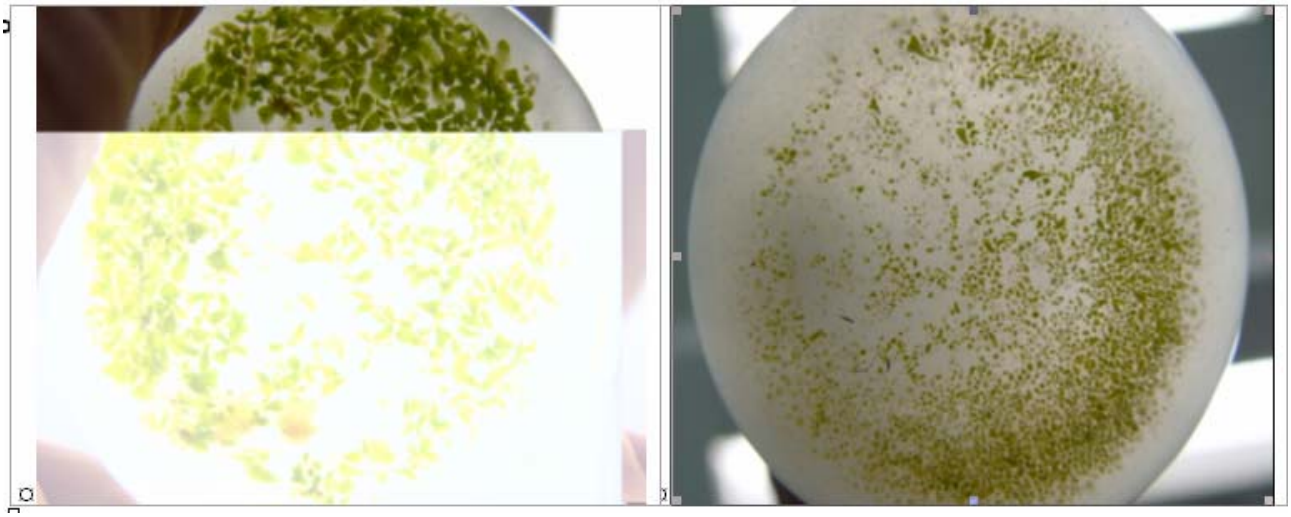
بحث

در این تحقیق غلظت 2,4-D تأثیر به‌سزایی در افزایش تعداد جنین کروی شکل در مرحله سوسپانسیون داشت، به‌نحوی که افزایش غلظت 2,4-D (۱ mgL^{-1}) باعث کاهش تعداد جنین کروی شکل و تبدیل توده‌های پیش‌جنینی به کالوس‌های تمایز نیافته در فاز سوسپانسیون شد. ولی غلظت کم 2,4-D منجر به تکثیر توده‌های پیش‌جنینی به توده‌های پیش‌جنینی جدید گردید (جدول ۳). بیشترین تعداد جنین در تمامی مراحل جنینی (جنین کروی، قلبی، خنجری و لپه‌ای شکل) در محیط‌های با غلظت کم 2,4-D (۰/۵ mgL^{-1}) شمارش شد. در لگوم‌ها، به استثنای چند گونه، اکسین‌ها جنین‌زایی رویشی را القاء می‌کنند. پاسخ لگوم‌ها به اکسین‌های مختلف بستگی به نوع اکسین استفاده شده دارد (Turgut-Kara & Sule, 2008). در یونجه 2,4-D یکی از قوی‌ترین اکسین‌هایی است که در القاء کالوس‌زایی و تشکیل جنین سوماتیکی نقش دارد (Taji & Lakshmanan, 2000). علاوه بر این، نتایج آزمایشات Stuart و همکاران (۱۹۸۵) بر روی کشت سوسپانسیون یونجه با غلظت بالای 2,4-D (۱۱ mgL^{-1}) نشان داد که میزان بالای 2,4-D منجر به تولید جنین‌های رویشی می‌گردد، اما این جنین‌ها حاوی پروتئین‌های دانه‌ای کمتری بودند و دامنه نگهداری آنها نیز نسبت به جنین‌های رویشی حاصل از کشت سوسپانسیون با غلظت کمتر 2,4-D (۵/۵ mgL^{-1}) بسیار پایین‌تر بود.

وجود کینتین در محیط مایع (محیط‌های ۳، ٦ و ۹) اثر معنی‌داری بر تبدیل توده‌های پیش‌جنینی به جنین رویشی نسبت به محیط‌های بدون کینتین داشت. طبق بررسی‌های انجام شده توسط Ivanova و همکاران (۱۹۹٤)، سطح هورمون سیتوکینین در جنین‌های کروی شکل لاین‌های جنین‌زا بیش از لاین‌های با جنین‌زایی پایین می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد وجود کینتین در محیط مایع در نمو توده‌های پیش‌جنینی به جنین کروی شکل نقش داشته باشد.

در محیط‌های حاوی مالتوز، تعداد جنین خنجری و لپه‌ای شکل به‌طور معنی‌داری بیش از سایر محیط‌ها شمارش شد (جدول ۳). به نحوی که بیش از ۹۰٪ جنین‌های رویشی شمارش شده در محیط‌های حاوی مالتوز، در مرحله خنجری شکل بودند (شکل ۲). به‌علاوه، این جنین‌های خنجری شکل در محیط بلوغ نسبت به جنین‌های خنجری شکل دیگر محیط‌های کشت سوسپانسیون بزرگ‌تر بوده و از رشد بهتری برخوردار بودند. به‌نظر می‌رسد مالتوز علاوه بر اثر القایی در فاز القاء کالوس، بر نمو جنین نیز نقش دارد.

وجود مالتوز در محیط کشت مایع باعث بلوغ توده‌های پیش‌جنینی به جنین کروی، قلبی، خنجری و نهایتاً جنین لپه‌ای شکل می‌گردد. مالتوز در فاز القاء جنین بهتر از سایر کربوهیدرات‌ها در محیط کشت عمل می‌کند و در القاء جنین‌زایی علاوه بر یونجه بر روی گیاهانی چون جو، مارچوبه و صنوبر نیز موثر است (Blanc *et al*., 2002). به نظر می‌رسد مالتوز خود به تنهایی به‌عنوان یک سیگنال عمل کرده و باعث تغییر برنامه‌های نمویی سلول می‌گردد. Scott و همکاران (۱۹۹۵) اثر مثبت مالتوز بر القای جنین‌زایی رویشی را به واسطه هیدرولیز آهسته مالتوز مشاهده کردند، که باعث کمبود کربن در سلول می‌گردد. علاوه‌براین، فرضیه‌ای مبنی بر نقش مالتوز در کاهش جذب سلول و در نتیجه کاهش جذب کربوهیدرات‌ها به‌وسیله سلول ارائه داده است. کاهش کربوهیدرات‌ها در سلول منجر به ایجاد سیگنالی می‌گردد که در برنامه‌ریزی مجدد رشد و نمو سلولی نقش دارد (Koch, 1996).



شکل ۲- مقایسه کشت‌های سوسپانسیون محیط‌های دارای مالتوز (سمت چپ) و بدون مالتوز (سمت راست). همانطور که در شکل دیده می‌شود جنین‌های رویشی در محیط حاوی مالتوز از نمو بهتری برخوردار بوده و بیش از ۹۰ درصد جنین‌های رویشی موجود در مرحله خنجری شکل قرار دارند (شکل سمت چپ). در حالی‌که جنین‌ها در محیط‌های بدون مالتوز در مرحله کروی شکل هستند (شکل سمت راست).

استفاده از گلوتامین و سرین در این آزمایش در فاز سوسپانسیون بر تبدیل توده‌های پیش‌جنینی به جنین کروی، قلبی، خنجری و لپه‌ای شکل تأثیر منفی داشت (جدول ۳). اما McKersie و همکاران (۱۹۹٤) نشان دادند که نیاز مبرمی به ۵-اکسی پرولین یا گلوتامین به‌عنوان منبع نیتروژن در زمان بلوغ جنین‌های رویشی وجود دارد. هنوز اطلاعاتی در این‌باره که آیا گلوتامین به‌عنوان مناسب‌ترین فرم نیتروژن انتقالی و متابولیسمی است یا نقش تنظیمی در متابولیسم‌های جنینی دارد، وجود ندارد. به‌نظر می‌رسد در مرحله تبدیل توده‌های پیش‌جنینی به جنین، نسبت آمونیوم به نیترات تأثیر بسزایی دارد. به نحوی که القاء جنین‌زایی در نسبت ۱:۱ NO3:NH3 به طور معنی‌داری بیش از (٪۹۰) نسبت ۱:۲ NO3:NH3 (٪۳۸) گزارش شده است (Hofmann *et al.*, 2004). به‌نظر می‌رسد گلوتامین و سرین به‌عنوان منبع نیتروژن احیاء شده در محیط عمل می‌کنند. وجود عامل آمونیومی در ساختار این اسید آمینه‌ها باعث افزایش نسبت آمونیوم به نیترات در محیط می‌گردد. شاید این دلیل اصلی کاهش نمو توده‌های پیش‌جنینی به جنین رویشی در کشت‌های سوسپانسیون حاوی اسید آمینه می‌باشد. احتمالاً نسبت نیترات به آمونیوم بیش از هر عامل غذایی و هورمونی در کشت سوسپانسیون تأثیر دارد. به‌نحوی که با وجود همسانی محیط‌های کشت ۱، ۲ و ۳ (بدون اسید آمینه) با محیط‌های ٤، ۵ و ٦ (حاوی اسید آمینه) از لحاظ هورمونی، وجود گلوتامین و سرین اثر تنظیم کننده‌های رشدی را به طور معنی‌داری کاهش داده است.

با توجه به اینکه آنچه که برای ما نهایتاً اهمیت دارد تعداد جنین بالغ آماده برای جوانه‌زنی بدست آمده در مرحله انتهایی بلوغ و آماده برای جوانه‌زنی و رویش می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت بدون در نظر گرفتن نوع ریزنمونه، بهترین محیط‌های کشت سوسپانسیون محیط‌هایی هستند که بیشترین تعداد جنین لپه‌ای شکل را باعث گردیده‌اند (آخرین مرحله نمو جنین). در بین ۹ محیط کشت سوسپانسیون آزمایشی این نتیجه به‌طور آشکار در محیط‌های حاوی مالتوز به خصوص محیط شماره ۸ دیده شد.

برخلاف بیشتر تحقیقات انجام شده در زمینه جنین‌زایی رویشی یونجه که ریزنمونه دمبرگ را به‌عنوان یکی از بهترین ریزنمونه‌ها معرفی کرده‌اند، در آزمایش ما کمترین پاسخ را بین ریزنمونه‌های بررسی شده داشته است. بنابراین، تفاوت آشکار در پاسخ ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت اشاره شده در تولید جنین رویشی، بر ضرورت بررسی بیشتر بر روی نوع ریزنمونه تاکید دارد.

منابع مورد استفاده

– Backs- Husemann, A., Reinert, J., Kitto S. and Janick, J., 1970. Embryobildung durch isolierte einzelzellen aus gewebackuluren von *Daucus carota*. Protoplasma, 70:36-90.

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

– Blanc, G., Lardet, L., Martine, A., Jacob, J.L. and Carron, M.P., 2002. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis*. Journal of Experimental Botany, 53(373): 1453-1462.

– Drew, R.L.K., 1980. Simple apparatus for growing large batches of plant tissue in submerged liquid culture. Plant Science Letters, 17: 227-236.

– Esfandiari S., Hasanli A.M., Farshadfar M., and Safari H., 2008. Comparing five medic species for yield and physiologic triats in rainfed conditiond at Kermanshah province. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 16: 285-294.

– Farshadfar, M., Fareghi, S.H., Farshadfar, E., and Jafari., A. A., 2008. Study of genetic variation in *Medicago sativa* L. using morphological

– McKersie, B.D. and Bowley, S.R., 1993. Synthetic seeds in alfalfa. In Synseeds Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press Boca Raton, pp: 231-255.
– McKersie, B.D., Van Acker, S. and Lai, F., 1994. Maturation and Desiccation of Somatic Embryos. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 30: 152-169.
– Murashige T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Plant Physiology, 15: 473-497.
– Redenbaugh, K., Fujii, J.A. and Slade, D., 1991. Synthetic Seed Technology. In Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, 8: 35-74.
– Schenk, B.U. and Hildebrandt, A.C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. Canadian Journal of Botany, 50: 199-204.
– Scott, P., Lyne, R.L. and Rees, T., 1995. Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.). Planta., 197: 113-121.
– Stuart, D.A., Nelson, J.M., Strickland, S.G. and Nichol, J.W., 1985. Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures. Tissue culture in forestry and agriculture. pp: 59–73.
– 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(9): 1250-1255.
biochemical indices. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 16:128-132.
– Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
– Hofmann, N., Nelson, R.L. and Kobran, S.S., 2004. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 77(2): 157-163.
– Ivanova, A., Velcheva, M., Denchev, P., Van Onckelen, H. and Atanassov, A., 1994. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falkata*. Plant Physiology, 92: 85–89.
– Koch, K.E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47: 509-540.
– Kurz, W.G.W., Wetter, L.R.Y. and Constabel, F., 1982. A bioreactor system for the Continuous culture of plant cells. Plant Tissue Culture Methods, 2: 112-117.
– Lakshmanan, P. and Taji, A., 2000. Somatic embryogenesis in leguminous plants. Plant Biology, 2: 136-148.
– Lupotto, E., 1986. The use of single somatic embryo culture in propagating and regeneration Lucerne (*Medicago sativa* L.). Annals of botany, 57:19-24.
– Martin, S. M. 1980. Mass culture system for plant cell suspensions. Plant tissue culture as a source of Biochemicals. CRC Press, Boca Raton, pp: 149-166.

Effects of several plant growth regulators, carbon source and amino acids on somatic embryos obtained from embryogenic cell suspension culture of alfalfa *(Medicago sativa* L.)

A. Pezeshki[1], M. Ebrahimi*[2], M. Khayyam Nekuei[3] and S. Kadkhodaei[4]

1- M.Sc., Mazandaran University
2*- Corresponding author, M.Sc., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Central region
Email: o_m_abrahimi@yahoo.com
3- Assos. Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Central region
4- M.Sc., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Central region

Received: 03.11.2009 Accepted: 13.06.2010

Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is one of the most important forage crops in the world that have a significant role in forage supplying, nitrogen fixation and reduction of soil erosion. The species is self-incompatible and cross pollinate, so maintenance and propagation of desired genotypes are difficult and production of pure and hemogeneous seeds is faced with difficulties. Somatic embryogenesis is one of the most useful techniques that can help us to solve the problems. Therefore, recognition of the affecting factors on somatic embryogenesis is important. This study was aimed to evaluate the effects of two growth regulators, 2,4-D (0.5 and 1 mgL^{-1}) and Kinetin (0 and 1 mgL^{-1}), carbon source (sucrose and maltose) and Glutamine and Serine as amino acids, on alfalfa somatic embryogensis in an embryogenic cell suspension culture using 4 explants (hypocotyl, cotyledon, petiole and leaf). The treatments showed significant differences. There was a correlation between 2,4-D concentration and the number of embryos in maturity stage, so that increasing the concentration of 2,4-D resulted in lower number of embryos. Presence of Kinetin in the culture media increased number of somatic embryos, significantly. Despite significant effects of Glutamine and Serine on embryo development, application of these amino acids in suspension culture media decreased the regeneration of somatic embryos in the liquid cultures. Maltose in liquid culture was the most effective agent on the maturity of somatic embryos and increased the number of embryos in embryogenic cell suspension culture. Four types of the examined explants, showed significant differences of embryogenic ability; hypocotyl and petiole explants produced the most and the least number of embryos, respectively.

Key words: Alfalfa, B5 culture medium, Somatic embryogenesis, Cell suspension culture, Growth regulator.