

باززایی گیاه از طریق اندام زایی مستقیم در سه رقم یونجه (*Medicago sativa* L.) با استفاده از ریزنمونه گره ساقه

Plant Regeneration via Direct Organogenesis in Three Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Cultivars Using Stem Nodal Explant

سمیه ملکی بند<sup>۱</sup>، مراد جعفری<sup>۲</sup>، مرتضی قدیم‌زاده<sup>۲</sup> و ایرج برنوسی<sup>۲</sup>

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۲۵

چکیده

ملکی بند، س.، جعفری، م.، قدیم‌زاده، م. و برنوسی، ا. ۱۳۹۲. باززایی گیاه از طریق اندام زایی مستقیم در سه رقم یونجه (*Medicago sativa* L.) با استفاده از ریزنمونه گره ساقه. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۹: ۸۰-۶۵.

در این مطالعه باززایی مستقیم گیاه کامل در سه رقم یونجه چندساله مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه‌های گره ساقه جدا شده از گیاهچه‌های بذری ۱۴ روزه در محیط کشت پایه MS همراه با ویتامین‌های B5 تکمیل شده با غلظت‌های مختلف و ترکیبات فاکتوریلی تنظیم‌کننده‌های رشد BAP/NAA و TDZ/AgNO<sub>3</sub> کشت شدند. نتایج حاصل از تجزیه آماری تفاوت معنی‌دار ( $P < 0/01$ ) بین ارقام و همچنین بین سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد از نظر صفات تعداد جوانه‌های القا شده و تعداد شاخساره‌های باززا شده در هر ریزنمونه را نشان داد. بیشترین میانگین تعداد جوانه القا شده (۵/۸۰ جوانه در هر ریزنمونه، میانگین سه رقم) و همچنین بیشترین میانگین تعداد شاخساره باززا شده (۵/۷۳ شاخساره در هر ریزنمونه، میانگین سه رقم) در سطوح بالای BAP (۱ mgL<sup>-1</sup>) و NAA (۰/۲ mgL<sup>-1</sup>) حاصل شد، در حالی که مقادیر بیشینه برای میانگین تعداد جوانه القا شده (۵/۷۷) و میانگین تعداد شاخساره باززا شده (۵/۶۹) در سطح پایین (۰/۱ mgL<sup>-1</sup>) TDZ همراه با AgNO<sub>3</sub> (۳ mgL<sup>-1</sup>) به دست آمد. ارقام قره یونجه، ارودوباد و همدانی به ترتیب دارای بیشترین پتانسیل از نظر صفات موردنظر بودند. گیاهچه‌ها در حضور محیط کشت MS نصف غلظت حاوی NAA (۱/۵ mgL<sup>-1</sup>) در ترکیب با IBA (۱ mgL<sup>-1</sup>) به طور قابل توجهی ریشه‌دار شدند و گیاهان با قابلیت زنده‌مانی ۱۰۰٪ به شرایط گلخانه‌ای سازگار شدند. پروتوکل ساده، سریع و کارآمد ارائه شده در این مطالعه می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی و همچنین برای مهندسی ژنتیک دامنه وسیعی از گونه‌های یونجه استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: یونجه (*Medicago sativa* L.)، گره ساقه، القای جوانه، باززایی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی.

## مقدمه

گیاه از طریق کشت بافت شرط لازم و اساسی برای استفاده موفقیت‌آمیز روش‌های بیوتکنولوژیکی مانند تراریختی ژنتیکی و هیبریداسیون سوماتیکی است (Ray and Nolan, 1995).

اکثر مطالعات کشت بافت در یونجه به صورت باززایی غیرمستقیم از طریق جنین‌زایی سوماتیکی انجام شده است (Iantcheva et al., 2005b؛ Shao et al., 2000؛ Moltrasio et al., 2004) و تنوع بین و درون جمعیتی بسیار بالایی در ارقام یونجه برای پتانسیل کالوس‌زایی و جنین‌زایی وجود دارد (Zare et al., 2009؛ Samac and Temple, 2004؛ McKersie Bowley, 1993). روش باززایی غیرمستقیم دارای معایبی از جمله زمان بر بودن، سختی کار و ایجاد تنوع وسیع سوماکلونی با خصوصیات مورفولوژیکی غیرطبیعی است (Neves et al., 2001؛ Shah et al., 2003). تهیه روش مناسب و کارآمد برای باززایی کامل، سریع و تولید انبوه گیاه تحت شرایط درون‌شیشه‌ای از مهم‌ترین اهداف مطالعات کشت بافتی است که می‌تواند در مطالعات مهندسی ژنتیک و همچنین در برنامه‌های به‌نژادی مورد استفاده قرار گیرد. تاکنون روش مناسبی برای باززایی در محدوده وسیعی از ژنوتیپ‌های یونجه ارائه نشده است و به دلیل خصوصیات بیولوژیکی خاص آن (آلوگامی و تتراپلوئیدی) پاسخ به کشت بافت در این گیاه

یونجه یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که با توجه به اهمیت آن در تغذیه دام و کشاورزی پایدار (تثبیت نیتروژن ملکولی و حفظ ساختار مناسب خاک) در سراسر جهان کشت می‌شود (Iantcheva et al., 2005a) و به دلیل ظرفیت باززایی خوب درون‌شیشه‌ای آن، برای مدت زمان طولانی از اهداف مطالعات ژنتیکی و زیست‌شناسی سلولی-مولکولی بوده است (Iantcheva et al., 2005a,b,c). در حال حاضر این گیاه به منظور بهبود کیفیت علوفه و سایر صفات مهم آن مانند مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و همچنین به عنوان یک بیوراکتور سبز برای تولید متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌های نو ترکیب دارویی، در حوزه زیست‌فناوری گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. افزایش کیفیت و میزان تولید، مقاومت به تنش‌ها جزء اهداف اصلی برای اصلاح یونجه است. اگر چه بیشتر دستاوردها در گذشته با استفاده از روش‌های اصلاح کلاسیک به دست آمده‌اند ولی در حال حاضر از روش‌های بیوتکنولوژیکی از جمله مهندسی ژنتیک به عنوان مکمل روش‌های اصلاحی کلاسیک در بهبود صفات آن استفاده می‌شود. با این حال از نظر تراریختی ژنتیکی یک گیاه سرسخت (Recalcitrant) است. یکی از دلایل این امر عدم وجود پروتوکل باززایی موفق برای طیف وسیعی از ژنوتیپ‌های یونجه است (Li et al., 2009). باززایی سریع و کارآمد

شستشوی اولیه با آب معمولی، به مدت یک دقیقه در الکل اتانول ۷۰٪ و سپس به مدت ده دقیقه در هیپوکلریت سدیم (حاوی ۵٪ کلر فعال) قرار گرفتند و پس از سه بار آبکشی هر بار به مدت پنج دقیقه در محیط کشت آب-آگار ۰/۸٪ کشت شدند. پس از ۱۴ روز، گیاهچه‌های دارای رشد مناسب (۳-۵ cm) به عنوان منبع تهیه ریزنمونه استفاده شدند.

ریزنمونه‌های گره ساقه با حذف برگ و باقی گذاشتن قسمتی کوچک از دم‌برگ (احاطه‌کننده جوانه جانبی) از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای ۱۴ روزه تهیه شد و سپس در محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) همراه با ویتامین‌های محیط B5 (Gamborg et al., 1968)، ساکاروز ۳٪، آگار ۰/۸٪ و غنی شده با سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (Plant growth regulators) یعنی BAP در ترکیب با NAA (جدول ۱) به عنوان محیط کشت القای جوانه I (Shoot inducing medium I, SIM I) و یا TDZ در ترکیب با  $AgNO_3$  (جدول ۲) به عنوان محیط کشت القای جوانه II (SIM II) کشت شدند. پس از دو هفته ریزنمونه‌ها در همان محیط‌های کشت واکشت شدند و در نهایت پس از گذشت دو هفته جوانه‌های القایی که اندام‌زایی کرده و باززا شده بودند، به محیط رشد حاوی TDZ ( $0.05 \text{ mg l}^{-1}$ ) انتقال یافتند. گیاهچه‌ها پس از رشد نسبی (۳-۵ cm) به

شدیداً وابسته به ژنوتیپ است و این وضعیت، کاربرد روش‌های بیوتکنولوژیکی در بهبود ژنتیکی آن را محدود می‌کند (Smolenskaya and Ibragimova 2002؛ Matheson et al., 1990؛ Li et al., 2009).

اندام‌زایی مستقیم بدون داشتن فاز کالوس از راهکارهای قابل توجه برای تکثیر درون شیشه‌ای سریع و در مقیاس بالای گیاهان به لحاظ داشتن مزایایی چون صرفه‌جویی در زمان، سادگی، ثبات ژنتیکی و پایین بودن تنوعات سوماکلونی است (Beegum et al., 2007؛ Hissano et al., 2004). مطالعات بسیار محدودی در مورد باززایی مستقیم یونجه‌های یک‌ساله (Iantcheva et al., 2005b) و یونجه‌های چندساله (Li et al., 2009) انجام شده است. بر اساس منابع علمی قابل دسترس تاکنون گزارشی در مورد باززایی مستقیم ارقام ایرانی یونجه وجود ندارد. لذا در این مطالعه پتانسیل اندام‌زایی و باززایی مستقیم سه مهم یونجه چندساله، همدانی، قره‌یونجه (بومی ایران) و اردوباد (بومی آذربایجان)، از ریزنمونه مستعد گره ساقه تحت تاثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد سیتوکینینی TDZ و BAP مورد بررسی گرفت.

### مواد و روش‌ها

بذر ارقام چند ساله قره یونجه، همدانی و اردوباد از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی تهیه شد. بذرها پس از

آن‌ها و انجام تبدیل داده جذری، با نرم‌افزار آماری SAS (version 9.1) تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار فیشر (Fisher's least significant difference: FLSD) انجام شد.

### نتایج و بحث

#### تاثیر BAP و NAA بر القای جوانه و باززایی

به منظور القای جوانه و امکان ایجاد شاخساره‌های نابجا در سه رقم یونجه چندساله، گره ساقه به عنوان ریزنمونه مستعد انتخاب شد. با توجه به این که این ریزنمونه حاوی جوانه جانبی بالقوه‌ای است که می‌تواند به یک گیاه کامل تبدیل شود لذا این ناحیه مرستمی قابلیت القای تعداد بیشتری جوانه را دارد. بدین منظور دو نوع محیط کشت القای جوانه، II و I SIM، حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در غلظت‌های مختلف (جدول‌های ۱ و ۲) استفاده شد. جوانه‌های نابجا متعددی (شکل ۱A) در مدت دو الی سه هفته در اطراف جوانه جانبی بر روی ریزنمونه‌ها مشاهده شد و اندام‌زایی و باززایی جوانه‌ها (شکل ۱B) از هفته سوم شروع و در هفته چهارم تکمیل شد. نتایج تجزیه آماری و مقایسات میانگین آزمایش اول (جدول ۱) نشان داد که بین سه رقم و همچنین بین سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA و محیط کشت HF (Hormone free)، به عنوان شاهد) از نظر اثر بر روی تعداد

محیط کشت ریشه‌زایی در محیط پایه MS حاوی ترکیب سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و IBA (جدول ۳) کشت شدند. تمام کشت‌ها در اتاق رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۷۰٪، شدت نور  $160 \mu E m^{-2} s^{-1}$  و دمای  $24 \pm 2^{\circ}C$  نگهداری شدند.

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، جهت سازگاری به شرایط محیطی، به گلدان‌های حاوی بسترهای مختلف کشت، خاک زراعی: پیت: پرلیت (۱:۱:۱ و ۱:۱:۲)، خاک زراعی: خاکبرگ: ماسه (۱:۱:۱)، پرلیت و پیت (هر کدام به تنهایی) با شرایط رطوبت نسبی ۹۶٪ و دمای  $24 \pm 2^{\circ}C$  منتقل شدند و با محلول  $MS \frac{1}{2}$  (نصف غلظت نمک‌ها) و بدون ساکاروز محلول‌پاشی شدند. در نهایت گیاهان سازگار شده به گلخانه در شرایط دمایی  $25-28^{\circ}C$  منتقل شدند.

آزمایش‌های مربوط به القای جوانه و باززایی گیاهچه طی دو آزمایش جداگانه با استفاده از دو نوع محیط کشت القای جوانه I و II به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار و ده ریزنمونه و همچنین آزمایش ریشه‌زایی با استفاده از همان الگوی آماری با چهار تکرار و سه گیاهچه در هر تکرار اجرا شد. این آزمایش‌ها دوبار تکرار شد و صفات متوسط تعداد جوانه القای شده، تعداد گیاهچه باززا شده در هر ریزنمونه و طول ریشه‌های نابجا یادداشت‌برداری شدند. داده‌های حاصل از آزمایش‌ها، پس از بررسی نرمال بودن

جدول ۱- تاثیر غلظت و ترکیبات مختلف BAP و NAA بر القای جوانه و باززایی مستقیم از ریزنمونه گره ساقه در سه رقم یونجه (*Medicago sativa* L.)

Table 1. Effect of different concentrations and combinations of BAP and NAA on shoot-bud induction and direct regeneration from stem nodal explant in three alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars

BAP (mg l <sup>-1</sup> )	NAA (mg l <sup>-1</sup> )	اختصار Abbreviation	در هر ریزنمونه میانگین تعداد جوانه القا شده Mean number of induced shoot bud per explant			ریزنمونه در هر میانگین تعداد گیاهچه باززا شده Mean number of regenerated shoot per explant		
			اردوباد	همدانی	قره یونجه	اردوباد	همدانی	قره یونجه
			Ordobad	Hamedani	Ghareyonjeh	Ordobad	Hamedani	Ghareyonjeh
0.0	0.00	HF	1.00d	1.00e	1.00d	0.88d	0.88d	0.5d
0.5	0.02	SIM I-1	3.25c	2.54d	3.50c	3.25c	2.45c	3.11c
0.5	0.20	SIM I-2	3.86c	3.87c	3.11c	3.67c	2.87c	3.33c
1.0	0.02	SIM I-3	4.49b	4.58b	5.52b	4.39b	4.32b	5.33b
1.0	0.20	SIM I-4	5.28a	5.37a	6.37a	5.19a	5.19a	6.11a

داده‌های دارای حروف غیر یکسان در هر ستون از نظر آماری اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون FLSD دارند.

HF: Hormone free, SIM: Shoot inducing medium. Values followed by different letters within a column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) according to FLSD test.

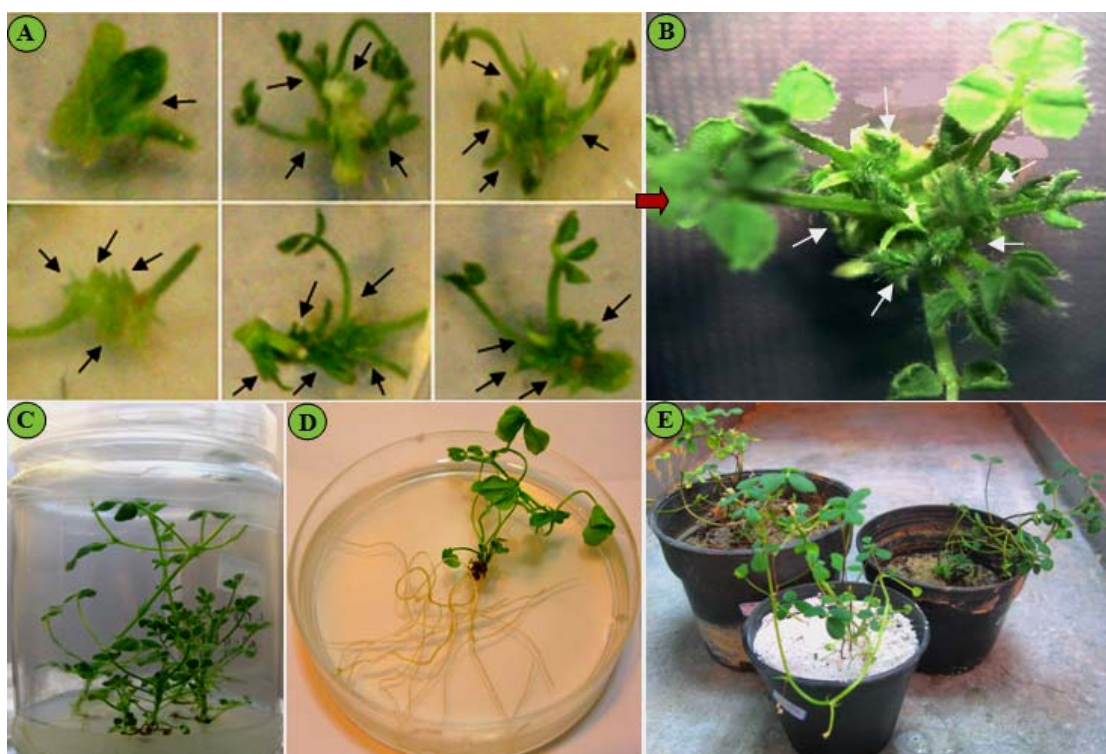
جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف TDZ همراه با و یا بدون AgNO<sub>3</sub> بر القای جوانه و باززایی مستقیم از ریزنمونه گره ساقه در سه رقم یونجه (*Medicago sativa* L.)

Table 2. Effect of different concentrations of TDZ along with or without AgNO<sub>3</sub> on shoot- bud induction and direct regeneration from stem nodal explant in three alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars

TDZ (mg l <sup>-1</sup> )	AgNO <sub>3</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	اختصار Abbreviation	در هر ریزنمونه میانگین تعداد جوانه القا شده Mean number of induced shoot bud per explant			ریزنمونه در هر میانگین تعداد گیاهچه باززا شده Mean number of regenerated shoot per explant		
			اردوباد	همدانی	قره یونجه	اردوباد	همدانی	قره یونجه
			Ordobad	Hamedani	Ghareyonjeh	Ordobad	Hamedani	Ghareyonjeh
0.00	0.0	HF	1.00f	1.00d	1.00d	0.88e	0.88d	0.75d
0.10	0.0	SIM II-1	5.45b	3.83a	6.66a	5.32b	3.67a	6.52a
0.10	0.3	SIM II-2	6.25a	4.13a	6.94a	6.25a	4.03a	6.80a
0.25	0.0	SIM II-3	4.49c	3.09b	4.49b	4.28c	2.95b	4.49b
0.25	0.3	SIM II-4	4.37c	3.76a	4.97b	4.37c	3.70a	4.65b
0.50	0.0	SIM II-5	2.75e	2.39c	3.37c	2.60d	2.39c	3.37c
0.50	0.3	SIM II-6	3.74d	2.87cb	3.87c	2.74d	2.80b	3.87c

داده‌های دارای حروف غیر یکسان در هر ستون از نظر آماری اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون FLSD دارند.

HF: Hormone free, SIM: Shoot inducing medium. Values followed by different letters within a column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) according to FLSD test.

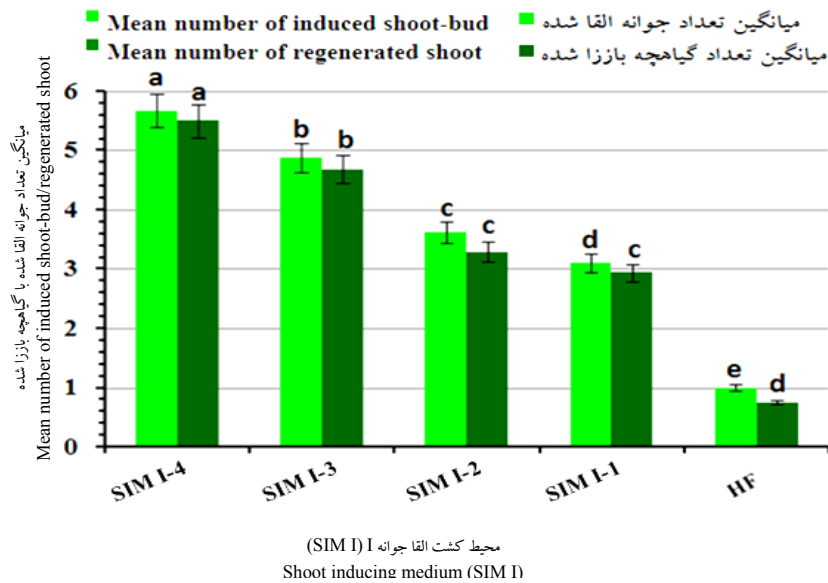


شکل ۱- القای جوانه‌های نابجا و باززایی مستقیم گیاه از ریزنمونه گره ساقه. (A) القای جوانه‌های نابجا (علامت‌های پیکان) بر روی ریزنمونه گره ساقه، (B) اندام‌زایی و باززایی گیاهچه‌ها، (C) رشد گیاهچه‌ها بعد از انتقال به محیط کشت MS حاوی TDZ ( $0.05 \text{ mg l}^{-1}$ )، (D) ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در محیط کشت MS نصف غلظت حاوی سطوح مختلف NAA و IBA، (E) گیاهان سازگار شده به محیط غیر استریل.

Fig. 1. Adventitious shoot-buds induction and direct plant regeneration from stem nodal explant. A) Shoot-bud induction (black arrows) on stem nodal explants in shoot inducing medium containing BAP/NAA or TDZ/AgNO<sub>3</sub>, B) Organogenesis and regeneration of shoots (white arrows), C) Shoot elongation in growth medium containing  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  TDZ, D) Rooting of plantlets in half strength MS medium containing different concentration and combinations of NAA and IBA, E) Acclimatization of plantlets to greenhouse condition after cultivation in pots.

شده و شاخساره باززا شده در هر سه رقم به دست آمد و در بین ارقام، رقم قره‌یونجه بیشترین تعداد جوانه القا شده و بیشترین تعداد شاخساره باززا شده را به خود اختصاص داد. به طور کلی تعداد جوانه‌های القای شده در میانگین سه رقم بین  $3/10$  الی  $5/80$  جوانه در هر ریزنمونه تحت تاثیر ترکیبی از سطوح مختلف BAP و NAA در مقایسه با تیمار شاهد

جوانه‌های القا شده و میانگین تعداد شاخساره‌های باززا شده در هر ریزنمونه اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) از نظر آماری وجود داشت و این تفاوت معنی‌دار بین محیط کشت‌های القای جوانه I (SIM I) در میانگین سه رقم نیز مشاهده شد (شکل ۲). تحت تاثیر محیط کشت SIM I-4 حاوی BAP ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) و NAA ( $0.2 \text{ mg l}^{-1}$ ) بیشترین تعداد جوانه القا



شکل ۲- اثر محیط کشت‌های SIM I (جدول ۱) حاوی ترکیب سطوح مختلف BAP و NAA بر القای جوانه نابجا و باززایی گیاهچه از ریزنمونه گره ساقه ستون‌های نمودار  $\pm$  SE میانگین سه رقم را نشان می‌دهد. حروف غیریکسان در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بر اساس آزمون FLSD است.

Fig. 2. Effect of SIM I media (Table 1) containing different concentrations and combinations of BAP and NAA on adventitious shoot-bud induction and shoot regeneration from stem nodal explant in three alfalfa cultivars  
The bars represent means of three cultivars  $\pm$  SE. Bars followed by different letter are significantly different ( $P < 0.01$ ) according to FLSD test.

نداشت. موثر نبودن BAP در سطوح پایین باززایی شاخساره از ریزنمونه گره ساقه در گیاهان *Portulaca grandiflora* (Safdari and Kazemitabar, 2010) و *Holarrhena antidysenterica* (Mallikarjuna and Rajendrudu, 2007) نیز گزارش شده است. با این حال در مطالعه‌ای دیگر نیوس و همکاران (Neves et al., 2001) از ژنوتیپ‌های منتخب *Medicago truncatula* برای پاسخ به کشت درون شیشه‌ای و توانایی جنین‌زایی آن‌ها استفاده کردند و القای جوانه‌های متعدد از مریستم جانبی کوتیلدون در

(جوانه در هر ریزنمونه) به دست آمد. BAP به عنوان یکی از سیتوکینین‌های موثر در القای جوانه‌های نابجا است و ترکیب آن با یک اکسین در غلظت‌های پایین منجر به القای جوانه‌های بیشتر از ریزنمونه گره ساقه در تعداد زیادی از گیاهان شده است (Sivanesan and Jeong, 2007) (Sunil et al., 2009). در تحقیق حاضر نیز با افزایش سطح BAP در ترکیب با NAA تعداد جوانه‌های القا شده و میزان باززایی افزایش یافت، ولی افزایش سطح NAA تاثیر معنی‌دار از نظر آماری بر صفات مورد نظر در هر سه رقم

از گونه‌ها در مقایسه با سایر سیتو کینین‌ها دارد (Khawar *et al.*, 2004). تاثیر TDZ بر القای جوانه‌های نابجا و باززایی بستگی به سطح هورمون‌های داخلی دارد و این تنظیم کننده رشد منجر به تنظیم سطح اکسین در گیاه می‌شود (Hutchinson and Saxena, 1996). مطالعات متعددی اثر فوق‌العاده TDZ بر القای جوانه‌های نابجا و میزان بالای باززایی در گیاهان تیره بقولات را گزارش کرده‌اند (Uranbey, 2005؛ Sajid and Aftab, 2009؛ باززایی (Hosseini-Nasr and Rashid, 2003). باززایی مستقیم در دو گونه یکساله یونجه با استفاده از ریزنمونه‌های دم‌برگ و گره ساقه توسط یانت‌چه‌وا و همکاران (Iantcheva *et al.*, 2005b). بر اساس نتایج حاصل، مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ منجر به القای جوانه‌های نابجای بیشتری در هر ریزنمونه شد، در حالی که در تحقیق حاضر غلظت پایین (۰/۱ mg l<sup>-1</sup>) TDZ برای القای جوانه و باززایی شاخساره‌ها در یونجه‌های چند ساله نتیجه بهتری نشان داد و با استفاده از ریزنمونه گره ساقه در کمترین زمان ممکن باززایی گیاه کامل انجام شد. در مطالعات اخیر نیز تاثیر TDZ در غلظت پایین بر القای میزان بالای جوانه‌های نابجا و باززایی از ریزنمونه گره کوتیلدونی در یونجه چندساله (Li *et al.*, 2009) و همچنین از ریزنمونه گره ساقه در گیاه *Holarrhena antidysenterica* (Mallikarjuna and Rajendrudu, 2007)

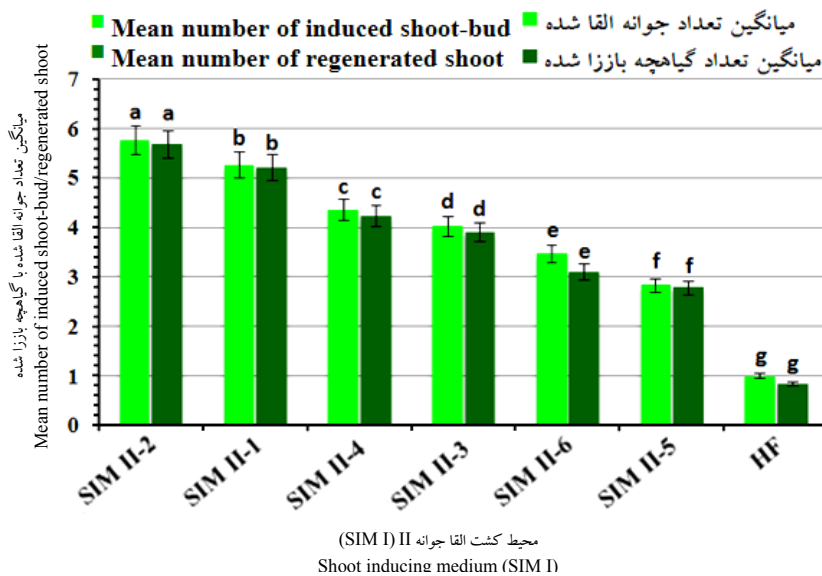
غلظت پایین (۰/۰۲ mg l<sup>-1</sup>) BAP گزارش شد. ولی در تحقیق حاضر وضعیت چند جوانه‌ی در ریزنمونه گره ساقه تحت تاثیر غلظت بالای BAP (۱ mg l<sup>-1</sup>) همراه با NAA (۰/۲ mg l<sup>-1</sup>) مشاهده شد.

#### تاثیر TDZ و AgNO<sub>3</sub> بر القای جوانه و باززایی

بر اساس نتایج حاصل از آزمایش دوم تحت تاثیر محیط کشت SIM II حاوی سطوح مختلف TDZ همراه با و یا بدون AgNO<sub>3</sub> (جدول ۲)، در هر سه رقم یونجه بین محیط کشت‌های مختلف SIM II و به ویژه محیط کشت HF (شاهد) از نظر میانگین تعداد جوانه‌های القاشده و میانگین تعداد شاخساره‌های باززا شده اختلاف معنی‌دار آماری (P < ۰/۰۵) وجود داشت و ارقام قره یونجه و همدانی به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقادیر صفات مورد بررسی بودند. به طور کلی در میانگین سه رقم، بین محیط کشت‌های مختلف از نظر صفات مورد بررسی اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۱) مشاهده شد (شکل ۳) و بیشترین تعداد جوانه القایی و بیشترین شاخساره باززا شده برای هر سه رقم در محیط کشت SIM II-2 حاوی TDZ (۰/۱ mg l<sup>-1</sup>) و AgNO<sub>3</sub> (۳ mg l<sup>-1</sup>) حاصل شد (شکل ۳ و جدول ۲).

TDZ نیز از موثرترین تنظیم کننده‌های رشد سیتو کینینی است که تاثیر قابل توجهی در القا و باززایی درون شیشه‌ای بسیاری





شکل ۳- اثر محیط کشت SIM II (جدول ۲) حاوی سطوح غلظت‌های مختلف TDZ به همراه و یا بدون  $AgNO_3$  بر القای جوانه و باززایی گیاهچه از ریزنمونه گره ساقه در مجموع سه رقم یونجه ستون‌های نمودار  $\pm$  SE میانگین سه رقم را نشان می‌دهند. حروف غیر یکسان در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بر اساس آزمون FLSD است.

Fig. 3. Effect of SIM II media containing different concentrations of TDZ along with or without  $AgNO_3$  on adventitious shoot-bud induction and shoot regeneration from stem nodal explant in three alfalfa cultivars

The bars represent means of three cultivars  $\pm$  SE. Bars followed by different letter are significantly different ( $P < 0.01$ ) according to FLSD test.

آن در افزایش میزان باززایی شاخساره‌ها وقتی که در ترکیب با یک سیتوکینین مانند TDZ استفاده شود، قبلاً گزارش شده است (Thiruvengadam *et al.*, 2010؛ Anantasaran and Kanchanapoom, 2008؛ Cogbill *et al.*, 2010). نتایج ما نیز تاثیر تقریباً مثبت  $AgNO_3$  که در ترکیب با TDZ استفاده شد، در تشکیل جوانه‌های نابجا و باززایی شاخساره‌ها را نشان داد، با این حال این اثر، به جز در SIM II-2 و SIM II-1 برای رقم اردوباد، از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲). نکته قابل توجه در مقایسه نتایج دو آزمایش در

گزارش شده است. شاخساره‌های باززا شده از هر دو نوع محیط القای جوانه، SIM I و SIM II در محیط رشد حاوی TDZ ( $0.05 \text{ mg l}^{-1}$ ) در عرض ۱۴-۱۰ روز در حد بسیار مناسب (رشد طولی ۵-۱۵ cm) رشد کردند (شکل ۱C). میزان شیشه‌ای شدن شاخساره‌ها تحت تیمار هر دو نوع محیط کشت بسیار پایین (۲-۴٪) بود (داده‌ها نشان داده نشدند) و لذا  $AgNO_3$  تاثیری در جلوگیری از شیشه‌ای شدن نداشت. تاثیر  $AgNO_3$  در بازدارندگی تولید اتیلن (بازدارنده باززایی درون شیشه‌ای) و همچنین اثر

SIMII-2 پتانسیل باززایی خوبی نشان دادند. ولی در مطالعات فوق‌الذکر ارقام از نظر برترین محیط کشت تنوع بیشتری نشان دادند که شاید تا حدوی به دلیل نوع روش باززایی (باززایی غیرمستقیم) باشد. به طور کلی در این تحقیق رقم قره‌یونجه پاسخ خوبی به باززایی مستقیم از طریق ریزنمونه گره نسبت به دو رقم دیگر نشان داد که در مطالعه زارع و همکاران (۲۰۰۹) نیز پتانسیل بالای این رقم در روش باززایی غیر مستقیم گزارش شده بود.

#### تاثیر NAA و IBA بر ریشه‌زایی

بر اساس نتایج حاصل، محیط کشت‌های القای ریشه حاوی سطوح مختلف NAA و IBA (جدول ۳) از نظر اثر بر میزان القای ریشه نابجا، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ نشان دادند. همچنین بین سه رقم از نظر ریشه‌های القا شده اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت و در حضور ترکیب تیماری NAA و IBA ( $1/5 \text{ mg l}^{-1}$  و ۱) با محیط پایه MS  $1/2$  بیشترین درصد ریشه‌زایی و بیشترین طول ریشه در هر سه رقم به دست آمد (جدول ۳) و با افزایش غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، ریشه‌های پرپشت و طبیعی (شکل ۱D) در مدت چهار هفته توسعه پیدا کردند. به طور کلی ارقام اردوباد، قره‌یونجه و همدانی به ترتیب بیشترین میانگین درصد ریشه‌زایی را نشان دادند، با این حال از نظر طول ریشه‌های القایی، رقم اردوباد پایین‌تر از دو رقم دیگر بود

این تحقیق، تاثیر TDZ در غلظت پایین در برابر تاثیر BAP در یک غلظت ۱۰ برابری برای حصول بیشترین میزان القا جوانه و باززایی است و به نظر می‌رسد تفاوت آماری معنی‌داری بین این دو تنظیم‌کننده رشد از نظر میزان اثربخشی وجود نداشته باشد (جدول‌های ۲ و ۳). اگر چه استفاده از غلظت بسیار پایین TDZ در برابر BAP از نظر اقتصادی نمی‌تواند خیلی مورد توجه قرار گیرد (قیمت TDZ بسیار بالاتر از BAP است)، ولی با در نظر داشتن احتمال تاثیر منفی غلظت بالای سیتوکینین‌ها از جمله عدم رشد طولی مناسب و شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها (Tatari Varnousfaderani *et al.*, 2012)؛ (Li *et al.*, 2009)، استفاده از محیط کشت حاوی غلظت پایین TDZ می‌تواند برتری داشته باشد.

در مطالعات مربوط به کشت بافت یونجه‌های چند ساله، وابستگی شدید باززایی به نوع ریزنمونه، رقم و محیط کشت گزارش شده است (Zare *et al.*, 2009)؛ (Barakat *et al.*, 1993). در تحقیق حاضر نیز مطابق با این مطالعات، اثر متقابل محیط کشت با رقم از نظر آماری معنی‌دار بود و با برش دهی سطوح فاکتور رقم در هر سطح فاکتور محیط کشت (داده‌ها نشان داده نشدند)، تاثیر نوع محیط کشت و تا حدودی رقم بر پتانسیل باززایی از یک ریزنمونه مشترک کاملاً بارز بود. با این حال، هر سه رقم مورد مطالعه در یک محیط کشت معین مانند SIM I-4 و یا

جدول ۳- تاثیر محیط MS نصف غلظت حاوی غلظت‌ها و ترکیبات مختلف IAA و NAA بر القای ریشه در گیاهچه‌های باززا شده سه رقم یونجه (*Medicago sativa* L.)

Table 3. Effect of half-strength MS medium containing different concentrations and combinations of NAA and IBA on root induction in regenerated plants of three alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars

NAA (mg l <sup>-1</sup> )	IBA (mg l <sup>-1</sup> )	اختصار Abbreviation	میانگین طول ریشه (cm) Mean of shoot length (cm)			میانگین درصد ریشه‌زایی Mean of rotting percentage (%)		
			اردوباد Ordobad	همدانی Hamedani	قره یونجه Ghareyonjeh	اردوباد Ordobad	همدانی Hamedani	قره یونجه Ghareyonjeh
1.0	1.0	RIM I	5.54d	13.00b	7.92c	92.36b	28.62b	72.29d
1.0	1.5	RIM II	12.25a	22.71a	14.26a	100.0a	100.0a	93.02a
1.5	1.0	RIM III	6.33c	6.25d	5.33d	90.17b	15.43c	53.26c
1.5	1.5	RIM IV	9.50b	10.69c	8.63b	100.0a	80.15b	72.05b

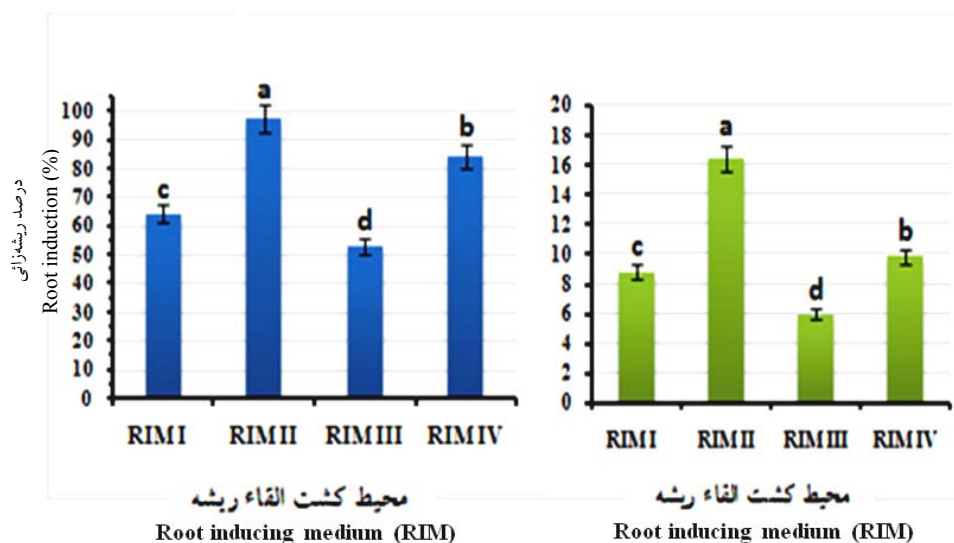
داده‌های دارای حروف غیر یکسان در هر ستون اختلاف آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بر اساس آزمون FLSD دارند.

RIM: Root inducing medium. Values followed by different letters within a column indicate significant differences at ( $P < 0.01$ ) according to FLSD test.

گیاهچه‌هایی بود که در محیط کشت‌های حاوی غلظت بالای TDZ و یا BAP باززا شده بودند (داده‌ها نشان داده نشدند). تاثیر بازدارندگی غلظت بالای سیتوکینین بر میزان ریشه‌زایی در گیاهان دیگر نیز گزارش شده است (Mahdavian *et al.*, 2010; Naik *et al.*, 2000) (Mohamed *et al.*, 2006).

گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به بسترهای مختلف کشت در گلدان منتقل شدند. این گیاهان در بستر پیت/پرلیت/خاک زراعی (۲/۱/۱ و ۱/۱/۱) به نحو مطلوبی رشد و نمو داشته و همه گیاهان به خوبی به شرایط محیطی طبیعی سازگار شدند (شکل ۱E). در بستر حاوی فقط پرلیت نیز گیاهان به خوبی رشد و سازگار شدند، با این حال بستر پیت/پرلیت همراه با خاک می‌تواند یک بستر خوب و نزدیک به بستر طبیعی برای سازگاری این گیاه باشد.

(جدول ۳). در MS ۱/۲ هیچ کالوسی در پایه گیاهچه‌های ریشه‌دار شده تولید نشد (شکل ۱D) ولی با استفاده از محیط پایه MS، کاهش میزان ریشه‌القایی همراه با تولید کالوس در قسمت پایه شاخساره‌ها مشاهده شد (داده‌ها نشان داده نشدند). شکل ۴، درصد القای ریشه و میانگین طول ریشه را تحت تاثیر محیط کشت‌های مختلف ریشه‌زایی در میانگین سه رقم یونجه نشان می‌دهد. در محیط کشت RIM II حاوی ۱ mg l<sup>-1</sup> NAA و ۱/۵ mg l<sup>-1</sup> IBA بیشترین میانگین درصد ریشه‌زایی و طول ریشه مشاهده شد. اگر چه رابطه منطقی بین سطوح NAA و IBA از نظر اثر بر روی میزان ریشه‌زایی دیده نشد ولی بر اساس نتایج حاصل (شکل ۳)، موثر بودن سطح بالای IBA (صرف نظر از NAA) بر روی میزان ریشه‌زایی و رشد ریشه‌ها مشهود بود. کمترین ریشه‌زایی مربوط به



شکل ۴- اثر محیط کشت‌های ریشه‌زایی (RIM) حاوی ترکیب غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر القاء ریشه در سه رقم یونجه چند ساله

ستون‌های نمودارها میانگین درصد ریشه‌زایی و یا میانگین طول ریشه‌ها را نشان می‌دهند. حروف غیریکسان در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بر اساس آزمون FLSD است.

Fig. 4. Effect of Root inducing media containing combination of different concentrations of NAA and IBA root induction in three alfalfa cultivars

The bars represent mean of rooting percentage or mean length of roots  $\pm$  SE. Bars followed by different letter are significantly different ( $P < 0.01$ ) according to FLSD test.

هستند، استفاده شد (داده‌های گزارش نشده) و به نظر می‌رسد در دامنه وسیعی از ارقام یونجه بدون وابستگی یا با وابستگی کمتر به ژنوتیپ قابل کاربرد باشد. این روش مانند دیگر پروتوکل‌های باززایی مستقیم دارای مزایایی مهمی از جمله تولید در مقیاس بالا در یک دوره کوتاه مدت (تقریباً ۴۵ روز) و عدم وجود و یا پایین بودن تغییرات ژنتیکی ناخواسته در کشت‌های درون شیشه‌ای (بر خلاف روش‌های باززایی غیر مستقیم) است. چنین مزایایی در پروژه‌های تراریختی ژنتیکی گیاهان سرسخت مانند یونجه و همچنین برای تولید گیاهان با یکنواختی ژنتیکی بالا در پروژه‌های به‌نژادی و

گیاهان باززا شده با ۱۰۰٪ زنده‌مانی به شرایط محیطی سازگاری یافتند و هیچ‌گونه خصوصیات مورفولوژیکی غیر طبیعی در این گیاهان در مقایسه با گیاه والدینی مشاهده نگردید.

در این مطالعه، یک پروتوکل ساده و کارآمد برای روش باززایی مستقیم با استفاده از یک ریزنمونه (گره ساقه) مناسب به لحاظ تهیه بسیار راحت آن و پتانسیل بالای باززایی ارائه شد. این پروتوکل برای باززایی درون شیشه‌ای تعدادی از گونه‌های دیگر چند ساله و حتی در گونه‌های یک ساله Medicago که معمولاً نسبت به کشت‌های درون شیشه‌ای سرسخت

گونه‌های مختلف یونجه در مطالعات آتی  
پیشنهاد نشد.

#### سپاسگزاری

از آقای مهندس اودیشو، عضو هیئت علمی  
مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی  
آذربایجان غربی، به خاطر فراهم کردن بذر  
مورد نیاز سپاسگزاری می‌شود.

یا جهت استفاده در کشاورزی مولکولی  
(Molecular farming) برای تولید پروتئین‌های  
نو ترکیب در مقیاس انبوه حائز اهمیت است. با  
این حال، ارزیابی‌های لازم برای تعیین ثبات  
ژنتیکی گیاهان تولید شده با استفاده از این  
پروتکل، بهینه‌سازی‌های تکمیلی با در نظر  
گرفتن فاکتورهای موثر دیگر در کشت‌های  
درون شیشه‌ای و بررسی قابلیت کاربرد آن در

#### References

- Anantasaran, J., and Kanchanapoom, K. 2008.** Influence of medium formula and silver nitrate on *in vitro* plant regeneration of zinnia cultivars. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 30 (1): 1–6.
- Barakat, M. N., Milad, S., and Khadr, F. H. 1993.** Screening alfalfa for regeneration capacity. *Journal of King Saud University Agricultural Science* 15(2): 237–249.
- Beegum, S. A., Martin, K. P., Zhang, C. L., Nishitha, I. K., Ligimol, M, Slater, A., and Madhusoodanan, P. V. 2007.** Organogenesis from leaf and internode explants of *Ophiorrhiza prostrata*, an anticancer drug (camptothecin) producing plant. *Electronic Journal of Biotechnology* 10 (1): 114–123.
- Cogbill, S., Faulcon, T., Jones, G., McDaniel, M., Harmon, G., Blackmon, R., and Young, M. 2010.** Adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of rapid-cycling fast plants of *Brassica rapa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101: 127–133.
- 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.
- Hisano, H., Kimoto, Y., Hayakawa, H., Takeichi, J., Domae, T., Hashimoto, R., Abe, J., Kanazawa, A., and Shimamoto, Y. 2004.** High frequency Agrobacterium mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*. *Plant Cell Reports* 22: 910–918.

- Hosseini-Nasr, M., and Rashid, A. 2003.** Thiadiazuron-induced high frequency shoot regeneration from root region of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings. *Biologia Plantarum* 47: 591–596.
- Hutchinson, M. J., and Saxena, P. K. 1996.** Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thiadiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium hortorum* Bailey) tissue culture. *Plant Cell Reports* 15: 512–515.
- Iantcheva, A., Slavov, S., Prinsen, E., Vlahova, M., Onckelen, H. V., and Atanassov, A. 2005a.** Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 37–43.
- Iantcheva, A., Vlahova, M., and Atanassov, A. 2005b.** Investigation of the potential of two wild medicago species– *Medicago orbicularis* and *Medicago arabica* for *in vitro* callusogenesis and direct organogenesis. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 14: 27–31.
- Iantcheva, A., Vlahova, M., and Atanassov, A. 2005c.** Somatic embryogenesis in genera *Medicago*: an overview. pp. 285–304. In: Mujib, A., and Samaj, J. (eds.) *Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monograph 2*. Springer-Verlag Berlin Hiedelberg, Germany.
- Khawar, K. M., Sancak, C., Uranbey, S., and Zca, S. 2004.** Effect of thiadiazuron on shoot regeneration from different explants of lentil (*Lens culinaris* Medik) via organogenesis. *Turkish Journal of Botany* 28: 421–426.
- Li, J. J., Wu, Y. M., Wang, T., and Liu, J. X. 2009.** *In vitro* direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa* L. *Biologia Plantarum* 53 (2): 325–328.
- Mahdavian, M., Bouzari, N., and Abdollahi, H. 2010.** Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahlab rootstock (SL-64). *Seed and Plant Improvement Journal* 26-1: 15-26 (in Persian).
- Mallikarjuna, K., and Rajendrudu, G. 2007.** High frequency *in vitro* propagation of *Holarrhena antidysenterica* from nodal buds of mature tree. *Biologia Plantarum* 51: 525–529.
- Matheson, S. L., Nowak, J., and Maclean, N. L. 1990.** Selection of regenerative genotypes from highly productive cultivars of alfalfa. *Euphytica* 45: 105–112.

- McKersie, B. D., and Bowley, S. R. 1993.** Synthetic seeds of alfalfa. pp. 231–255. In: Redenbaugh, K. (ed.) Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Mohamed, S. V., Sung, J. M., Jeng, T. L., and Wang, C. S. 2006.** Organogenesis of *Phaseolus angularis* L.: high efficiency of adventitious shoot regeneration from etiolated seedlings in the presence of N6-benzylaminopurine and thidiazuron. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 86 (2): 187–199.
- Moltrasio, R., Robredo, C. G., Gomez, M. C., Diaz Paleo, A. H., Diaz, D. G., Rios, R. D., and Franzone, P. M. 2004.** Alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite Argentinean germplasm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 77: 119–124.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–476.
- Naik, S. K., Pattnaik, S., and Chand, P. K. 2000.** *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoots proliferation from nodal segments of mature tree. Scientia Horticulturae 79: 175–183.
- Neves, L. O., Tomaz, L., and Fevereiro, M. P. S. 2001.** Micropropagation of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong and *Medicago truncatula* ssp. *Narbonensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 81–84.
- Ray J. R., and Nolan, K. E. 1995.** Regeneration of *Medicago truncatula* from protoplasts isolated from kanamycin-sensitive and kanamycin-resistant plants. Plant Cell Reports 14: 349–353.
- Safdari, Y., and Kazemitabar, S. K. 2010.** Direct shoot regeneration, callus induction and plant regeneration from callus tissue in Mose rose (*Portulaca grandiflora* L.). Plant Omics Journal 3(2):47–51.
- Sajid, Z. A., and Aftab, F. 2009.** Effect of thidiazuron (TDZ) on *in vitro* micropropagation of *solanum tuberosum* l. cvs. Desiree and Cardinal. Pakistan Journal of Botany 41(4): 1811–1815.
- Samac, D. A., and Temple, S. J. 2004.** Development and utilization of transformation in *Medicago* Species. pp. 165–195. In: Lianh, G.H., and Skinner, D.Z. (eds.)

- Genetically Modified Crops: Their Development, Uses and Risks. Food Products Press, New York, USA.
- Shah, H. S., Wainwright, S. J., and Merrett, M. J. 2003.** Regeneration and somaclonal variation in *Medicago sativa* and *Medicago media*. Pakistan Journal of Biological Sciences 6(9): 816–820.
- Shao, C. Y., Ussinova, E. R., Iantcheva, A., Atanassov, A., McCormac, A., Chen, D. F., Elliott, M. C., and Slater, A. 2000.** Rapid transformation and regeneration of alfalfa (*Medicago falcata* L.) via direct somatic embryogenesis. Plant Growth Regulation 31: 155–166.
- Sivanesan, I., and Jeong, B. R. 2007.** Direct shoot regeneration from nodal explants of *Sida cordifolia* Linn. In vitro Cellular and Developmental Biology Plant 43: 436–441.
- Smolenskaya, S. E., and Ibragimova, S. S. 2002.** Restorative Morphogenesis in vitro in the Annual Medic in the Presence of Benzylaminopurine. Russian Journal of Developmental Biology 3 (6): 349–354.
- Sunil, B., Abdullah, J. O., Sreeramanan, S., and Karuthan, C. 2009.** Shoots induction from *Hibiscus Rosa-sinensis* nodal explant using N<sub>6</sub>-benzylaminopurine (BAP). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 5(4): 403–410.
- Tatari Varnousfaderani, M., Mousavi, S. A., and Bouzari, N. 2012.** Micropropagation of some clonal rootstocks of stone fruits. Seed and Plant Improvement Journal 28-1: 53-66 (in Persian).
- Thiruvengadam, M., Rekha, K. T., Yang, C. H., Jayabalan, N., and Chung, I. M. 2010.** High-frequency shoot regeneration from leaf explants through organogenesis in bitter melon (*Momordica charantia* L.). Plant Biotechnology Reports 4: 321–328.
- Uranbey, S. 2005.** Thidiazuron induced adventitious shoot regeneration in henbane (*Hyoscyamus niger* L.). Biologia Plantarum 49 (3): 427–430.
- Zare, N., Valizadeh, M., Tohidfar, M., Mohammadi, S. A., Malboobi, M. A., and Habashi, A. A. 2009.** Selection of regenerative genotypes from Iranian alfalfa cultivars. Journal of Food, Agriculture & Environment 7: 567–572.