بررسی اثرات ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه بر پینه زایی و باززایی در یونجه

عبدالهادی حسین زاده ، فرزاد جاوید فر، بهمن یزدی صمدی و علیرضا طالعی

به ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۷/۸/۲۰

خلاصه

بمنظور مطالعه اثرات سه عامل ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه در پتانسیل پینه زایی و باززایی یونجه (Medicago sativa L.) تحقیقی در قالب آزمایش فاکتوریل (۲×۳×۱۰) بر پایه طرح کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۷۵ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام گرفت. دو زیر نمونه لپه و زیر لپه از هرکدام از ارقام در سه محیط کشت طبق سه دستورالعمل بینگهام و همکاران (۱)، واکر و ساتو (۱۷) و میجر و براون (۱۰) کشت و صفات حجم پینه ، درصد جنین زایی سوماتیکی و فراوانی جنین زایی اندازه گیری شدند. حجم پینه تولید شده در تمام تیمارها متاثر از اثرات مستقل ومتقابل ژنوتیپ، ریز نمونه و محیط کشت بود. مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین حجم پینه در رقم شیرازی از ریز نمونه لپه در محیط کشت MSH و کمترین حجم پینه در رقم مانوپا از ریز نمونه زیر لپه در محیط کشت MMS حاصل گردید. بطورکلی پینه زایی از ریز نمونه لپه بهتر از ریز نمونه زیر لپه بود. نتایج آزمایشات باززایی نشان داد که باززایی فقط از طریق دستورالعمل واکر و ساتو صورت پذیرفت و مضافا" باززایی بطریقه جنین زایی سوماتیکی بوده و نین ژنوتیپها، ریزنمونه ها و اثر متقابل آنها اختلاف معنی داری در سطح یک درصد وجود داشت . درصد جنین زایی بین ۰ تا ۲۰ درصد متغیر بود و بیشترین درصد جنین زایی در رقم کریساری از ریز نمونه هیپوکوتیل و نیز در رقم مهاجران از ریز نمونه لپه حاصل گردید. چهار رقم کریساری، سمیرچنکایا، همدانی و مانوپا، از ریزنمونه زیر لپه و دو رقم مهاجران و سمیر چناکایا از ریز نمونه لپه باززایی گردیدند.

واژه های کلیدی : یونجه ، پینه زایی ، باززایی ، ریز نمونه ، محیط کشت و ژنوتیپ

مقدمه

یونجه از جمله اولین گیاهان زراعی مهم می باشد که تحقیقات کشت بافت در آن انجام گرفته است . بینگهام و همکاران (۲) و جنسن (۵) گزارش کرده‌اند که از طریق گزینش در سلولهای سوماتیکی در محیط ویترو گزینش برای مقاومت به اتیونین، تحمل به نمک ومقاومت به امراض انجام گرفته است. پیشرفت در کشت بافت یونجه علاوه بر اهمیت زراعی آن به عنوان سیستمی در تحقیقات کشت بافت نیز اهمیت دارد زیرا باززایی در یونجه از طریق جنین‌زایی سوماتیکی صورت می گیرد و محققان فیزیولوژیست ازاین گیاه به عنوان الگویی برای مطالعات جنین زایی بهره می گیرند. جهت استفاده از تکنیک های کشت‌بافت در اصلاح گیاهان و دست ورزی ژنتیکی نه تنها تشکیل و رشد پینه بلکه تمایز پینه ها به گیاهچه چه از طریق عضوزایی یا جنین زایی نیز لازم است. از عوامل موثر در تشکیل پینه و باززایی گیاهچه ها می توان به اثر ژنوتیپ، منبع ریز نمونه و محیط کشت اشاره نمود. در یونجه ژنوتیپ نقش بسیار مهمی در باززایی ایفا می کند. به عنوان مثال در

ریز نمونه ها در محیط کشت MSHI قرار داده شدند. این محیط شامل ترکیبات محیط SH به اضافه ۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و kin بود. واکشت پینه ها در همین محیط به مدت ۱۵ روز انجام گرفت. بعد از این مدت حجم پینه ها با استفاده از روش هوکر اندازه گیری گردید. طبق‌دستورالعمل واکر و ساتو پینه ها جهت تحریک باززایی به دو قطعه ۵ میلی متری تقسیم شده و به محیط کشت MSH2 که شامل ترکیبات محیط SH به اضافه ۱۱/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D ۱/۱ میلی گرم در لیتر Kin بود منتقل شدند. بعد از سه روز پینه ها جهت باززایی به محیط کشت Bio2y منتقل شدند. بعد ازیک ماه درصد جنین زایی سوماتیکی وفراوانی جنین زایی محاسبه گردید. در این روش برای تبدیل جنین های سوماتیکی به گیاهچه، پینه های جنین زا به محیط MSH3 که شامل ترکیبات محیط SH به اضافه ۱۰ میلی گرم در لیتر جیبرلین و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA بود منتقل گردیدند. در دستورالعمل میجر و براون نیزاز یک محیط کشت برای پینه و دو محیط کشت برای باززایی استفاده شد. برای پینه زایی، ریز نمونه ها در محیط کشت MMSI قرار داده شدند. این محیط شامل ترکیبات محیط MS به اضافه ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر kin و ۲ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات بود. پینه های تشکیل شده سپس در همین محیط کشت واکشت گزدیدند. حجم پینه ها سپس با استفاده از روش هوکر اندازه گیری شد. سپس، پینه ها جهت تحریک باززایی به دو قطعه ۵ میلی متری تقسیم شده و به محیط کشت MSH2 منتقل شدند. بعد از سه روز پینه ها جهت باززایی به محیط کشت Bio2y منتقل شدند. بعد از یک ماه درصد جنین زایی سوماتیکی و فراوانی‌جنین زایی محاسبه گردید. در این روش برای تبدیل جنین های سوماتیکی به گیاهچه پینه های جنین زا به محیط MSH3 منتقل گردیدند. در روش میجر و براون نیز از یک محیط کشت برای پینه زایی و دو محیط کشت برای باز زایی استفاده شد. برای پینه زایی ریز نمونه ها در محیط کشت MMSI قرار داده شدند. پینه های تشکیل شده سپس در همین محیط کشت واکشت گردیدند. حجم پینه ها سپس با استفاده از روش هوکر اندازه گیری شد. پینه ها جهت تحریک باززایی به دو قطعه ۵ میلی متری تقسیم و به محیط کشت MMS2 که شامل ترکیبات محیط MS به اضافه ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D, 2 و بنزیل آمینوپورین بود منتقل شدندو بعد از یک ماه اندامهای ریشه و جنین و تعداد آنها در هر پتری یادداشت گردید.

در هر سه روش، در قسمت پینه زایی مجموعا" ۶۰ تیمار در هریک از سه تکرار وجود داشت که هر تیمار شامل ۶ ریز نمونه لپه یا زیر لپه از هر ۱۰ رقم در هر سه محیط کشت بود. در قسمت باززایی مجموعا" ۲۰ تیمار در هر یک از سه تکرار وجودداشت که هر تیمار شامل ۱۲ قطعه پینه از هر زیر نمونه وازهر رقم بود.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده های مربوط به حجم پینه ، بر اساس آزمایش فاکتوریل و در پایه طرح کامل تصادفی با فاکتورهای محیط کشت (۳ سطح) زیر نمونه و (۲ سطح) و رقم (۱۰ سطح) انجام گرفت. بدلیل معنی دار شدن اثرات متقابل، اجزای مقایسه های مستقل با روش مقایسه متعامد تفکیک و در صورت وجود اختلاف معنی دار مقایسه میانگین انجام پذیرفت (۱۶).

درصد جنین زایی سوماتیکی از تقسیم تعداد پینه های جنین زا بر تعداد کل پینه از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید.

۱۰۰ × (تعداد کل پینه / تعداد پینه های جنین زا) = درصد جنین زایی سوماتیکی

محاسبه فراوانی‌جنین زایی نیز از تقسیم تعداد جنین در پینه های جنین زا بر تعداد پینه های جنین زا بوسیله فرمول ذیل انجام گرفت .

۱۰۰ × (تعداد پینه های جنین زا / تعداد جنین درپینه های جنین زا) = درصد فراوانی‌جنین زایی

داده های مربوط به درصد جنین زایی سوماتیکی و فراوانی جنین زایی ابتدا با استفاده از فرمولهای , Arcsin √ X+0/5 Arcsin √ X+0/1 تبدیل و سپس مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند(۴).تجزیه‌های‌آماری بااستفاده ازنرم‌افزار Mstatc, SAS صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

در یونجه، تولید گیاه از طریق کشت بافت غالبا"یک فرآیند دو مرحله ای بوده که در مرحله اول از بافت مورد کشت پینه تولید گشته و در مرحله دوم از پینه طی فرآیند اندام زایی یا جنین زایی گیاهچه تولید می گردد(۷). مطالعات انجام شده در یونجه حاکی از آن است که پینه زایی و باززایی تحت تاثیر عوامل ژنوتیپ، محیط

کشت و زیر نمونه می باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که پینه زایی در همه تیمارها صورت پذیرفت ولی حجم پینه تولید شده متفاوت و تحت تاثیر اثرات مستقل و متقابل ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه بود (جدول ۱). مقایسه میانگین های حجم پینه نشان داد که بیشترین حجم پینه توسط رقم شیرازی از ریز نمونه لپه و در محیط کشت MSH1 و کمترین حجم پینه توسط رقم مائوپا از ریز نمونه زیر لپه و در محیط کشت MMS1 تولید گردید (جدول ۲). معنی دار شدن اثرات متقابل سه گانه نشان دهنده این مطلب است که برای هر ژنوتیپ بایستی از محیط کشت و ریز نمونه بخصوصی جهت تولید پینه استفاده نمود. ولی بطور کلی می توان گفت که تولید پینه از ریز نمونه لپه بهتر از ریز نمونه زیر لپه بوده و نیز محیط های MSH1 و MMS1 جهت پینه زایی برتر بودند. این نتایج با یافته های لوپرتو (۸) هماهنگی داشته ولی با نتایج گزارش شده توسط براون و اتانوسف (۳) که اختلاف معنی داری بین ریز نمونه ها مشاهده نکردند مغایرت دارد. نتایج بدست آمده در مورد تاثیر ژنوتیپ بر پتانسیل پینه زایی در این مطالعه در تائید گزارشات کیت و همکاران (٦) و اسکارپا و همکاران (۱۳) می باشد.

نتایج مربوط به جنین زایی نشان دادند که تنها دستورالعمل واکر و ساتو که در آن پینه ابتدا در محیط MSH1 تشکیل و سپس به مدت سه روز در محیط MSH2 و بعدا" به مدت یک ماه در محیط Bio2y و نهایتا" بمدت ۱۰ روز در محیط MSH3 قرار داده می شدند منجر به جنین زایی گردید.بررسی محتویات محیط های مورد استفاده نشانگر این است که برای جنین زایی در یونجه محیط SH همراه با هورمونهای 2 ,4-D و NAA بایستی جهت تشکیل پینه مورد استفاده قرار گیرد. بینگهام و همکاران گزارش کردند که نسبت اکسین ها و سیتوکنین ها در محیط پینه زایی تاثیر بسیار زیادی در جنین زایی ایفا می کنند. نتایج حاصله توسط واکر و ساتو (۱۷) میتن و همکاران (۱۱) و اسکوکوت و همکاران (۱۵) دال بر این است که برای باززایی بایستی ابتدا پینه در محیط کشت حاوی 2 ,4-D زیاد و kin کم تشکیل گشته و سپس به محیط فاقد هورمونهای مذکور انتقال پیدا بکند.

جدول ۱ - تجزیه واریانس مربوط به صفت حجم پینه برای ۱۰ رقم ، ۲ ریز نمونه و ۳ محیط کشت در یونجه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۲	۵/۸**
ریز نمونه	۱	۱۴۷/۴۹**
رقم	۹	۶/۶۷۲**
ریزنمونه × محیط	۲	۱۶/۲۳**
محیط × رقم	۱۸	۳/۶۴**
ریز نمونه × رقم	۹	۱/۸۱**
محیط × رقم× ریزنمونه	۱۸	۲/۷۳**
اشتباه آزمایش	۱۲۰	۰/۴۴
کل	۱۷۹	

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد

علاوه بر محیط کشت عوامل رقم ، ریز نمونه و اثرات متقابل آنها تاثیر معنی داری بر درصد جنین زایی و فراوانی‌جنین زایی داشتند (جدول ۳) . از ده رقم مورد استفاده تنها شش رقم قادر به جنین زایی بودند. مقایسه میانگین درصد جنین زایی نشان داد که واکنش جنین زایی ارقام در محدوده صفر تا بیست درصد بود (جدول ۴). در میان ارقام، رقم کریساری از ریز نمونه زیر لپه و رقم مهاجران از ریز نمونه لپه با بیست درصد بالاترین درصد جنین زایی را دارا بودند. از نظر فراوانی‌جنین زایی نیز ارقام واکنش های متفاوتی را نشان دادند (جدول ۴). تعداد جنین در ارقام مختلف در محدوده ۳ تا ۷ بود. رقم کریساری با میانگین ۷ جنین از ریز نمونه زیر لپه و رقم سمیرجنیکایا با میانگین ۳ جنین از ریز نمونه لپه بترتیب بیشترین و کمترین فراوانی‌جنین زایی را دارا بودند. در بقیه ارقام جنین زایی‌مشاهده نگردید.

در ارتباط با تاثیر ریزنمونه، نتایج نشان دادند که به غیر از یک مورد در بقیه حالات ریز نمونه زیر لپه از نظر پتانسیل جنین زایی برتر از ریز نمونه لپه بود که این مغایر با نتایج بدست آمده در مورد صفت حجم پینه می باشد. از نتایج بدست آمده در مورد پتانسیل پینه زایی و جنین زایی ریز نمونه های لپه و زیر لپه می توان نتیجه گرفت که کیفیت پینه و هورمونهایی که در محیط تشکیل پینه وجود دارند در جنین زایی موثر بوده و حجم پینه تاثیر مهمی در پتانسیل جنین‌زایی ندارد.لوپوتو(۸) نتایج مشابه‌ای را گزارش کرده است.

تبدیل جنین های سوماتیکی به گیاهچه با اندام هوایی و ریشه مناسب که قادر به ادامه حیات در محیط طبیعی، باشند مرحله نهایی

جدول ۲ - مقایسه میانگین مربوط به صفت حجم پینه برای ۱۰ رقم، ۲ ریزنمونه و ۳ محیط کشت در یونجه. مقایسه میانگینها با استفاده از روش دانکن صورت گرفت . میانگین هایی که دارای حروف مشابه (در ستون) هستند تفاوت معنی داری در سطح احتمالی ۵٪ ندارند.

	محیط کشت					
	Bll		MSH1		MMS1	
رقم	لپه	زیر لپه	لپه	زیر لپه	لپه	زیر لپه
شیرازی	۱۸/۴۵A	۱۶/۲۵AB	۲۰/۱۹A	۱۶/۶۳AB	۱۷/۶۲C	۱۳/۶۳C
همدانی	۱۵/۶۹DE	۱۵/۰۳CDE	۱۸/۵۵B	۱۵/۴۹BCD	۱۷/۲۰C	۱۵/۹۱AB
یزدی	۱۶/۴۶CD	۱۶/۰۷ABC	۱۸/۳۶B	۱۶/۳۶AB	۱۹/۵۵A	۱۵/۳۳AB
بمی	۱۶/۴۲CD	۱۶/۶۰A	۱۷/۹۵BC	۱۵/۳۳CD	۱۷/۰۷C	۱۵/۲۶AB
بغدادی	۱۵/۱۹E	۱۴/۹۲DE	۱۷/۴۳BCD	۱۵/۷۵BC	۱۸/۸۸AB	۱۵/۳۶AB
مهاجران	۱۷/۷۳AB	۱۵/۵۰ABCDE	۱۷/۰۸AB	۱۶/۶۱AB	۱۸/۹۳AB	۱۶/۰۰AB
کریساری	۱۵/۳۶DE	۱۴/۷۱E	۱۶/۹۶CDE	۱۷/۵۱A	۱۷/۴۹C	۱۵/۰۰B
رنجر	۱۷/۳۸BC	۱۵/۰۸CDE	۱۶/۴۵DE	۱۴/۷۵CD	۱۶/۸۲C	۱۶/۲۸E
سمیرچنکایا	۱۵/۵۰DE	۱۵/۸۵ABCD	۱۶/۰۵E	۱۵/۳۱CD	۱۷/۳۳C	۱۳/۳۶C
مائوپا	۱۶/۲۳DE	۱۵/۲۴BCDE	۱۴/۶۹F	۱۴/۴۴D	۱۷/۸۷BC	۱۳/۱۷C

Bll : شامل ترکیبات محیط Blaydes به اضافه دو میلی گرم در لیتر از هورمونهای KIN, 2.4.D, NAA

MSH1 : شامل ترکیبات محیط SH به اضافه ۵ میلی گرم در لیتر NAA و دو میلی گرم در لیتر KIN, 2.4.D

MMS1 : شامل ترکیبات محیط MS به اضافه دو میلی گرم در لیتر 2.4.D ۰/۲۵ میلی گرم درلیتر KIN و دو گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات

این آزمایش بود. مشاهدات نشان داد که جنین های تولید شده پس از قرار گرفتن در محیط MSH3 اغلب تولید ساقه و ریشه کردند (شکل ۱). تعداد گیاهچه های بدست آمده رابطه مستقیمی با فراوانی‌جنین زایی داشت. به عبارت دیگر با افزایش تعداد جنین ها در پینه های جنین زا، تبدیل جنین به گیاهچه با میزان، سرعت و کیفیت بیشتری همراه بود. یادداشت برداریهای کمی که موید مشاهدات کیفی می توانست باشد به علت اختلال در سیستم برقی انکوباتور که منجر به نابودی اغلب گیاهچه گشت متاسفانه کامل صورت نگرفت و نتیجتا" مورد استفاده قرار نگرفتند.

اصلاح یونجه با استفاده از کشت بافت وابسته به سهولت باززایی گیاه می باشدو سهولات باززایی خود در گرو دو عامل مهم ژنوتیپ و روش کشت می باشد. در این آزمایش ژنوتیپهای مورد استفاده که اهم ژنوتیپهای مهم ایران را تشکیل میدادند دارای پتانسیل باززایی پائینی بودند. افزایش ژنتیکی پتانسیل باززایی از طریق روشهای معمول اصلاحی قابل حصول می باشد.بینهگام و همکاران (۲) توانستند با دو چرخه انتخاب دوره ای توان باززایی ارقامی از یونجه را از ۱۲ درصد به ۶۷ درصد افزایش دهند. آنها بر این باورند که این پیشرفت سریع نتیجه توارث پذیری بالای این صفت می باشد. بنابراین افزایش ژنتیکی پتانسیل باز زائی ارقام یونجه ایرانی به همراه بهینه کردن روشهای کشت بافت جهت استفاده روتین این روش در اصلاح یونجه ضروری بوده و پیشنهاد می گردد که در اولویتهای تحقیقاتی آینده این گیاه قرار بگیرد.

جدول ۳ - تجزیه واریانس مربوط به صفات درصد جنین زایی و فراوانی جنین زایی برای ۱۰ رقم و ۲ ریز نمونه در یونجه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین‌مربعات	
		جنین زایی	فراوانی‌جنین‌زایی
		%	
ریزنمونه	۱	۶۷/۵۲**	۲/۵۸**
رقم	۹	۷/۷۳**	۱/۶۳**
ریزنمونه × رقم	۹	۹۵/۸۹**	۱/۳۱**
اشتباه آزمایش	۴۰	۰/۹۴	۰/۰۰۵۸

** معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱

شکل ۱ - الف- جنین زایی سوماتیکی و شروع تبدیل جنین ها به گیاهچه
ب - تبدیل جنین های سوماتیکی به گیاهچه
پ - رشد گیاهچه در تیوب قبل از انتقال به گلخانه

جدول ۴ - مقایسه میانگین درصد جنین زایی و فراوانی جنین زایی برای ده رقم و دو ریز نمونه در یونجه .

رقم	ریز نمونه زیر لپه		رقم	ریز نمونه لپه	
	فراوانی جنین زائی	جنین زائی ٪		فراوانی جنین زائی	جنین زائی ٪
کریساری	۷a	۲۰a	مهاجران	۵a	۲۰a
سمیرچنکایا	۶b	۱۲b	سمیرچنکایا	۳b	۵b
همدانی	۵c	۱۰c	بمی	۰c	۰c
مائوپا	۴d	۱۰c	شیرازی	۰c	۰c
بمی	۰d	۰d	یزدی	۰c	۰c
شیرازی	۰d	۰d	مائوپا	۰c	۰c
رنجر	۰d	۰d	رنجر	۰c	۰c
بغدادی	۰d	۰d	همدانی	۰c	۰c
یزدی	۰d	۰d	بغدادی	۰c	۰c
مهاجران	۰d	۰d	کریساری	۰c	۰c

- میانگین های دارای حروف مشابه (در ستون ها) با استفاده از روش دانکن اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ ندارند

REFERENCES

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

2 - Bingham , E.T., T.J. Mc.Coy, and K.A. Walker. 1989. Alfalfa tissue culture in: alfalfa and alfalfa improverment. Madison, American society of Agronomy, Crop Science Society of America.

3 - Brown, D.C.W. and A. Atanassou.1985. Role of genetic background in somatic embryogensis in Medicago. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 42: 111-122.

4 - Compton, M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 37:217-242.

5 - Jensen, C.D. 1981. Uses of cell and tissue culture techniques in plant breedings and genetics. P. 87. 104. In: Vasil, I.K., Perspective in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytology, supplement 113. Academic Press. New York.

6 - Kith, A., Walker, Poli, C. Yu, Shirley, J, Sato, and E.G. Jaworski. 1978. The hormonal control of organ formation in class of Medicago sative cultured in vitro. Amer.J. Bot. 65: 654-659.

7 - Kristen Finstad, C.W. Paniek, Brown, Kejoy. 1993. Charaterization of competence during induction of somatic embryogenesis in a alfalfa tissue culture. Plant Cell,

Tissue and Organ Culture. 34: 125-132.

8 - Lupotto, E. 1982. Propagation of an embryogenic culture of Medicago sativa. Zeitschrift far Pflanzepy Siologie. 111 : 95-104.

9 - Nagarajon, P., D.S. Mckenzie, and P. O. Walton. 1986. Embryogenesis and plant regeneration of Medicago spp. Plant Cell Reports, 5:77-80.

10- Meijer, E.G.M. and P.C.W. Brown. 1985. Screening of diploid Medicago sativa germplasm for somatic embryogenesis. Plant Cell reports:258-288.

11- Mitten, D.H., S.J. Sato and T.A. Skokut. 1984. In vitro regenerative potential of alfalfa germplasm sources. Crop Sci:943-945.

12- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15:473-497.

13- Scarpa, G.M. F. Pupilli, F. Damiani and S. Arcicoi 1993. Plant regeneration from callus and protoplasts in Medicago polymorpha. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 35:49-57.

14- Schenk, R.R. and A.C. Hildebrand. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell. Can. J.Bot. 50:199-204.

15- Skokut, T.A., J. Manchester, and J. Schefer.1985. Regeneration in alfalfa tissue culture. Stimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15 NMR determination of nitrogen utilization. Plant Physiology. 79:579-583.

16- Steel, R.G. and J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedure of Statistics, A Biometerical Approach. Second ed. Mc. Graw hill Co., New York.

17 - Walker, K.A. and S.J. Sato 1981. Morphogenesis in callus tissue of Medicago sativa. The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1:109-121.

Iranian J. Agric. Sci. Vol. 29 No. 3 1998

Effects of Genotype, Medium and Explant on Callus Induction and Plant Regeneration in Alfalfa

A. H. HOSSAINZADEH, F. JAVIDFAR, B. YAZDI-SAMADI AND A. R. TALEEI

Assistant Professor, Former Graduate Student, Professor and Associate Professor

College of Agriculture University of Tehran Karaj, IRan.

Accepted 11 Nov 1998

SUMMARY

The effects of genotype, culture medium, and explant on callus initiation and plant regeneration were studied using a factorial experiment in a complete randomized design with three replications. Cotyledon and hypocotyl explants were excised from the seedling of each alfalfa cultivars and processed for callus formation and regeneration according to procedures suggested by Bingham and Saunders, Walker and Sato , and Meijer and Brown. Callus volume, Percentage of somatic embryos and regeneration efficiency were measured. Callus formed on all treatments but its volume was significantly affected by each of the three factors and their interactions. Mean comparisons showed that the largest callus volume was obtained from cotyledon explant of cultivar Shirazy in MSH1 medium and the smallest callus volume from hypocotyl explant of Moapa cultivar in MMS medium. In general, callus produced from cotyledon explant was larger than that produced from hypocotyl explants. Results of plant regeneration showed that only Walker and Sato procedure regenerated plant via somatic embryogenesis. Effects of explant, genotype and their interactions were significant at 0.01 level. Percent of somatic embryos was between 0 to 20% with highest belonging to the hypocotyl explant of cultivar Crisary and lowest belonging to coytledon explant of cultivar Mohajeran. Hamadany, Crisary, Semirchankaya, and Moapa cultivars were regenerated from hypocotyl explants while cultivars Mohajeran and Semirchankaya were regenerated from cotyledon explants.

Key Words: Alfalfa, Callus, Regeneration, Explant, Medium & Genotype

Iranian J. Agric. Sci. Vol. 29 No. 3 1998

Effects of Genotype, Medium and Explant on Callus Induction and Plant Regeneration in Alfalfa

A. H. HOSSAINZADEH, F. JAVIDFAR, B. YAZDI-SAMADI AND A. R. TALEEI

Assistant Professor, Former Graduate Student, Professor and Associate Professor

College of Agriculture University of Tehran Karaj, IRan.

Accepted 11 Nov 1998

SUMMARY

The effects of genotype, culture medium, and explant on callus initiation and plant regeneration were studied using a factorial experiment in a complete randomized design with three replications. Cotyledon and hypocotyl explants were excised from the seedling of each alfalfa cultivars and processed for callus formation and regeneration according to procedures suggested by Bingham and Saunders, Walker and Sato , and Meijer and Brown. Callus volume, Percentage of somatic embryos and regeneration efficiency were measured. Callus formed on all treatments but its volume was significantly affected by each of the three factors and their interactions. Mean comparisons showed that the largest callus volume was obtained from cotyledon explant of cultivar Shirazy in MSH1 medium and the smallest callus volume from hypocotyl explant of Moapa cultivar in MMS medium. In general, callus produced from cotyledon explant was larger than that produced from hypocotyl explants. Results of plant regeneration showed that only Walker and Sato procedure regenerated plant via somatic embryogenesis. Effects of explant, genotype and their interactions were significant at 0.01 level. Percent of somatic embryos was between 0 to 20% with highest belonging to the hypocotyl explant of cultivar Crisary and lowest belonging to coytledon explant of cultivar Mohajeran. Hamadany, Crisary, Semirchankaya, and Moapa cultivars were regenerated from hypocotyl explants while cultivars Mohajeran and Semirchankaya were regenerated from cotyledon explants.

Key Words: Alfalfa, Callus, Regeneration, Explant, Medium & Genotype

بررسی اثرات ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه بر پینه زایی و باززایی در یونجه

عبدالهادی حسین زاده ، فرزاد جاوید فر، بهمن یزدی صمدی و علیرضا طالعی

به ترتیب استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۷/۸/۲۰

خلاصه

بمنظور مطالعه اثرات سه عامل ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه در پتانسیل پینه زایی و باززایی یونجه (Medicago sativa L.) تحقیقی در قالب آزمایش فاکتوریل (۲×۳×۱۰) بر پایه طرح کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۷۵ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام گرفت. دو زیر نمونه لپه و زیر لپه از هرکدام از ارقام در سه محیط کشت طبق سه دستورالعمل بینگهام و همکاران (۱)، واکر و ساتو (۱۷) و میجر و براون (۱۰) کشت و صفات حجم پینه ، درصد جنین زایی سوماتیکی و فراوانی جنین زایی اندازه گیری شدند. حجم پینه تولید شده در تمام تیمارها متاثر از اثرات مستقل ومتقابل ژنوتیپ، ریز نمونه و محیط کشت بود. مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین حجم پینه در رقم شیرازی از ریز نمونه لپه در محیط کشت MSH و کمترین حجم پینه در رقم مانوپا از ریز نمونه زیر لپه در محیط کشت MMS حاصل گردید. بطورکلی پینه زایی از ریز نمونه لپه بهتر از ریز نمونه زیر لپه بود. نتایج آزمایشات باززایی نشان داد که باززایی فقط از طریق دستورالعمل واکر و ساتو صورت پذیرفت و مضافا" باززایی بطریقه جنین زایی سوماتیکی بوده و نین ژنوتیپها، ریزنمونه ها و اثر متقابل آنها اختلاف معنی داری در سطح یک درصد وجود داشت . درصد جنین زایی بین ۰ تا ۲۰ درصد متغیر بود و بیشترین درصد جنین زایی در رقم کریساری از ریز نمونه هیپوکوتیل و نیز در رقم مهاجران از ریز نمونه لپه حاصل گردید. چهار رقم کریساری، سمیرچنکایا، همدانی و مانوپا، از ریزنمونه زیر لپه و دو رقم مهاجران و سمیر چناکایا از ریز نمونه لپه باززایی گردیدند.

واژه های کلیدی : یونجه ، پینه زایی ، باززایی ، ریز نمونه ، محیط کشت و ژنوتیپ

مقدمه

یونجه از جمله اولین گیاهان زراعی مهم می باشد که تحقیقات کشت بافت در آن انجام گرفته است . بینگهام و همکاران (۲) و جنسن (۵) گزارش کرده‌اند که از طریق گزینش در سلولهای سوماتیکی در محیط ویترو گزینش برای مقاومت به اتیونین، تحمل به نمک ومقاومت به امراض انجام گرفته است. پیشرفت در کشت بافت یونجه علاوه بر اهمیت زراعی آن به عنوان سیستمی در تحقیقات کشت بافت نیز اهمیت دارد زیرا باززایی در یونجه از طریق جنین‌زایی سوماتیکی صورت می گیرد و محققان فیزیولوژیست ازاین گیاه به عنوان الگویی برای مطالعات جنین زایی بهره می گیرند. جهت استفاده از تکنیک های کشت‌بافت در اصلاح گیاهان و دست ورزی ژنتیکی نه تنها تشکیل و رشد پینه بلکه تمایز پینه ها به گیاهچه چه از طریق عضوزایی یا جنین زایی نیز لازم است. از عوامل موثر در تشکیل پینه و باززایی گیاهچه ها می توان به اثر ژنوتیپ، منبع ریز نمونه و محیط کشت اشاره نمود. در یونجه ژنوتیپ نقش بسیار مهمی در باززایی ایفا می کند. به عنوان مثال در

ریز نمونه ها در محیط کشت MSHI قرار داده شدند. این محیط شامل ترکیبات محیط SH به اضافه ۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و kin بود. واکشت پینه ها در همین محیط به مدت ۱۵ روز انجام گرفت. بعد از این مدت حجم پینه ها با استفاده از روش هوکر اندازه گیری گردید. طبق‌دستورالعمل واکر و ساتو پینه ها جهت تحریک باززایی به دو قطعه ۵ میلی متری تقسیم شده و به محیط کشت MSH2 که شامل ترکیبات محیط SH به اضافه ۱۱/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D ۱/۱ میلی گرم در لیتر Kin بود منتقل شدند. بعد از سه روز پینه ها جهت باززایی به محیط کشت Bio2y منتقل شدند. بعد ازیک ماه درصد جنین زایی سوماتیکی وفراوانی جنین زایی محاسبه گردید. در این روش برای تبدیل جنین های سوماتیکی به گیاهچه، پینه های جنین زا به محیط MSH3 که شامل ترکیبات محیط SH به اضافه ۱۰ میلی گرم در لیتر جیبرلین و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA بود منتقل گردیدند. در دستورالعمل میجر و براون نیزاز یک محیط کشت برای پینه و دو محیط کشت برای باززایی استفاده شد. برای پینه زایی، ریز نمونه ها در محیط کشت MMSI قرار داده شدند. این محیط شامل ترکیبات محیط MS به اضافه ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D، ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر kin و ۲ گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات بود. پینه های تشکیل شده سپس در همین محیط کشت واکشت گزدیدند. حجم پینه ها سپس با استفاده از روش هوکر اندازه گیری شد. سپس، پینه ها جهت تحریک باززایی به دو قطعه ۵ میلی متری تقسیم شده و به محیط کشت MSH2 منتقل شدند. بعد از سه روز پینه ها جهت باززایی به محیط کشت Bio2y منتقل شدند. بعد از یک ماه درصد جنین زایی سوماتیکی و فراوانی‌جنین زایی محاسبه گردید. در این روش برای تبدیل جنین های سوماتیکی به گیاهچه پینه های جنین زا به محیط MSH3 منتقل گردیدند. در روش میجر و براون نیز از یک محیط کشت برای پینه زایی و دو محیط کشت برای باز زایی استفاده شد. برای پینه زایی ریز نمونه ها در محیط کشت MMSI قرار داده شدند. پینه های تشکیل شده سپس در همین محیط کشت واکشت گردیدند. حجم پینه ها سپس با استفاده از روش هوکر اندازه گیری شد. پینه ها جهت تحریک باززایی به دو قطعه ۵ میلی متری تقسیم و به محیط کشت MMS2 که شامل ترکیبات محیط MS به اضافه ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D, 2 و بنزیل آمینوپورین بود منتقل شدندو بعد از یک ماه اندامهای ریشه و جنین و تعداد آنها در هر پتری یادداشت گردید.

در هر سه روش، در قسمت پینه زایی مجموعا" ۶۰ تیمار در هریک از سه تکرار وجود داشت که هر تیمار شامل ۶ ریز نمونه لپه یا زیر لپه از هر ۱۰ رقم در هر سه محیط کشت بود. در قسمت باززایی مجموعا" ۲۰ تیمار در هر یک از سه تکرار وجودداشت که هر تیمار شامل ۱۲ قطعه پینه از هر زیر نمونه وازهر رقم بود.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده های مربوط به حجم پینه ، بر اساس آزمایش فاکتوریل و در پایه طرح کامل تصادفی با فاکتورهای محیط کشت (۳ سطح) زیر نمونه و (۲ سطح) و رقم (۱۰ سطح) انجام گرفت. بدلیل معنی دار شدن اثرات متقابل، اجزای مقایسه های مستقل با روش مقایسه متعامد تفکیک و در صورت وجود اختلاف معنی دار مقایسه میانگین انجام پذیرفت (۱۶).

درصد جنین زایی سوماتیکی از تقسیم تعداد پینه های جنین زا بر تعداد کل پینه از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید.

۱۰۰ × (تعداد کل پینه / تعداد پینه های جنین زا) = درصد جنین زایی سوماتیکی

محاسبه فراوانی‌جنین زایی نیز از تقسیم تعداد جنین در پینه های جنین زا بر تعداد پینه های جنین زا بوسیله فرمول ذیل انجام گرفت .

۱۰۰ × (تعداد پینه های جنین زا / تعداد جنین درپینه های جنین زا) = درصد فراوانی‌جنین زایی

داده های مربوط به درصد جنین زایی سوماتیکی و فراوانی جنین زایی ابتدا با استفاده از فرمولهای , Arcsin √ X+0/5 Arcsin √ X+0/1 تبدیل و سپس مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند(۴).تجزیه‌های‌آماری بااستفاده ازنرم‌افزار Mstatc, SAS صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

در یونجه، تولید گیاه از طریق کشت بافت غالبا"یک فرآیند دو مرحله ای بوده که در مرحله اول از بافت مورد کشت پینه تولید گشته و در مرحله دوم از پینه طی فرآیند اندام زایی یا جنین زایی گیاهچه تولید می گردد(۷). مطالعات انجام شده در یونجه حاکی از آن است که پینه زایی و باززایی تحت تاثیر عوامل ژنوتیپ، محیط

کشت و زیر نمونه می باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که پینه زایی در همه تیمارها صورت پذیرفت ولی حجم پینه تولید شده متفاوت و تحت تاثیر اثرات مستقل و متقابل ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه بود (جدول ۱). مقایسه میانگین های حجم پینه نشان داد که بیشترین حجم پینه توسط رقم شیرازی از ریز نمونه لپه و در محیط کشت MSH1 و کمترین حجم پینه توسط رقم مائوپا از ریز نمونه زیر لپه و در محیط کشت MMS1 تولید گردید (جدول ۲). معنی دار شدن اثرات متقابل سه گانه نشان دهنده این مطلب است که برای هر ژنوتیپ بایستی از محیط کشت و ریز نمونه بخصوصی جهت تولید پینه استفاده نمود. ولی بطور کلی می توان گفت که تولید پینه از ریز نمونه لپه بهتر از ریز نمونه زیر لپه بوده و نیز محیط های MSH1 و MMS1 جهت پینه زایی برتر بودند. این نتایج با یافته های لوپرتو (۸) هماهنگی داشته ولی با نتایج گزارش شده توسط براون و اتانوسف (۳) که اختلاف معنی داری بین ریز نمونه ها مشاهده نکردند مغایرت دارد. نتایج بدست آمده در مورد تاثیر ژنوتیپ بر پتانسیل پینه زایی در این مطالعه در تائید گزارشات کیت و همکاران (٦) و اسکارپا و همکاران (۱۳) می باشد.

نتایج مربوط به جنین زایی نشان دادند که تنها دستورالعمل واکر و ساتو که در آن پینه ابتدا در محیط MSH1 تشکیل و سپس به مدت سه روز در محیط MSH2 و بعدا" به مدت یک ماه در محیط Bio2y و نهایتا" بمدت ۱۰ روز در محیط MSH3 قرار داده می شدند منجر به جنین زایی گردید.بررسی محتویات محیط های مورد استفاده نشانگر این است که برای جنین زایی در یونجه محیط SH همراه با هورمونهای 2 ,4-D و NAA بایستی جهت تشکیل پینه مورد استفاده قرار گیرد. بینگهام و همکاران گزارش کردند که نسبت اکسین ها و سیتوکنین ها در محیط پینه زایی تاثیر بسیار زیادی در جنین زایی ایفا می کنند. نتایج حاصله توسط واکر و ساتو (۱۷) میتن و همکاران (۱۱) و اسکوکوت و همکاران (۱۵) دال بر این است که برای باززایی بایستی ابتدا پینه در محیط کشت حاوی 2 ,4-D زیاد و kin کم تشکیل گشته و سپس به محیط فاقد هورمونهای مذکور انتقال پیدا بکند.

جدول ۱ - تجزیه واریانس مربوط به صفت حجم پینه برای ۱۰ رقم ، ۲ ریز نمونه و ۳ محیط کشت در یونجه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۲	۵/۸**
ریز نمونه	۱	۱۴۷/۴۹**
رقم	۹	۶/۶۷۲**
ریزنمونه × محیط	۲	۱۶/۲۳**
محیط × رقم	۱۸	۳/۶۴**
ریز نمونه × رقم	۹	۱/۸۱**
محیط × رقم× ریزنمونه	۱۸	۲/۷۳**
اشتباه آزمایش	۱۲۰	۰/۴۴
کل	۱۷۹	

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد

علاوه بر محیط کشت عوامل رقم ، ریز نمونه و اثرات متقابل آنها تاثیر معنی داری بر درصد جنین زایی و فراوانی‌جنین زایی داشتند (جدول ۳) . از ده رقم مورد استفاده تنها شش رقم قادر به جنین زایی بودند. مقایسه میانگین درصد جنین زایی نشان داد که واکنش جنین زایی ارقام در محدوده صفر تا بیست درصد بود (جدول ۴). در میان ارقام، رقم کریساری از ریز نمونه زیر لپه و رقم مهاجران از ریز نمونه لپه با بیست درصد بالاترین درصد جنین زایی را دارا بودند. از نظر فراوانی‌جنین زایی نیز ارقام واکنش های متفاوتی را نشان دادند (جدول ۴). تعداد جنین در ارقام مختلف در محدوده ۳ تا ۷ بود. رقم کریساری با میانگین ۷ جنین از ریز نمونه زیر لپه و رقم سمیرجنیکایا با میانگین ۳ جنین از ریز نمونه لپه بترتیب بیشترین و کمترین فراوانی‌جنین زایی را دارا بودند. در بقیه ارقام جنین زایی‌مشاهده نگردید.

در ارتباط با تاثیر ریزنمونه، نتایج نشان دادند که به غیر از یک مورد در بقیه حالات ریز نمونه زیر لپه از نظر پتانسیل جنین زایی برتر از ریز نمونه لپه بود که این مغایر با نتایج بدست آمده در مورد صفت حجم پینه می باشد. از نتایج بدست آمده در مورد پتانسیل پینه زایی و جنین زایی ریز نمونه های لپه و زیر لپه می توان نتیجه گرفت که کیفیت پینه و هورمونهایی که در محیط تشکیل پینه وجود دارند در جنین زایی موثر بوده و حجم پینه تاثیر مهمی در پتانسیل جنین‌زایی ندارد.لوپوتو(۸) نتایج مشابه‌ای را گزارش کرده است.

تبدیل جنین های سوماتیکی به گیاهچه با اندام هوایی و ریشه مناسب که قادر به ادامه حیات در محیط طبیعی، باشند مرحله نهایی

جدول ۲ - مقایسه میانگین مربوط به صفت حجم پینه برای ۱۰ رقم، ۲ ریزنمونه و ۳ محیط کشت در یونجه. مقایسه میانگینها با استفاده از روش دانکن صورت گرفت . میانگین هایی که دارای حروف مشابه (در ستون) هستند تفاوت معنی داری در سطح احتمالی ۵٪ ندارند.

	محیط کشت					
	Bll		MSH1		MMS1	
رقم	لپه	زیر لپه	لپه	زیر لپه	لپه	زیر لپه
شیرازی	۱۸/۴۵A	۱۶/۲۵AB	۲۰/۱۹A	۱۶/۶۳AB	۱۷/۶۲C	۱۳/۶۳C
همدانی	۱۵/۶۹DE	۱۵/۰۳CDE	۱۸/۵۵B	۱۵/۴۹BCD	۱۷/۲۰C	۱۵/۹۱AB
یزدی	۱۶/۴۶CD	۱۶/۰۷ABC	۱۸/۳۶B	۱۶/۳۶AB	۱۹/۵۵A	۱۵/۳۳AB
بمی	۱۶/۴۲CD	۱۶/۶۰A	۱۷/۹۵BC	۱۵/۳۳CD	۱۷/۰۷C	۱۵/۲۶AB
بغدادی	۱۵/۱۹E	۱۴/۹۲DE	۱۷/۴۳BCD	۱۵/۷۵BC	۱۸/۸۸AB	۱۵/۳۶AB
مهاجران	۱۷/۷۳AB	۱۵/۵۰ABCDE	۱۷/۰۸AB	۱۶/۶۱AB	۱۸/۹۳AB	۱۶/۰۰AB
کریساری	۱۵/۳۶DE	۱۴/۷۱E	۱۶/۹۶CDE	۱۷/۵۱A	۱۷/۴۹C	۱۵/۰۰B
رنجر	۱۷/۳۸BC	۱۵/۰۸CDE	۱۶/۴۵DE	۱۴/۷۵CD	۱۶/۸۲C	۱۶/۲۸E
سمیرچنکایا	۱۵/۵۰DE	۱۵/۸۵ABCD	۱۶/۰۵E	۱۵/۳۱CD	۱۷/۳۳C	۱۳/۳۶C
مائوپا	۱۶/۲۳DE	۱۵/۲۴BCDE	۱۴/۶۹F	۱۴/۴۴D	۱۷/۸۷BC	۱۳/۱۷C

Bll : شامل ترکیبات محیط Blaydes به اضافه دو میلی گرم در لیتر از هورمونهای KIN, 2.4.D, NAA

MSH1 : شامل ترکیبات محیط SH به اضافه ۵ میلی گرم در لیتر NAA و دو میلی گرم در لیتر KIN, 2.4.D

MMS1 : شامل ترکیبات محیط MS به اضافه دو میلی گرم در لیتر 2.4.D ۰/۲۵ میلی گرم درلیتر KIN و دو گرم در لیتر کازئین هیدرولیزات

این آزمایش بود. مشاهدات نشان داد که جنین های تولید شده پس از قرار گرفتن در محیط MSH3 اغلب تولید ساقه و ریشه کردند (شکل ۱). تعداد گیاهچه های بدست آمده رابطه مستقیمی با فراوانی‌جنین زایی داشت. به عبارت دیگر با افزایش تعداد جنین ها در پینه های جنین زا، تبدیل جنین به گیاهچه با میزان، سرعت و کیفیت بیشتری همراه بود. یادداشت برداریهای کمی که موید مشاهدات کیفی می توانست باشد به علت اختلال در سیستم برقی انکوباتور که منجر به نابودی اغلب گیاهچه گشت متاسفانه کامل صورت نگرفت و نتیجتا" مورد استفاده قرار نگرفتند.

اصلاح یونجه با استفاده از کشت بافت وابسته به سهولت باززایی گیاه می باشدو سهولات باززایی خود در گرو دو عامل مهم ژنوتیپ و روش کشت می باشد. در این آزمایش ژنوتیپهای مورد استفاده که اهم ژنوتیپهای مهم ایران را تشکیل میدادند دارای پتانسیل باززایی پائینی بودند. افزایش ژنتیکی پتانسیل باززایی از طریق روشهای معمول اصلاحی قابل حصول می باشد.بینهگام و همکاران (۲) توانستند با دو چرخه انتخاب دوره ای توان باززایی ارقامی از یونجه را از ۱۲ درصد به ۶۷ درصد افزایش دهند. آنها بر این باورند که این پیشرفت سریع نتیجه توارث پذیری بالای این صفت می باشد. بنابراین افزایش ژنتیکی پتانسیل باز زائی ارقام یونجه ایرانی به همراه بهینه کردن روشهای کشت بافت جهت استفاده روتین این روش در اصلاح یونجه ضروری بوده و پیشنهاد می گردد که در اولویتهای تحقیقاتی آینده این گیاه قرار بگیرد.

جدول ۳ - تجزیه واریانس مربوط به صفات درصد جنین زایی و فراوانی جنین زایی برای ۱۰ رقم و ۲ ریز نمونه در یونجه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین‌مربعات	
		جنین زایی	فراوانی‌جنین‌زایی
		%	
ریزنمونه	۱	۶۷/۵۲**	۲/۵۸**
رقم	۹	۷/۷۳**	۱/۶۳**
ریزنمونه × رقم	۹	۹۵/۸۹**	۱/۳۱**
اشتباه آزمایش	۴۰	۰/۹۴	۰/۰۰۵۸

** معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱

شکل ۱ - الف- جنین زایی سوماتیکی و شروع تبدیل جنین ها به گیاهچه
ب - تبدیل جنین های سوماتیکی به گیاهچه
پ - رشد گیاهچه در تیوب قبل از انتقال به گلخانه

جدول ۴ - مقایسه میانگین درصد جنین زایی و فراوانی جنین زایی برای ده رقم و دو ریز نمونه در یونجه .

رقم	ریز نمونه زیر لپه		رقم	ریز نمونه لپه	
	فراوانی جنین زائی	جنین زائی ٪		فراوانی جنین زائی	جنین زائی ٪
کریساری	۷a	۲۰a	مهاجران	۵a	۲۰a
سمیرچنکایا	۶b	۱۲b	سمیرچنکایا	۳b	۵b
همدانی	۵c	۱۰c	بمی	۰c	۰c
مائوپا	۴d	۱۰c	شیرازی	۰c	۰c
بمی	۰d	۰d	یزدی	۰c	۰c
شیرازی	۰d	۰d	مائوپا	۰c	۰c
رنجر	۰d	۰d	رنجر	۰c	۰c
بغدادی	۰d	۰d	همدانی	۰c	۰c
یزدی	۰d	۰d	بغدادی	۰c	۰c
مهاجران	۰d	۰d	کریساری	۰c	۰c

- میانگین های دارای حروف مشابه (در ستون ها) با استفاده از روش دانکن اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ ندارند

REFERENCES

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

2 - Bingham , E.T., T.J. Mc.Coy, and K.A. Walker. 1989. Alfalfa tissue culture in: alfalfa and alfalfa improverment. Madison, American society of Agronomy, Crop Science Society of America.

3 - Brown, D.C.W. and A. Atanassou.1985. Role of genetic background in somatic embryogensis in Medicago. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 42: 111-122.

4 - Compton, M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 37:217-242.

5 - Jensen, C.D. 1981. Uses of cell and tissue culture techniques in plant breedings and genetics. P. 87. 104. In: Vasil, I.K., Perspective in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytology, supplement 113. Academic Press. New York.

6 - Kith, A., Walker, Poli, C. Yu, Shirley, J, Sato, and E.G. Jaworski. 1978. The hormonal control of organ formation in class of Medicago sative cultured in vitro. Amer.J. Bot. 65: 654-659.

7 - Kristen Finstad, C.W. Paniek, Brown, Kejoy. 1993. Charaterization of competence during induction of somatic embryogenesis in a alfalfa tissue culture. Plant Cell,

Tissue and Organ Culture. 34: 125-132.

8 - Lupotto, E. 1982. Propagation of an embryogenic culture of Medicago sativa. Zeitschrift far Pflanzepy Siologie. 111 : 95-104.

9 - Nagarajon, P., D.S. Mckenzie, and P. O. Walton. 1986. Embryogenesis and plant regeneration of Medicago spp. Plant Cell Reports, 5:77-80.

10- Meijer, E.G.M. and P.C.W. Brown. 1985. Screening of diploid Medicago sativa germplasm for somatic embryogenesis. Plant Cell reports:258-288.

11- Mitten, D.H., S.J. Sato and T.A. Skokut. 1984. In vitro regenerative potential of alfalfa germplasm sources. Crop Sci:943-945.

12- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15:473-497.

13- Scarpa, G.M. F. Pupilli, F. Damiani and S. Arcicoi 1993. Plant regeneration from callus and protoplasts in Medicago polymorpha. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 35:49-57.

14- Schenk, R.R. and A.C. Hildebrand. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell. Can. J.Bot. 50:199-204.

15- Skokut, T.A., J. Manchester, and J. Schefer.1985. Regeneration in alfalfa tissue culture. Stimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15 NMR determination of nitrogen utilization. Plant Physiology. 79:579-583.

16- Steel, R.G. and J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedure of Statistics, A Biometerical Approach. Second ed. Mc. Graw hill Co., New York.

17 - Walker, K.A. and S.J. Sato 1981. Morphogenesis in callus tissue of Medicago sativa. The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 1:109-121.

Iranian J. Agric. Sci. Vol. 29 No. 3 1998

Effects of Genotype, Medium and Explant on Callus Induction and Plant Regeneration in Alfalfa

A. H. HOSSAINZADEH, F. JAVIDFAR, B. YAZDI-SAMADI AND A. R. TALEEI

Assistant Professor, Former Graduate Student, Professor and Associate Professor

College of Agriculture University of Tehran Karaj, IRan.

Accepted 11 Nov 1998

SUMMARY

The effects of genotype, culture medium, and explant on callus initiation and plant regeneration were studied using a factorial experiment in a complete randomized design with three replications. Cotyledon and hypocotyl explants were excised from the seedling of each alfalfa cultivars and processed for callus formation and regeneration according to procedures suggested by Bingham and Saunders, Walker and Sato , and Meijer and Brown. Callus volume, Percentage of somatic embryos and regeneration efficiency were measured. Callus formed on all treatments but its volume was significantly affected by each of the three factors and their interactions. Mean comparisons showed that the largest callus volume was obtained from cotyledon explant of cultivar Shirazy in MSH1 medium and the smallest callus volume from hypocotyl explant of Moapa cultivar in MMS medium. In general, callus produced from cotyledon explant was larger than that produced from hypocotyl explants. Results of plant regeneration showed that only Walker and Sato procedure regenerated plant via somatic embryogenesis. Effects of explant, genotype and their interactions were significant at 0.01 level. Percent of somatic embryos was between 0 to 20% with highest belonging to the hypocotyl explant of cultivar Crisary and lowest belonging to coytledon explant of cultivar Mohajeran. Hamadany, Crisary, Semirchankaya, and Moapa cultivars were regenerated from hypocotyl explants while cultivars Mohajeran and Semirchankaya were regenerated from cotyledon explants.

Key Words: Alfalfa, Callus, Regeneration, Explant, Medium & Genotype

Iranian J. Agric. Sci. Vol. 29 No. 3 1998

Effects of Genotype, Medium and Explant on Callus Induction and Plant Regeneration in Alfalfa

A. H. HOSSAINZADEH, F. JAVIDFAR, B. YAZDI-SAMADI AND A. R. TALEEI

Assistant Professor, Former Graduate Student, Professor and Associate Professor

College of Agriculture University of Tehran Karaj, IRan.

Accepted 11 Nov 1998

SUMMARY

The effects of genotype, culture medium, and explant on callus initiation and plant regeneration were studied using a factorial experiment in a complete randomized design with three replications. Cotyledon and hypocotyl explants were excised from the seedling of each alfalfa cultivars and processed for callus formation and regeneration according to procedures suggested by Bingham and Saunders, Walker and Sato , and Meijer and Brown. Callus volume, Percentage of somatic embryos and regeneration efficiency were measured. Callus formed on all treatments but its volume was significantly affected by each of the three factors and their interactions. Mean comparisons showed that the largest callus volume was obtained from cotyledon explant of cultivar Shirazy in MSH1 medium and the smallest callus volume from hypocotyl explant of Moapa cultivar in MMS medium. In general, callus produced from cotyledon explant was larger than that produced from hypocotyl explants. Results of plant regeneration showed that only Walker and Sato procedure regenerated plant via somatic embryogenesis. Effects of explant, genotype and their interactions were significant at 0.01 level. Percent of somatic embryos was between 0 to 20% with highest belonging to the hypocotyl explant of cultivar Crisary and lowest belonging to coytledon explant of cultivar Mohajeran. Hamadany, Crisary, Semirchankaya, and Moapa cultivars were regenerated from hypocotyl explants while cultivars Mohajeran and Semirchankaya were regenerated from cotyledon explants.

Key Words: Alfalfa, Callus, Regeneration, Explant, Medium & Genotype