Archive of SID

زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره هفتم، بهار ۱۳۹۰، صفحه ۷۳ - ۸۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۷/۰۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۰/۰۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۸۹/۱۲/۰۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۲/۱۴

تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر جنین‌زایی سوماتیکی با استفاده از کشت لایه نازک سلولی هیپوکوتیل یونجه، رقم‌های Karysary و Rangelander

عامر محمدی نسب، علیرضا مطلبی آذر*[1]، رحمت اله پرندین [2]
[1] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[2] گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور، تهران ۴۶۹۷ – ۱۹۳۹۵، ج. ا. ایران

چکیده

این تحقیق برای بررسی پاسخ‌های ریخت‌زایی لایه نازک سلولی هیپوکوتیل دو رقم یونجه (Karysary و Rangelander) و نیز بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر جنین‌زایی سوماتیکی انجام گرفت. بذور استریل روی محیط‌کشت SH کشت شدند. پس از یک هفته قطعات هیپوکوتیل به دست آمده در اندازه‌های ۰/۱ میلی‌متر برش داده شده، به محیط‌کشت SH حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D منتقل گردیدند. کالوس‌های حاصل به محیط‌کشت القای جنین با ۴ غلظت مختلف 2,4-D (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ میلی‌گرم در لیتر) و ۱ میلی‌گرم در لیتر kin انتقال داده شدند. سپس نمونه‌ها به محیط‌کشت BOi2Y و در نهایت به ½MS منتقل شدند. کالوس‌زایی در همه کشت‌های لایه نازک سلولی هیپوکوتیل مشاهده شد (۱۰۰ درصد). همچنین پس از کالوس‌زایی، رشد کالوس‌ها مستقل از نوع رقم به خوبی انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین غلظت‌های مختلف 2,4-D از نظر درصد جنین‌زایی سوماتیکی و تعداد جنین در هر کالوس اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۱$)؛ به طوری که در ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، بیشترین و در فقدان 2,4-D کمترین درصد جنین‌زایی سوماتیکی و تعداد جنین در هر کالوس مشاهده شد. درصد جنین‌زایی سوماتیکی و تعداد جنین در هر کالوس در رقم Rangelander به طور معنی‌داری بیشتر از رقم Karysary بود. غلظت‌های مختلف 2,4-D و اثر متقابل رقم×2,4-D تأثیر معنی‌داری روی باززایی گیاه داشتند ($p<۰/۰۵$). باززایی گیاه از جنین‌های سوماتیکی در محیط‌کشت فاقد و دارای 2,4-D مشاهده شد. با این حال، در غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D حداکثر باززایی گیاه به دست آمد. بنابراین، غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین نقش را در جنین‌زایی سوماتیکی از لایه نازک سلولی هیپوکوتیل ایفا کردند.

واژه‌های کلیدی: 2,4-D، جنین‌زایی سوماتیکی، کالوس‌زایی، کشت لایه نازک سلولی، یونجه

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: motallebiazar@gmail.com، شماره تماس: ۰۴۱۱۳۳۹۲۰۲۷

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa*) یک گیاه علوفه‌ای با ارزش بوده، در تثبیت نیتروژن از اهمیت خاصی برخوردار است. این گیاه چند ساله، دگرگرده‌افشان، هتروزیگوت و پلی‌پلوییـد است (McCoy and Walker, 1984). در یونجه، درصد کالوس‌زایی به شرایط کشت بافت، به ویژه نوع محیط‌کشت پایه (Tadashi *et al*., 1990)، غلظت و نوع هورمون‌های محیط‌کشت (Walker *et al*., 1978)، ریزنمونه (Okumora *et a*l., 1992) و ژنوتیپ بستگی دارد (Reisch and Bingham, 1980). باززایی یونجه از طریق جنین‌زایی سوماتیکی وابسته به نوع و غلظت منبع 2,4-D (Walker *et al*., 1978)، اکسین (Saunders and Bingham, 1975)، و نیتروژن احیا شده در محیط‌کشت باززایی (Skokut *et al*., 1985) است. اکسین به عنوان یک هورمون گیاهی نقش درخور توجهی در تقسیم و چرخه سلولی و بیان ژن cdc_2 برای تنظیم فعالیت پروتئین کینازها دارد. همچنین، مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که ارتباطی قوی میان جنین‌زایی سوماتیکی با تغییرات شیب pH که به وسیله تنش یا 2,4-D ایجاد شده، وجود دارد. تحت شرایط جنین‌زایی، pH سیتوپلاسم و واکوئل افزایش می‌یابد. فرض بر این است که 2,4-D در غلظت بالا به عنوان یک ماده تنش‌زا عمل می‌کند (Feher *et al*., 2002).

سیستم کشت لایه نازک سلول اجازه مطالعه در زمینه‌های سلول‌شناسی، فیزیولوژی، بیوشیمی و تغییرات مولکولی را که در یک برنامه ریخت‌زایی ویژه اتفاق می‌افتد، می‌دهد. این روش به مطالعه نحوه ریخت‌زایی جنین سوماتیکی، شاخه‌زایی، ریشه‌زایی کمک کرده، احتمالاً در آینده از آن به عنوان واحدهای تکثیر انبوه استفاده خواهد شد. همچنین، بهره‌گیری از سیستم کشت لایه نازک سلولی، تولید گل در شرایط درون شیشه‌ای را امکان‌پذیر ساخته است (Jaime and Teixeire, 2003). ریخت‌زایی در کشت لایه نازک سلولی می‌تواند با کنترل نور، غلظت قند یا الیگوساکاریدها، ترکیب یونی محیط‌کشت، pH و عوامل دیگر انجام شود (Cousson and Tran, 1992).

از جمله مزیت‌های کشت لایه نازک سلولی می‌توان به تعیین دقیق غلظت مؤثر هورمون (های) خارجی برای بررسی فرآیندهای ریخت‌زایی (Tran, 1980)، تشکیل مستقیم شاخساره در ارکیده (Le *et al*., 1999)، تولید، تکثیر و بهبود گیاهان زینتی، دستکاری‌های ژنتیکی (که امکان تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی را می‌دهد) اشاره کرد (Teixeira and Fukai, 2002). همچنین، باززایی و تکثیر از طریق جنین‌زایی سوماتیکی در لیمو و پرتقال از طریق لایه نازک سلولی خامه و کلاله صورت گرفته است (Fiore *et al*., 2002). جنین‌زایی سوماتیکی نیز از طریق کشت لایه نازک سلولی در گیاهان آلو (Steinmacher *et al*., 2007)، کلزا (Shu and Loh, 1991) و گل داوودی (Jaime *et al*., 2003) صورت گرفته است. با توجه به اینکه در یونجه الگوی ریخت‌زایی از لایه نازک سلولی انجام نشده است، لذا هدف از این تحقیق مطالعه نحوه تولید کالوس، مراحل تولید جنین سوماتیکی و تولید گیاهچه از لایه نازک سلولی هیپوکوتیل یونجه (نهال رشد یافته ۶ – ۷ روزه) و نیز تأثیر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر جنین‌زایی سوماتیکی است.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

بذر رقم‌های Karysary و Rangelander از گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه شدند. برای ضد عفونی شدن، بذرها به مدت ۱۲ ساعت در آب جاری غوطه‌ور گردیدند و سپس در محلول‌های یک درصد Tween (دترجنت) (۳ دقیقه)، الکل ۷۰ درصد (۲ دقیقه)، محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (۲۰ دقیقه) قرار گرفتند و در نهایت ۳-۵ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذرهای ضدعفونی شده روی محیط کشت SH بدون هورمون کشت شدند (Schenk and Hildebarendt, 1972). هیپوکوتیل از دانه‌رُست‌های ۶ - ۷ روزه به دست آمد. با استفاده از اسکالپل (زیر دستگاه لوپ) لایه‌های نازک سلولی به ضخامت ۰/۱ میلی‌متری تهیه شد و از قطعات هیپوکوتیل یک سانتی‌متری به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید. سپس لایه‌های نازک سلولی به محیط کشت SH حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D به منظور تولید کالوس انتقال داده شدند و در شرایط تاریکی با دمای ثابت ۲ ± ۲۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. پس از ۴ هفته نمونه‌ها به همان محیط کشت منتقل شدند. هدف از این انتقال رشد بیشتر کالوس برای مراحل بعد و مستعد شدن سلول‌ها بود. پس از این مدت، کالوس‌ها به محیط کشت القای جنین (محیط کشت SH حاوی صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی گرم در لیتر kin)، به مدت ۷ روز انتقال داده شدند. نمونه‌ها سپس به محیط کشت BOi2Y (بدون هورمون) (Bingham *et al.*, 1975) در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی برای نمو جنین انتقال داده شدند و پس از ۴ هفته درصد جنین‌زایی و تعداد جنین در هر کالوس اندازه‌گیری شد. محیط کشت BOi2Y دارای ۱۲/۵ - ۲۰ میلی‌مول NH_4^+ از منبع NO_3NH_4 و گلوتامین است که برای تکامل جنین بسیار مورد نیاز است. جنین‌های سوماتیکی رشد یافته به محیط کشت ½MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر GA_3 برای رشد طولی و تشکیل گیاهچه انتقال داده شدند (مطلبی آذر و جعفری مفید آبادی، ۱۳۷۹). گیاهچه‌های تولیدی به گلدان‌های کوچک حاوی پرلایت منتقل و در شرایط مه افشان برای استقرار و سازگاری نگهداری شدند.

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و در هر پتری‌دیش ۱۵ لایه نازک سلولی (۳ پتری‌دیش یک تکرار) اجرا شد. عامل اول رقم و عامل دوم چهار غلظت 2,4-D بود. تجزیه واریانس صفات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

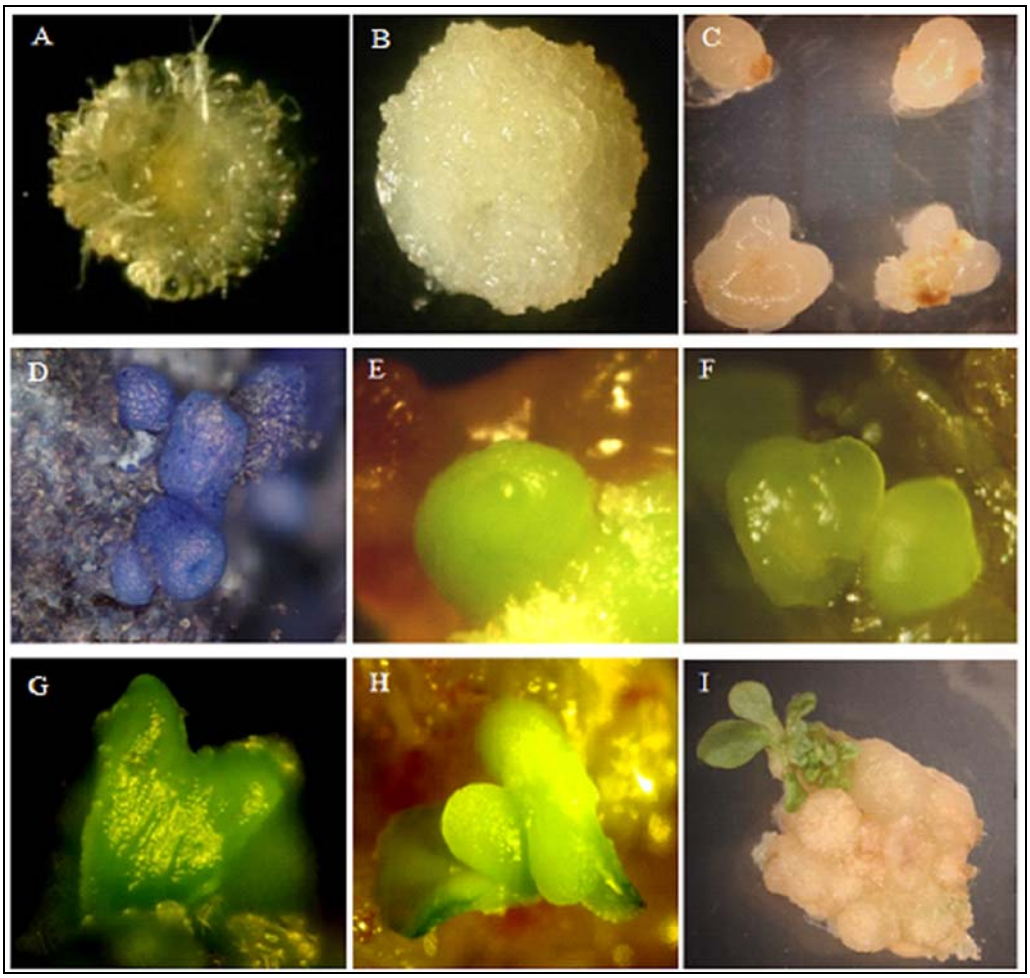
مراحل ریخت‌زایی از کشت لایه نازک سلولی هیپوکوتیل در رقم‌های Karysary و Rangelander پس از ۴ - ۵ روز علایم شروع کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های لایه نازک سلولی بر روی محیط کشت SH مشاهده شد (شکل ۱-A). در همه نمونه‌ها، تشکیل کالوس در شرایط تاریکی به خوبی صورت گرفت.

کالوس‌های ایجاد شده به از نظر شکل ظاهری، نرمی و سفتی بافت، متفاوت بودند. کالوس‌ها بیشتر دارای رنگ کرمی و کمی آبدار بوده، ساختار بافتی آنها به راحتی از هم جدا و قطعه قطعه می‌شد. پس از واکشت، کالوس‌ها به رشد خود ادامه دادند (شکل ۱-B). بسته به غلظت 2,4-D در محیط کشت جنین‌زایی، جنین‌های کروی شکل به طور مستقیم روی ریز نمونه (شکل ۱-C) یا به طور غیر مستقیم روی کالوس‌ها (شکل ۱-D) تولید شد. شکل ۱-D

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ‌آمیزی جنین‌های سوماتیکی با استفاده از آبی متیلن را نشان می‌دهد. جنین‌های کروی پس از انتقال به محیط‌کشت تکامل جنین، مراحل نموی را که شامل جنین کروی سبز (شکل ۱-E)، قلبی شکل (شکل ۱-F)، نیزه‌ای شکل (شکل ۱-G) و لپه‌ای (شکل ۱-H) بود، طی کردند. در نهایت، در محیط‌کشت ½MS حاوی GA_3 گیاهچه تولید شد (شکل ۱-I).



شکل ۱- مراحل آغازش کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی در یونجه رقم Rangelander؛ A) مرحله آغاز کالوس‌زایی از رقم Karysary، ۳ - ۵ روز بعد از کشت؛ B) رشد کالوس در واکشت اول بر روی محیط‌کشت SH؛ C) تشکیل جنین‌زایی سوماتیکی به طور مستقیم بر روی ریز نمونه‌ها و بدون کالوس‌زایی؛ D) تشکیل جنین‌های کروی شکل به طور غیر مستقیم روی کالوس با استفاده از رنگ آمیزی آبی متیلن؛ E) مرحله جنین کروی شکل در محیط‌کشت تکامل جنین BOi2Y؛ F) مرحله قلبی شکل جنین سوماتیکی در محیط‌کشت تکامل جنین BOi2Y؛ G) جنین نیزه‌ای شکل در محیط‌کشت تکامل جنین؛ H) جنین در مرحله لپه‌ای در محیط‌کشت تکامل جنین؛ I) مرحله رشد و نمو جنین سوماتیکی و تشکیل گیاهچه.

کالوس‌زایی در همه ریز نمونه‌های کشت شده به طور کامل انجام شد (۱۰۰ درصد کالوس‌زایی) و رشد کالوس‌های تولیدی در همه واحدهای آزمایشی به طور یکسانی انجام و تفاوت اندکی بین قطر کالوس‌ها از یک ریز نمونه به ریز نمونه دیگر و حتی از یک پتری‌دیش به پتری‌دیش دیگر مشاهده شد. همان طور که در شکل ۲

www.SID.ir

Archive of SID

ملاحظه می‌شود، در هر دو رقم، جنین‌زایی سوماتیکی از کشت لایه نازک سلولی هیپوکوتیل در محیط کشت جنین‌زایی فاقد 2,4-D اتفاق افتاد (ولی با فراوانی کمتر).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف 2,4-D از نظر درصد جنین‌زایی سوماتیکی وجود دارد ($p<۰/۰۱$) (جدول ۱). مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف 2,4-D نشان داد که درصد جنین‌زایی سوماتیکی از نوع رقم هم متأثر شد ($p<۰/۰۱$) (جدول ۱). به طوری که درصد جنین‌زایی سوماتیکی از ۲۰ تا ۵۶ درصد در رقم Karysary و از ۳۲ تا ۶۵ درصد در رقم Rangelander متغیر بود. به عبارت دیگر، رقم Rangelander از درصد جنین‌زایی سوماتیکی بیشتری نسبت به رقم Karysary برخوردار بود (جدول ۲). اثر متقابل 2,4-D و رقم بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی معنی‌دار نبوده ($p<۰/۰۵$)، این دو عامل مستقل از هم بر درصد جنین‌زایی سوماتیکی مؤثر بودند (جدول ۱). در تیمار شاهد (محیط کشت القای جنین فاقد 2,4-D)، درصد جنین‌زایی سوماتیکی در رقم Karysary، ۲۱ درصد و در رقم Rangelander، ۳۸ درصد بود که به طور معنی‌داری از درصد جنین‌زایی سوماتیکی در محیط‌های کشت دارای غلظت‌های 2,4-D، کمتر بود و این امر نشان می‌دهد که وجود 2,4-D برای بهبود و افزایش جنین‌زایی سوماتیکی در یونجه ضروری است (شکل ۲).

تعداد جنین در هر کالوس به طور معنی‌داری از نوع رقم و غلظت‌های مختلف 2,4-D متأثر شد ($p<۰/۰۱$). با این حال، اثر متقابل این دو عامل از نظر تعداد جنین در هر کالوس معنی‌دار نبود (جدول ۱). به عبارت دیگر، غلظت‌های مختلف 2,4-D اثر یکسانی در هر دو رقم از نظر تعداد جنین در هر کالوس داشتند. بر این اساس، در هر دو رقم حداقل تعداد جنین در هر کالوس در غلظت صفر 2,4-D (تیمار شاهد) به دست آمد. با افزایش 2,4-D تا غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، افزایش معنی‌داری در تعداد جنین ملاحظه گردید. در غلظت بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش معنی‌داری از نظر این صفت رخ داد و می‌توان غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر را به عنوان غلظت مناسب برای افزایش تعداد جنین در هر کالوس در نظر گرفت (شکل ۱۱). تعداد جنین تولیدی در هر کالوس از نوع رقم متأثر شده، رقم Rangelander نسبت به Karysary از تعداد جنین در هر کالوس بیشتری برخوردار بود که نشان‌دهنده استعداد ژنتیکی رقم Rangelander است (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در دو رقم و چهار غلظت 2,4-D

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد جنین در هر کالوس	جنین‌زایی سوماتیکی	تعداد گیاه باززایی شده
2,4-D	۳	۱/۰۴۰**	۰/۱۲۹**	۱۷۷/۳۷۵**
رقم	۳	۱/۳۶**	/۱۲۲**	۴/۱۶۷^{ns}
2,4-D × رقم	۳	۰/۱۱۰^{ns}	۰/۸۴۹^{ns}	۶۷/۸۱۹*
خطای آزمایشی	۱۶	۰/۱۶۰۶۹	۲/۳۱	۲۰/۵۶

* و** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد ns غیر معنی‌دار

جدول ۲- متوسط صفات اندازه‌گیری شده در دو رقم یونجه

رقم	تعداد جنین در هر کالوس	جنین‌زایی سوماتیکی (٪)	تعداد گیاه باززایی شده
Karysary	۰/۹۳۴ ±۰/۳۳۸^{b}	۴۴/۵ ± ۱۷/۳^{b}	۱۷/۵۸ ± ۸/۲۲^{a}
Rangelander	۱/۴۱۱ ± ۰/۵۴۷^{a}	۵۸/۸ ± ۲۰/۴^{a}	۱۷/۶۶۷ ±۵/۲۴^{a}

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

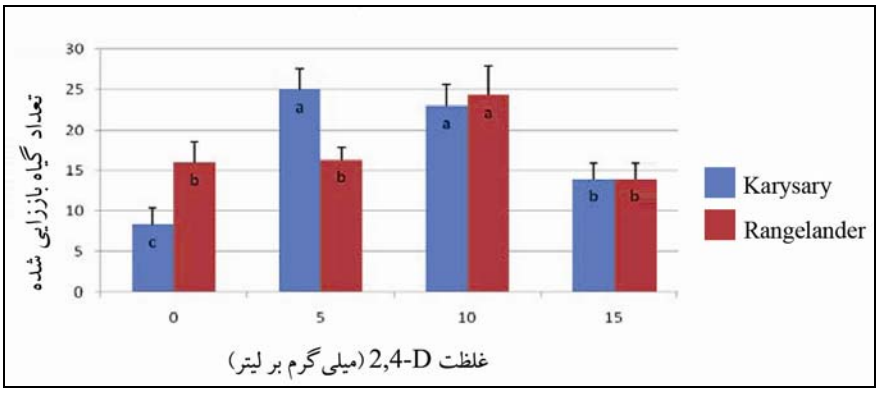
www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های مختلف 2,4-D و اثر متقابل رقم×2,4-D تأثیر معنی‌داری روی بازایی گیاه داشتند ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱). بازایی گیاه از جنین‌های سوماتیکی در محیط کشت فاقد (تیمار شاهد) و دارای 2,4-D مشاهده شد. تعداد گیاه بازایی شده در محیط کشت فاقد 2,4-D (تیمار شاهد) و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر حداقل بوده، با دو غلظت ۵ و ۱۰ که از حداکثر بازایی گیاه بر خوردار بودند، تفاوت معنی‌داری نشان دادند (شکل ۴). بین دو رقم از نظر تعداد گیاه بازایی شده در غلظت صفر و ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D تفاوت معنی‌داری وجود داشت و در دو غلظت دیگر 2,4-D، تعداد گیاه بازایی شده در هر دو رقم یکسان بود و بنابراین، غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین نقش را در جنین‌زایی سوماتیکی از لایه نازک سلولی هیپوکوتیل ایفا کردند (شکل ۴).

شکل۲- متوسط درصد جنین‌زایی سوماتیکی در دو رقم یونجه (Karysary و Rangelander) در غلظت‌های مختلف 2,4-D

شکل ۳- متوسط تعداد جنین در هر کالوس در دو رقم یونجه (Karysary و Rangelander) در غلظت‌های مختلف 2,4-D



شکل ۴- متوسط تعداد گیاه بازایی شده در دو رقم و در غلظت‌های مختلف 2,4-D

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

استفاده از لایه نازک سلولی در مقایسه با ریزنمونه‌های بزرگتر مانند قطعات برگ، هیپوکوتیل، لپه و ... به عنوان یک ریز نمونه که دارای سلول‌های مشابه از نظر سطح داخلی هورمون‌های گیاهی است، می‌تواند مشکلات مربوط به نحوه ریخت‌زایی از سلول‌های گیاهی را بر طرف کرده، و به بررسی دقیق عوامل دخیل در فرآیندهای ریخت‌زایی کمک کند. در این راستا، در تحقیق حاضر، فرآیند ریخت‌زایی از کشت لایه نازک سلولی هیپوکوتیل بررسی گردید. پس از کشت ریز نمونه لایه نازک سلولی در همه ریز نمونه‌ها کالوس‌زایی انجام شد که نشان‌دهنده پاسخ بهتر لایه نازک سلولی به محیط‌کشت کالوس‌زایی است. از طرف دیگر، کشت لایه نازک سلولی به ما اجازه می‌دهد که در کمترین زمان بتوانیم فرآیند جنین‌زایی سوماتیکی را بدون نیاز به رنگ‌آمیزی و تخریب بافت مطالعه کنیم. در این تحقیق، همه مراحل جنین‌زایی سوماتیکی از کالوس مشاهده و بررسی شد. کالوس‌های حاصل به علت جذب سریعتر مواد، نسبت به کالوس‌های حاصل از قطعات بزرگتر رشد بهتری داشتند، بعلاوه، تشکیل جنین از کشت لایه نازک سلولی سریعتر صورت می‌گیرد. در تحقیقی مشابه، مشخص شد که رشد کالوس حاصل از کشت هیپوکوتیل وابسته به نوع ترکیب هورمونی محیط‌کشت بود (مطلبی آذر و جعفری مفید آبادی، ۱۳۷۹). بنابراین، در یونجه، لایه نازک سلولی برای کالوس‌زایی و رشد آن یک ریز نمونه بسیار مناسب است. یکی از دلایل آن می‌تواند نحوه قرارگیری بهتر ریز نمونه و جذب بهتر و سریعتر مواد و ترکیبات شیمیایی محیط‌کشت باشد. بعلاوه برتری سیستم کشت لایه سلولی این است که لایه نازک، حاوی سلول‌های مشابه است و می‌تواند تمام الگوهای ریخت‌زایی را آغاز کند، اما تنها یک الگو را در هر تیمار نشان می‌دهد (Keim and Tran, 1981). با توجه به این که ۲۰ لایه نازک سلولی از هر یک سانتی‌متر هیپوکوتیل به دست می‌آید، لذا تعداد کالوس‌های تولید شده از هر دانه‌رُست افزایش می‌یابد. این در حالی است که در کشت‌های معمولی، یک سانتی‌متر هیپوکوتیل به عنوان یک ریز نمونه به کار می‌رود. علاوه بر این، فراوانی بالا و زمان کوتاه دستیابی به کالوس می‌تواند یکی از مزیت‌های این روش در مطالعات سلولی در یونجه محسوب شود. افزون برآن، زمان دستیابی به کالوس نسبت به حالتی که از قطعات بزرگتر استفاده می‌کنیم نیز کمتر است.

با توجه به اینکه جنین‌زایی سوماتیکی در محیط‌کشت دارا و فاقد 2,4-D انجام شد، بنابراین، این امکان وجود دارد که لایه نازک سلولی هیپوکوتیل، ترکیبات هورمونی لازم برای کالوس‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی را دارا باشد. مطالعات مربوط به کشت لایه نازک سلولی در گونه‌های جنس *Citrus* (Carimi *et al.*, 1999) و کلزا (Shu and Loh, 1991) نشان داد که امکان تولید جنین سوماتیکی در محیط‌کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشدی وجود دارد. با این حال، در سایر گیاهان چنین پدیده‌ای مشاهده نشده است (McCoy and Walker, 1984).

وجود 2,4-D در محیط‌کشت جنین‌زایی به عنوان یک عامل تنش‌زا مطرح بوده، می‌تواند باعث شروع برخی از فرآیندهای مربوط به تشکیل سلول‌های پیش جنینی شود. بنابراین، درصد جنین‌زایی سوماتیکی در تمامی تیمارهای حاوی 2,4-D به طور معنی‌داری بیشتر از محیط‌کشت فاقد این هورمون بود که مؤید اثر مثبت 2,4-D بر جنین‌زایی سوماتیکی است که قبلاً نیز گزارش شده است (McKersie and Brown, 1997). با توجه به منابع موجود،

www.SID.ir

Archive of SID

تولید ریشه و جنین سوماتیکی، از مهمترین مشخصات حضور اکسین در محیط‌های کشت است (احسانپور و امینی، ۱۳۷۹). مطالعات نشان داده است که پاسخ به شرایط محیط‌کشت به نوع رقم نیز مرتبط می‌گردد؛ به طوری که از پنج رقم یونجه در محیط‌کشت SH حاوی 2,4-D بالا و kin پایین، پس از انتقال به محیط‌کشت BOi2Y تنها رقم Rangelander قادر به تولید جنین سوماتیکی بود (Mariza, *et al*., 2003).درصد جنین‌زایی سوماتیکی در تیمارهای حاوی 2,4-D از ۶۳ – ۶۵ درصد متغیر بود و اختلاف معنی‌داری بین سه غلظت ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده نشد و بنابراین، به نظر می‌رسد که برای جنین‌زایی سوماتیکی از کشت لایه نازک سلولی غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D کافی باشد. این در حالی است که درصد جنین‌زایی سوماتیکی از کشت هیپوکوتیل در ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۳۴ درصد، گزارش شده است (مطلبی آذر و جعفری مفید آبادی، ۱۳۷۹). به عبارت دیگر، درصد جنین‌زایی سوماتیکی در کشت‌های هیپوکوتیل کمتر از لایه نازک سلولی هیپوکوتیل است. بالا بودن درصد جنین‌زایی سوماتیکی رقم Rangelander نسبت به رقم Karysary نشان‌دهنده نقش ژنوتیپ گیاه مادری روی پاسخ به کشت بافت است (مطلبی آذر و جعفری مفید آبادی، ۱۳۷۹؛ Hussain *et al*., 2003). با این حال، در این تحقیق، دو رقم مورد بررسی پاسخ‌های مشابهی را به غلظت‌های مختلف 2,4-D نشان دادند.

در صورت فراهم بودن شرایط مناسب برای جنین‌زایی سوماتیکی، معمولاً بیش از یک جنین از سلول‌های کالوس منشأ می‌گیرد و هر چقدر تعداد جنین در هر کالوس بیشتر باشد، محیط‌کشت از لحاظ جنین‌زایی بهینه‌تر است. در این تحقیق، در هر دو رقم ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D از تعداد جنین در هر کالوس بیشتر نسبت به بقیه غلظت‌ها برخوردار بود. باززایی گیاه، آخرین و مهمترین مرحله در کشت بافت گیاهی است و برآیند همه عوامل مؤثر در جنین‌زایی سوماتیکی در تعداد گیاهان باززایی شده تجلی پیدا می‌کند و به نظر می‌رسد که غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با داشتن حداکثر تعداد گیاه کامل تولیدی، می‌تواند غلظت مناسبی برای جنین‌زایی سوماتیکی در هر دو رقم محسوب شود.

جمع‌بندی

نوع ریز نمونه و اثر متقابل آن با نوع ژنوتیپ و ترکیبات هورمونی محیط‌کشت بر کالوس‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی یونجه مؤثرند. تاکنون از لایه نازک سلولی به عنوان ریز نمونه در کشت بافت یونجه استفاده نشده است. این تحقیق نشان داد که با استفاده از کشت لایه نازک سلولی هیپوکوتیل، می‌توان مراحل ریخت‌زایی را در شرایط *in vitro* مشاهده نمود. 2,4-D مهمترین نقش را در جنین‌زایی سوماتیکی یونجه داشته، غلظت‌های مختلف آن واکنش‌های متفاوتی را باعث می‌گردد. در این مطالعه مشخص گردید که در هر دو رقم مورد مطالعه، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D می‌تواند به عنوان غلظت‌های بهینه برای بهبود جنین‌زایی سوماتیکی از کشت لایه نازک سلولی، به کار رود.

منابع

احسانپور،ع و امینی، ف.(۱۳۷۹)کشت سلول و بافت گیاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی، اصفهان.

مطلبی آذر، ع. و جعفری مفید آبادی، ع. (۱۳۷۹) بررسی میزان کالوس‌زایی، جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاه در

www.SID.ir

Archive of SID

جمعیت‌های یونجه ایرانی با استفاده از چهار روش رایج. مجله دانش کشاورزی ۱۰(۲): ۱-۱۲.

Atanassov, A. and Brown, D. C. W. (1984) Plant regeneration from suspension culture and mesophyl protoplasts of *Medicago sativa*. L .Plant Cell Tissue Organ Culture 3:149-162.

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

Carimi, F., Pasquale, F. and Crescimanno, D. (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of citrus. Plant Cell Report 18:935-940.

Cousson, A. and Tran, T. V. K. (1992) Influence of ionic composition of the culture medium on de novo flower formation in tobacco thin cell layers. Canadian Journal of Botany 71:506-511.

Feher, A., Pasternak, T. and Dudits, D. (2002Activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived alfalfa cells: the role of auxin and stress. Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology. Acta Biology szegediensis. 46(3-4): 13-14.

Fiore, S., Pasquale, F. D. Carimi, F. and Sageva, M. (2002) Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverses thin cell layer of Citrus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68:57-63.

Hussain, S. S., Waingwright, S. J. and Merret, M. J. (2003) Regeneration and somaclonal variation In *Medicago sativa* and *Medicago media*. Pakistan Journal of Biological Science 6(9):816-820.

Jaime, A. and Teixeire, D. S. (2003) Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. African Journal of Biotechnology 2(12): 683-691.

Jaime, A., Teixeire, D. S. and Fuka, S. (2003) Chrysanthemum organogensis through thin cell layer technology and plant growth regulator control. Asian Journal of Plant Sciences 2(6): 505-514.

Kiem, M. and Tran, T. V. (1981) Control of morphogenesis in *in vitro* Cultures. Annual review of Plant Physiology 32:291-311.

Le, B. V., Phuong, N. T. Hang, L.T. Anh, H. and Thanh, K. T. V. (1999) High frequency shoot regeneration from *Rhynchostylis gigantean* (orchidaceae) using thin cell layers. Plant Growth Regulation 28: 179-185.

Mariza, M., Beatrize, A. D. G., Jose, M. V. and Calos, A. D. (2003) Plant regeneration from prtoplast of Alfalfa via somatic embryogenesis. Scientia Agrricola 60: 683-689.

McCoy, T. J. and Walker, K. (1984) Alfalfa. In: Hand book of cell culture, Vol. 3 (ed. Ammirato, V.) 171-192. Macmillan Publishing Co. New York.

McKersie, B. D. and Brown, D. C. W. (1997) Biotechnology and the improvement of forage Legumes. CAB Inernational, Wallingford, Oxon, UK.

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

Okumora, K., Oosawa, K. and Takai, T. (1992) Effect of explant sources on somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L). Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences Series 47: 23-28.

Reisch, B. and Bingham, E. T. (1980) The genetic Control of bud formation from callus culture of diploid alfalfa. Plant Science Letter 20:783-77.

Saunders, J. and Bingham, E. T. (1975) Growth regulator effect on bud initiation in callus of *Medicago sativa*. American Journal of Botany 62:850-855.

Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonouse and dicotyledonous. Canadian Journal of Botany. 50:199-204.

www.SID.ir

Archive of SID

Shu, W. B. and Loh, S. C. (1991) Secondary embryogenesis from thin cell layers of *Brassica napus*. New Phytologist 119: 427-432

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

Steinmacher, D. A., Krohn, N. G., Dantas, A. C. M., Stefenon, V. M, Clement, C. R. and Guerra, M. P. (2007) Somatic Embryogenesis in *Peach Palm* Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. Annals of Botany 100: 699-709.

Tadashi, T., Suginobu. T. I. and Ohsugi, R. (1990) Somatic embryogenesis a recalcitrant of alfalfa (*Medicago sativa* L) in an improved medium. Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences Series 44: 15-20.

Teixeira, D. S. J. A. and Fukai, S. (2002) Increasing transient and subsequent stable transgene expression in chrysanthemum (*Dendranthema* x *grandiflora* (Ramat.) Kitamura) following optimization of particle bombardment and Agroinfection parameters. Plant Biotechnology 19: 229-240.

Tran T. V. K. (1980) Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factores in then cell layer. International Review of Cytology 32:291-31.

Walker, K. A., Yu, P. C., Sato, S. J. and Jaworski, E. G. (1978) The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. Cultured *in vitro*. Annual Journal of Botany 65:654-659.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of different concentration of 2,4-D on somatic embryogenesis using thin cell layers (TCL) culture of alfalfa hypocotyls in cv Karysary and Rangerland

Ammer Mohamadi Nasab, Alireza Motallebi Azar *[1] and Rahmatollah Paranadin [2]

[1] Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[2] Department of Biology, Payame Noor University, 19395-4697 Tehran, I. R. of Iran

Abstract

This study was carried out for evaluating morphogenesis responses of hypocotyl thin cell layers (TCL) of two alfalfas cultivars (*Medicago sativa* L. cv. Karysary and Rangelander) and also the effect of different 2,4-D concentrations on somatic embryogenesis was investigated. Sterilized seeds were cultured on SH medium without hormone. After a week, TCL (0.1 mm) obtained from hypocotyl segments were transferred to SH medium containing 2,4-D (1.5 mg/l). Produced calli were transferred to embryogenesis medium (SH medium containing four 2,4-Dconcentrations: 0, 5 , 10, 15 mg/l) and one level of kin (1 mg/l). Then calli were transferred to regeneration medium (BOi2Y without hormone) and finally to the ½MS medium without hormone for plantlets growth. Callus induction was observed in all cultures of hypocotyl TCLs. After callus induction, the growth of the calli was performed suitability independent of the cultivar type. In regeneration medium, the somatic embryos appeared initially direct from TCL or indirect from callus as green dots that enlarged as the embryo develops through the globular, heart, torpedo and cotyledonary stages. The analysis of variance results showed that among different concentrations of 2,4-D there were significant differences in percentage of somatic embryogenesis (PSE) and number of somatic embryos per callus (NSC) ($p<0.01$). So that, maximum PSE and NSC occurred with 10 mg/l 2,4-D and minimum PSE and (NSC) without 2,4-D. PSE and NE (number embryogenesis) in Rangelander cultivar were significantly more than Karysary cultivar. Different concentrations of 2,4-D and cultivar × 2,4-D interaction had significant effect on plant regeneration ($p<0.05$). Plant regeneration was observed in SH medium of with and without 2,4-D. However, maximum plant regeneration was obtained in 5 and 10 mg/l of 2,4-D. Therefore, 2,4-D had the highest role on somatic embryogenesis from hypocotyl TCL.

Key words: 2,4-D, Somatic embryogenesis, Callus induction, Thin cell layers, Alfalfa

* Correspong Author: motallebiazar@gmail.com

www.SID.ir