دانشکده علوم

گروه علوم طبیعی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی گیاهی گرایش سلولی-تکوینی

عنوان

اثر تیمارهای هورمونی در کشت لایه نازک سلولی (TCL) یونجه *(Medicago sativa)* رقم کریساری

استادان راهنما

دکتر علیرضا مطلبی آذر **دکتر علی موافقی**

استاد مشاور

دکتر محمد رضا دادپور

پژوهشگر

عامر محمدی نسب

آبان ۱۳۸۸

بسم الله الرحمن الرحيم

تشکر و قدردانی

سپاس پروردگار یکتا که نعمت آموختن را به من عطاء فرمود. کسی که در تنگناهای زندگی همواره پرتو پر مهرش را از من و خانواده‌ام دریغ ننموده است. ذات بی‌همتایی که از ابتدا راه عشق ورزی و دانش‌ورزی را بر من رهنمون شد. تو را سپاس می‌گویم نه بدان جهت که همه چیز به من داده‌ای، بلکه از آن جهت که آنچه نداده‌ای نیز مصلحت آن است.

بدینوسیله قدردانی می‌کنم از پدر و مادر فداکارم، دو بیکران بی‌همتا، دو سرور قامتی که گوهر وجودشان، نسیم کلامشان و باران محبتشان را همواره بی‌هیچ منت و ادعا مرهمی نمودند بر خستگی-هایم، آنانکه راستی قامتشان تجلی یافت و ققنوس جوانیشان به پای روشنایی حیات من سوخت. در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می‌نهم و با دلی مملو از عشق و محبت بر دستان پرمهرشان بوسه می‌زنم.

از برادران و خواهران عزیزم، همراهان واقعی زندگیم، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنم.

از جناب آقای دکتر علیرضا مطلبی‌آذر و دکتر علی موافقی که درنهایت حسن‌اخلاق، لطف و سعه صدر در تمام مراحل اجرا و تنظیم پایان‌نامه، اینجانب را ارشاد نموده و مرا رهین محبت‌ها و راهنمائی‌های خویش ساخته‌اند، تشکر می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر محمدرضا دادپور که مشاوره پایان‌نامه اینجانب را برعهده داشته و از خانم دکتر علی‌اصغرپور که زحمت داوری پایان‌نامه را تقبل فرمودند، سپاسگذارم.

مراتب تشکر و قدردانی خود را از اساتید گروه زیست‌شناسی که در طول تحصیل از محضرشان کسب علم کردم اعلام می‌دارم.

از همکلاسیان و دوستان محترمم آقایان قشلاق، غفاری، مولائی، حسینی، حیدری، امینی، صفری، عادلی، مهدوی کیا، ابوالحسن زاده و خانم ها باستانی، رجبی، اسدی، رضازاده، نعمتی، علی اکبری، عبادی، صادقی، اکبری، کاظمیان، فاضلی، نجفی که همراه من در این راه بودند و در هموار ساختن این طریق گامی برداشته اند، سپاسگزارم و برای همگان از درگاه ایزد منان آرزوی بهروزی و شادکامی دارم.

نام خانوادگی دانشجو: محمدی نسب **نام:** عامر

عنوان: اثر تیمارهای هورمونی در کشت لایه نازک سلولی (TCL) یونجه (*Medicago sativa*) **رقم کریساری**

استادان راهنما: دکتر علیرضا مطلبی آذر، دکترعلی موافقی **استاد مشاور:** دکتر دادپور

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته:** علوم گیاهی **گرایش:** سلولی- تکوینی **دانشگاه:** تبریز
دانشکده: علوم طبیعی **تاریخ فارغ التحصیلی:**آبان ۱۳۸۸ **تعداد صفحه:** ۸۰
واژه‌های کلیدی: تنظیم کننده های رشد، جنین زایی، کالزایی، لایه نازک سلولی هیپوکوتیل، یونجه

چکیده

این تحقیق جهت بررسی پاسخ‌های ریخت‌زایی لایه نازک سلولی (TCL) تهیه شده از هیپوکوتیل یک رقم یونجه (کاریساری) به غلظتهای متفاوت 2,4-D و kin انجام گرفت. بذور استریل روی محیط کشت SH کشت شدند. پس از یک هفته قطعات هیپوکوتیل بدست آمده زیر لوپ به ضخامت ۰/۵ -۰/۱ میلیمتر برش داده شدند و به محیط کشت SH حاوی ترکیبات مختلف 2,4-D و kin (با غلظت‌های صفر، ۰/۵ ، ۱/۰ ، ۱/۵ و ۲/۰ میلی گرم در لیتر) منتقل گردیدند. کال‌های حاصل پس از انتقال به محیط کشت القاء جنین (2,4-D بالا، kin پائین) بمدت یک هفته، سپس به محیط کشت BOi2Y منتقل شدند. در نهایت کال‌ها حاوی جنین به محیط کشت ½MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر GA_3 فیلترشده برای رشد بهتر جنین‌ها منتقل گردیدند. با توجه به اینکه در تمامی تیمارها، کالزایی ۱۰۰ درصد بود بنابراین کالزایی از TCL هیپوکوتیل از غلظتهای مختلف 2,4-D وkin متاثر نشد. از طرف دیگر، اثر غلظتهای مختلف 2,4-D ، kin و اثر متقابل بین آنها بر قطر کال معنی داری نبود ($p>۰/۰۵$) و رشد کالها مستقل از ترکیب هورمونی بخوبی انجام شد. همچنین تعداد جنین در هر کال از نوع هورمون و غلظتهای آن متاثر نشد ($p>۰/۰۵$). بر اساس نتایج بدست آمده تفاوت معنی داری بین غلظتهای مختلف 2,4-D و kin از نظر درصد جنین زایی وجود داشت ($p<۰/۰۱$) بطوریکه حداکثر درصد جنین زایی سوماتیکی در ۱/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. با افزایش مقدار kin از درصد جنین زایی سوماتیکی کاسته شد و بنابراین حداکثر درصد جنین زایی سوماتیکی در غلظت صفر kin مشاهده شد. اثر متقابل این دو هورمون بر درصد جنین زایی معنی دار نبود و نشان داد که هر کدام از این هورمونها بطور مستقل درصد جنین زایی سوماتیکی را تحت تاثیر قرار می دهند. اختلاف معنی داری بین غلظتهای مختلف 2,4-D و kin از نظرتعداد جنین سوماتیکی تولیدی در هر تیمار وجود داشت ($p<۰/۰۱$) بطوریکه تعداد جنین سوماتیکی در تمامی تیمارهای حاوی 2,4-D بطور معنی دار بیشتر از محیط کشت فاقد این هورمون بود. همچنین در غلظت صفر kin حداکثر تعداد جنین سوماتیکی مشاهده شد و با بکار گیری تیمارهای kin از تعداد جنین ها بطور معنی دار کاسته شد ($p<۰/۰۱$). با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد که نیازهای هورمونی برای کالزایی از ریز نمونه های TCL هیپوکوتیل یونجه متفاوت از جنین زایی سوماتیکی می باشد همچنین برای القاء جنین‌زایی سوماتیکی از TCl نیازی به kin وجود نداشت و حداکثر جنین‌زایی سوماتیکی در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D حاصل شد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه..... ۲

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- یونجه..... ٦

۱-۱-۱-گیاهشناسی..... ۷

۱-۲-کشت بافت یونجه..... ۷

۱-۲-۱- محیط کشت و القاء کال در یونجه..... ۹

۱-۲-۲- کشت سوسپانسیون..... ۱۲

۱-۲-۳- کشت پروتوپلاست ۱۳

۱-۲-٤- جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاه..... ۱٤

۱-۳- تاریخچه کشت لایه نازک سلولی(TCL)..... ۱۷

۱-۳-۱- مفهوم کشت لایه نازک سلولی..... ۱۹

۱-٤- اهداف پژوهش ۲۷

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱- ضد عفونی کردن سطحی بذور و تهیه ریز نمونه..... ۲۹

۲-۲- تهیه محیط کشت..... ۲۹

۲-۲- ۱- ضد عفونی کردن محیط کشت و پتری دیش..... ۳۰

۲-۲-۲- کشت و بازکشت نمونه..... ۳۰

۲-۲-۳- محیط کشت استقرار کال..... ۳۱

۲-۲-٤- محیط کشت القاء جنین سوماتیکی..... ۳۲

۲-۲-۵- محیط کشت باززایی..... ۳۲

۲-۲-٦- محیط کشت تبدیل به گیاه یا محیط کشت جوانه‌زنی..... ۳۳

۲-۳-آنالیز داده‌ها..... ۳٤

فصل سوم:نتایج و بحث

۳-۱- ثبت مشاهدات میکروسکوپی..... ۳۸

۳-۲- اثر متقابل دو هورمون..... ۵۸

۳-۳-کالزایی..... ۵۸

۳-٤- قطر کال..... ۵۹

۳-۵- در صد جنین‌زایی سوماتیکی..... ۵۹

۳-٦- تعداد جنین سوماتیکی..... ٦۲

۳-۷- تعداد جنین در هر کال..... ٦۳

۳-۸- باززایی گیاه..... ٦۳

۳-۹-نتیجه‌گیری ۷۰

۳-۱۰- پیشنهادات..... ۷۱

منابع و مآخذ

منابع مورد استفاده.....۷۲

چکیده انگلیسی.....۷۹

مقدمه

مقدمه

با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، در سالهای اخیر نیاز به مواد غذایی اهمیت زیادی پیدا کرده است. یکی از راه های افزایش مواد غذایی از طریق افزایش تولیدات کشاورزی است. تولید غذا به عنوان اصلی ترین مسئله در جهان مطرح است و در این میان تولید علوفه دارای جایگاه ویژه ای می باشد. یونجه *Medicago sativa* یا طلای سبز مهمترین گیاه علوفه ای دنیا و اولین گیاه علوفه ای اهلی شده است که بشر اولیه آنرا به عنوان منبع تغذیه دام تشخیص داده است. مبدأ اصلی یونجه خاور نزدیک و آسیای مرکزی بوده و ناحیه مرکزی ایران منشا جغرافیایی یونجه است. یونجه در بین گیاهان علوفه ای به علت کیفیت خوب، خوشخوراکی و دارا بودن ذخائر غذایی (مواد معدنی مانند کلسیم و مواد پروتئینی)، اهمیت خاصی دارد به طوریکه این گیاه بیش از ۲ تن در هکتار پروتئین در سال تولید می کند (مجیدی، ۱۳۷۷). بر اساس آمارنامهٔ کشاورزی ۱۳۷۸، سطح زیر کشت یونجه در ایران حدود ٦۰۰ هزار هکتار است که بیشترین آن در آذربایجان غربی و به مقدار ۷٦۲۰٦ هکتار و بیشترین عملکرد در سیستان و بلوچستان و به مقدار ۱٤۲۷۲ کیلوگرم یونجه خشک در هر هکتار می باشد. یونجه با تثبیت ازت خاک بر حاصلخیزی خاک می افزاید و عمری بین ٤ تا ۲۰ سال دارد که معمولا عمر مفید آن ۷ سال است. این گیاه در مقابل تغییرات محیط سازگاری بالا دارد به طوری که قادر است دمای ۵۰ تا ٦۰ درجه زیر صفر و ۵۰ درجه بالای صفر را تحمل نماید (کوچکی، ۱۳٦٤). افزایش تولیدات کشاورزی از طریق افزایش سطح زیر کشت و افزایش عملکرد در واحد سطح امکان پذیر است. افزایش سطح زیر کشت علاوه بر محدودیت های خاص خود نیاز به سرمایه گذاری کلان دارد ولی بالا بودن عملکرد در واحد سطح نیاز به انجام تحقیقات به نژادی و به زراعی دارد. در دنیای امروز با بهره گیری از فن آوری های جدید کشت بافت و مهندسی ژنتیک

می توان امیدوار بود که بدون افزایش سطح زیر کشت، تولید محصولات کشاورزی افزایش قابل ملاحظه‌ای یابد.

اولین گزارش مربوط به کشت بافت یونجه توسط ساندرز و بینگهام (۱۹۷۲) انتشار یافت. آنها گزارش کردندکه کالوس می تواند از کشت تخمدان نارس، میانگرهها، هیپوکوتیل و حتی پرچم نارس تولید شود. همچنین تمام گیاهان تولید شده، دارای کروموزمهای سوماتیکی برابر گیاه مادر بودند. در این گیاه تولید کالوس و باززایی از ریزنمونه های مختلف انجام شده ولی در خصوص نحوه ریخت زایی در شرایط درون شیشه ای و عوامل موثر در آن، تحقیقی انجام نشده است. یکی از روشهای مطالعه ریخت زایی استفاده از تکنیک کشت لایه نازک سلولی یا TCL می‌باشد. سیستم کشت TCL اجازه مطالعه سلول‌شناسی، فیزیولوژی، بیوشیمی و تغییرات مولکولی که در یک برنامه ریخت زائی ویژه اتفاق می افتد را می دهد. این روش به مطالعه نحوه ریخت زائی جنین سوماتیکی، شاخه زایی، ریشه زایی کمک می‌کند که می‌تواند برای تکثیر انبوه گیاه مورد استفاده باشد. همچنین بهره گیری از سیستم کشت TCL، تولید گل در شرایط درون شیشه ای را امکان پذیر ساخته است (تیکسریا دا سیلوا، b ۲۰۰۳). برتری سیستم کشت لایه سلولی این است که لایه نازک، حاوی سلولهای مشابه است و می تواند تمام الگو های ریخت زایی را آغاز کند، اما تنها یک الگو را در هر تیمار نشان می دهد (کیم،۱۹۸۱). سیستم TCL اجازه ایزوله کردن سلولهای ویژه یا بافت را که بستگی به وضعیت ژنتیکی و اپی ژنتیکی دارد می دهد. در این ارتباط عوامل موثر بر رشد مانند pH، نور، تنظیم کننده های رشد و افزودنی ها به محیط کشت نیز نقش دارند که منجر به القای برنامه های ریخت زایی ویژه در شرایط کشت درون شیشه ای می شود. ظرفیت یک TCL بستگی به تعدادی از فاکتور ها دارد که شامل دریافت علایم، درک علایم دریافت شده و پاسخ به این علایم می باشد. در مورد

آخر ممکن است بستگی به منشا و وضعیت فیزیولوژیکی TCL بافت و اندام، عوامل تنش زا به کار برده شده برای TCL، حالت های خاموشی ژن در بافت یا درون سلول باشد. ابتدا باید فاز نخست به انجام برسد و سپس سلول های داخل TCL دوباره به اندام هائی که الگوی نمو صحیح را نشان می دهد، تمایز مجدد پیدا کنند (تیکسریا دا سیلوا ونات، ۲۰۰۳). با توجه به اهمیت یونجه و اصلاح آن متاسفانه در زمینه ریخت زایی این گیاه تحقیقات چندانی انجام نشده است. لذا این تحقیق جهت بررسی پاسخ های ریخت زایی TCL هیپوکوتیل به غلظتهای متفاوت 2,4-D و kin انجام گرفت تا پاسخ های ریخت‌زایی در شرایط آزمایشگاهی (تولید کالوس، ریشه، شاخساره و یا جنین سوماتیکی) مورد بررسی قرار گیرد.

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- یونجه

یونجه *Medicago sativa* یک گیاه علوفه‌ای با ارزش است و در تثبیت نیتروژن از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. این گیاه چندساله، دگرگرده افشان، هتروزیگوت و پلی پلوییید است (مک کوی و همکاران، ۱۹۸٤). جنس *Medicago* شامل ٦۰ گونه یک یا چند ساله، و دیپلوئید یا پلی پلوئید می‌باشد (آرسیونی و همکاران، ۱۹۹۰). اتحاد دو کروموزوم در ژنوم و از دست دادن یک ناحیه سانترومری باعث ایجاد گونه‌هائی با تعداد کروموزومهای پایه x=۷ و x=۸ می‌گردد (والتون و براون، ۱۹۹۸). چندین گونه اتو تتراپلوییید[۱] (۲n=۳۲) و هگزاپلوییید[۲] (۲n=٤۸) برای جنس *Medicago* وجود دارد (آرسیونی و همکاران، ۱۹۹۰). فرمهای دیپلوئید یونجه یکساله‌اند و دوام کمتری دارند در حالی که فرمهای تتراپلوئید آن چند ساله و با داشتن پایداری و قدرت گسترش زیاد، سطح وسیعی از کشت یونجه را بخود اختصاص می دهند (رضایی، ۱۳۷۲). یونجه از نظر ژنتیکی یک تتراپلوئید هتروزیگوت و دگرگشن با تنوع زیاد از نظر خصوصیات زراعی می‌باشد. تنوع ژنتیکی یونجه را می‌توان با مشاهده رنگهای گل اذین آن در یک مزرعه پر از گل مشاهده کرد. ارقام زراعی دارای ژرم-پلاسم از گونه *M. sativa* (گل ارغوانی) و *M. falcata* (گل زرد) می‌باشند. در سیستم ریشه گیاهان بقولات از جمله یونجه، گره‌های کوچکی وجود دارند، این گره‌ها محل تجمع باکتری مفید تثبیت کننده ازت هوا در خاک هستند که آنها را *ریزوبیوم ملی لوتی*[۳] می‌نامند. این باکتری پس از استقرار در این گره‌ها با فعالیتهای خود ازت موجود در هوای اطراف را جذب نموده و آن را به صورت ازت قابل جذب و استفاده برای گیاهان در خاک ذخیره می‌کند، که این امر سبب حاصلخیزی خاک و

۱- Autotetraploid

۲- Hexapliod

۳- *Rhizobium meliloti*

تولید محصولات بهتر و بیشتر می‌گردد. یونجه به دلیل داشتن ریشه‌ای عمیق و اینکه پس از استقرار مقاومت ویژه‌ای نسبت به خشکی دارد، برای کلیه مناطق دیمزار کشور جهت احیاء و اصلاح مراتع به خوبی سازگاری دارد. برخورداری از یک سیستم ریشه‌ای قوی عامل موفقیت این گیاه در برابر بسیاری از عوامل نامساعد و همچنین استفاده از مواد غذایی نقاط مختلف خاک به شمار می آید. بعلاوه داشتن ریشه راست وعمیق، توانایی کسب رطوبت قابل جذب را از اعماق زمین (تا عمق ۵ متر و بیشتر) به گیاه می‌دهد، که این برتری امکان نجات گیاه را از خطر طولانی بودن زمان خشکی فراهم می‌سازد. ژنوتیپهای مقاوم به سرما دارای ریشه‌های منشعب تری می‌باشند. همچنین گیاه یونجه در شرایط سرما و خشکی می‌تواند به حالت رکود یا خفته در آید و پس از مهیا شدن شرایط مناسب و خارج شدن از خفتگی، رشد و نمو خود را ادامه (کریمی، ۱۳٦۹).

۱-۱-۱- گیاه‌شناسی یونجه

یونجه متعلق به تیره بقولات Fabaceae، راسته گل سرخ Rosales، زیر تیره پروانه آسا Papilionoideae، طایفه سه برگچه‌ایها Trifolieae و نام علمی *Medicago sativa* می باشد. تیره بقولات از جمله بزرگترین تیره گیاهان گلدار است. که مشتمل به ٦۰۰ جنس و ۱۸۰۰ گونه است (رضایی، ۱۳۷۲).

۱-۲- کشت بافت یونجه

اولین گزارش مربوط به کشت بافت یونجه توسط ساندرز و بینگهام (۱۹۷۲) انتشار یافت که نشان دادند کال می تواند از کشت تخمدان نارس، میانگرهها، هیپوکوتیل و حتی پرچم نارس تولید شود. همچنین همه گیاهان تولید شده، دارای کروموزمهای سوماتیکی برابر گیاه مادری بودند. بعد از این

تحقیق راندمان باززایی گیاه از طریق بهبود و توسعه روشهای کشت بافت رو به پیشرفت گذاشت و در آزمایشات مختلف از ریز نمونه‌های ساقه، برگ، ریشه، هیپوکوتیل، دمبرگ، گره‌های ریشه‌ای، تخمدان نارس، بساک نارس، لپه وقسمتهای میانگره استفاده شد (ساندرز و بینگهام، ۱۹۷۵). آرسیونی و همکاران (۱۹۹۰) تعدادی از گزارشات کشت بافت یونجه که شامل نوع گونه، رقم، ریزنمونه، محیط کشت القاء[۱] کال، محیط کشت رشد[۲]، محیط کشت پیش از باززایی[۳]، محیط باززایی و نوع باززایی[٤] را گرد آوری کرده‌اند. پاسخ‌های گیاه یونجه نسبت به شرایط کشت بافت بویژه نوع محیط کشت، غلظت و نوع هورمونهای که جهت باززایی و یا تولید جنین سوماتیکی به کار می‌رود، به شدت وابسته به ژنوتیپ است (احسانپور و همکاران، ۲۰۰۱). بنابراین شرایط بهینه برای کشت و تولید جنین سوماتیکی برای ارقام و گونه های مختلف یونجه متفاوت است. به عنوان مثال تحقیقات انجام شده روی *M. truncatula* نشان داده است که پاسخ این گیاه نسبت به سایر گونه‌های یونجه متفاوت می‌باشد (نولان و روز، ۱۹۹۸). مطالعات دیگر نشان داده است که جنین‌زایی سوماتیکی از طریق (کال) در یونجه تحت کنترل دو ژن غالب[۵] با اثرات تکمیلی است. بنابراین باززایی گیاه یک صفت وراثت پذیر می باشد و استفاده از روش گزینش دوره‌ای[٦] راه موثری برای تجمع الل‌های کنترل کننده صفات ژنتیکی مطلوب است (ریچ و بینگهام، ۱۹۸۰). مطالعات صورت گرفته نشان داده است که فراوانی جنین‌زایی سوماتیکی در یونجه بوسیله تعدادی از عواملی مانند ژنوتیپ، نوع ریزنمونه

---

[۱]- Callus induction medium

[۲]- Growth medium

[۳]- Pre – regeneration medium

[٤]- Type of regeneration

[۵]- Dominant gene

[٦]- Recurrent selection

(براون و آتاناسوف، ۱۹۸۵)، نوع و مدت زمان اعمال تیمارهای القائی (استوارت و همکاران، ۱۹۸۵) و ترکیبات محیط کشت (دوز وهمکاران، ۱۹۸۰) متاثر می‌گردد.

۱-۲-۱- محیط کشت و القاء کال در یونجه

به نظر می‌رسد که یونجه به توالی ویژه‌ای از محیط‌های کشت، تحریک هورمونی، جهت کشت و باززایی در شرایط درون شیشه ای[۱] نیاز دارد. القاء کال از ریز نمونه‌ها، در محیط‌های کشت پایه مختلف، مانند محیط‌های کشت SH[۲]، MS[۳]، B5[٤]، UM[٥] و محیط‌های کشت کمپلکس گزارش شده است (بینگهام، ۱۹۷۵). در بعضی موارد اضافه کردن کمپلکس موادآلی مانند عصاره مخمر یا کازئین هیدرولیز شده به محیط کشت پایه گزارش شده است (کائو و میچاییل لاک، ۱۹۸۱). در جریان توسعه و تکمیل مطالعات انجام شده در مورد یونجه، رژن-اس از میان ۱۲ درصد ژنوتیپ‌های که از هیپوکوتیل باززایی شده‌اند، در اولین نسل گزینش یک کلنی دوپویت و چهار کلنی سارناک انتخاب گردیدند. پنج گیاه از طریق آمیزش بین گونه‌ای با یکدیگر تلاقی شده و هیپوکوتیل گیاهان حاصل از این تلاقی را به منظور باز تولید گیاه مورد آزمایش قرار دادند. نتایج سه دوره گزینش نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های دارای توانایی باززایی از ۱۲٪ به ٦۷٪ در صد افزایش یافت. این مطلب نماینگر این است که قابلیت توارث صفت باززایی، بالا است (بینگهام و همکاران، ۱۹۸۸). برای شروع کال‌زایی نیاز به حضور یک اکسین سنتتیک مانند NAA یا 2,4-D در ترکیب با Kin یا BAP در دامنه بین ۲-۰/۵ میلی گرم در لیتر اکسین و ۰/۵-۰/۱ میلی گرم در لیتر سیتوکینین دارد. این ترکیبات

---

[۱]- In vitro

[۲]-Schenk and Hildebrandt

[۳]- Murashige and Skoog

[٤]- Gamborg

[٥]-Uchimiya and Murashige

هورمونی تکثیر کال ترد[۱] با رشد سریع را تحریک می‌کند. القاء کال می‌تواند در نور با فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، در نور مداوم (واکر و همکاران، ۱۹۷۹) یا در نور ضعیف (کائو و میچاییل لاک، ۱۹۸۱) بدست آید. به نظر می‌رسد که نور تأثیری زیادی روی نتیجه نهایی نداشته باشد (آرسیونی و همکاران، ۱۹۹۰). آزمایشات دقیق تأثیر هورمونها در القاء کال بوسیله ساندرز و بینگهام (۱۹۷۵)، واکر و همکاران (۱۹۷۸) انجام شده است. بر اساس مشاهدات هر دو گروه به نظر می‌رسد که باززایی درون شیشه‌ای[۲] به طور زیادی بستگی به این دارد که سلولها در معرض 2,4-D پیش از باززایی روی محیط بدون هورمون قرار گیرد. اگر چه هورمون NAA روی تکثیر سلولی نقش دارد، اما بر اثرات ریخت‌زایی 2,4-D سهیم نمی‌باشد (بینگهام و همکاراران، ۱۹۸۸). هورمون 2,4-D در غلظت‌های بالا در تشکیل و القاء جنین سوماتیکی نقش عمده‌ای دارد. این هورمون در نفوذ پذیری غشاء[۳]، افزایش متابولیسم IAA و افزایش سطح سلولی نقش دارد. بکار گیری 2,4-D در هویج، سبب القاء و تجمع بیشتر IAA و نهایتاً سبب افزایش پاسخ های جنین زایی حتی در گونه‌ها و ریز نمونه های متفاوت می شود (فهر و همکاران، ۲۰۰۳). در بسیاری از موارد تیمارهای القائی برای آغاز تقسیمات سلولی و ایجاد قطبیت[۴] جدید در سلول سوماتیکی لازم است که در یونجه رایج ترین تیمار القائی 2,4-D است. این هورمون در القاء کال و تشکیل جنین سوماتیکی بیشترین اثر را در مقایسه با دیگر اکسین‌ها دارد که نتایج در جدول ۱ اثرات انواع اکسین نشان داده شده است (مک کریس و برون، ۱۹۹۶). اثر دوره‌های زمانی تیمار 2,4-D در محیط کشت جنین‌زایی از برگ *M. falcata* و *M. sativa* نشان داد که *M. falcata* بیشترین تعداد جنین را در طی ۲۵ روز تولید می‌کند. در این

---

[۱]- Friable

[۲]- In Vitro

[۳]- Membranc permeability

[۴]- Polarity establish

شرایط، جنین ها اکثراً در مرحله اژدری[۱] مشاهده شدند. در حالت کلی اعمال تیمار 2,4-D بیش از ۱۵ روز سبب القاء جنین ها به حالت لپه‌ای[۲] و کاهش تعداد جنین قلبی شکل[۳] می‌شود. این در حالی است که جنین‌زایی در *M. sativa* کمتر از *M. falcata* صورت گرفت. در *M. sativa* در ده روز بیشترین القاء جنین اتفاق افتاد. در حالی که بعد از ۳۰ روز تیمار با 2,4-D نمو جنین بازداشته شد. همچنین استفاده از ABA در مرحله اژدری برای بلوغ جنین نقش قابل توجهی دارد. اثر ABA به مرحله نموی جنین بستگی دارد. به طوری که مراحل لپه‌ای و قلبی شکل بوسیله ABA متاثر نمی-گردند (دنچیو و همکاران، ۱۹۹۱). در میان سیتوکینین های مختلف BAP و Zeatin در تشکیل جنین‌های سوماتیکی در یونجه نقش قابل توجهی دارند. همچنین درحضور سیتوکینین های مختلف وضعیت بافت کال متغیر می باشد. در عدم حضور سیتوکینین بافت کال ترد و آبکی و در حضور آن فشرده و گره دار[۴] می باشد (تاداشی و همکاران،۱۹۹۰).

جدول ۱-۱-اثرات القائی انواع اکسین بر کال زایی و جنین زایی سوماتیکی در *Medicago sativa* کلنی RL 34

Auxin	Callus/petiole (mg)	Embryos/petiole
Non-responsive:		
indole-3-acetic acid (IAA)	0	0
indole-3-butyric acid (IBA)	0	0
Callus-Forming:		
4-chlorophenoxyacetic acid (CPA)	48	0
naptholeneacetic acid (NAA)	37	0
Somatic embryo and callus-forming:		
2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)	88	51
2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	53	26

[۱]-Torpedo embryo

[۲]-Cotyledonary embryo

[۳]-Globular embryo

[۴]- Nodular texture

۱-۲-۲-کشت سوسپانسیون

کشت سوسپانسیون[۱] سلولی، شامل توده‌ای سلولی پراکنده و در حال رشد در محیط کشت مایع و متحرک است. این کشت‌ها معمولاً با انتقال قطعاتی از کال ترد و تمایز نیافته به محیط کشت مایع که بطور یکنواخت و مداوم تکان داده می‌شود، شروع می‌شود (کالیان کومار، ۱۹۹۲). بعلت اینکه کال یونجه ترد می‌باشد، کشت سوسپانسیون می‌تواند در محیط کشت مایع استقرار و نگهداری شود. کشتهای سوسپانسیون را که وابسته به ژنوتیپ و منبع ریز نمونه برای القاء کال می‌باشد، می‌توان در محیط کشت نسبت ساده (مک‌کوی و بینگهام، ۱۹۷۷) یا در محیط کشت پیچیده رشد داده شود (کائو و میچلوک، ۱۹۸۱). توانایی باززایی[۲] گیاه بعد از اینکه سلولهای یونجه در محیط کشت مایع رشد یافتند، پیش نیازی بر آزمایشات گزینشی سلول می‌باشد. اصولاً کشت سوسپانسیون نسبت به غلظت-های پایین‌تر عامل انتخابی حساس می‌باشد. باززایی گیاه از کشت سوسپانسیون در تحقیقات آتاناسوف و براون (۱۹۸٤)، کائو (۱۹۸۰)، ریچ وبینگهام (۱۹۸۰)، گزارش شده است. کشت‌های سوسپانسیونی مواد مناسبی برای آزمایشات گزینشی و باززایی لاینهای مقاوم است. در تحقیقات صورت گرفته، کشت‌های سوسپانسیونی موتاسیون یافته نژاد یونجه دیپلوئید (HG2) که در حضور ۰/۰۲ میلی مولار اتیونین[۳] کشت شده‌اند، اجازه جداسازی کلونهای مقاوم به غلظت تا یک میلی مول اتیونین را می‌دهند (آرسیونی و همکاران، ۱۹۹۰). بعضی از این کلونها مقاوم به اضافه کردن ترئونین + لیزین به محیط کشت نیز بودند و یکی از لاینهای سلولی جدا شده، افزایش در میزان متیونین محلول را در مقایسه با کالهای (HG2) والدینی را نشان داده است (ریچ و همکاران، ۱۹۸۱).

---

[۱]-Suspension culture

[۲]-Regeneration ability

[۳]-Ethionine