جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

📖1

www.kandoocn.com

فصل اول

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

www.kandoocn.com

مقدمه و کلیات

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

فصل اول

مقدمه:

روشهای سنتی اصلاح نباتات مبتنی بر دستکاری ساختار ژنتیکی گیاه کامل و از طریق تولید جنسی است. در سالهای اخیر روشی برای دستکاری ژنتیکی در سطح سلولی پیدا شده است که روشهای اصلاحی را بطور منحصر بفرد کامل می کند. موجودیت پیدا کردن روشهای کشت بافت و سلول را می توان به پیشرفتهای ناشی از دانش کشت سلولی و زیست شناسی مولکولی دانست (4 و 51)

بیوتکنولوژی یا فناوری زیستی مجموعه ای از فنون را تشکیل می دهد که امکان بکارگیری، توانایی و کارآیی سلولهای موجودات زنده اعم از حیوانی یا گیاهی را فراهم می سازد. در سالهای اخیر با انجام تحقیقات متعدد در حوزهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی این بخش دارای جایگاه مهم و باارزشی شده است و این امکان را در رابطه با گیاهان زراعی فراهم نموده است که بسیار مطالب کارآتر از روشهای کلاسیک اصلاح نباتات با استفاده از تکنیکهای مختلف از قبیل دست ورزی ژنتیکی (Genetic manipulation)، کشت بافت و سلول

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

گیاهی در شرایط In Vitro و غیره، گیاهانی با سازگاری متناسب تر و بیشتر به شرایط محیطی و همچنین سازگار با نیاز انسانها تولید نماید.

تکنیک کشت بافت و سلول گیاهی در شرایط In Vitro ازجمله فنون بیوتکنولوژی است که کاربرد آن به اوایل سالهای 1950 می رسد. بر اساس این تکنیک، سلول گیاهی یا بافت از اندامهایی مثل ریشه، ساقه، برگ و گل آذین یا هر اندام دیگری از گیاه جدا شده و در شرایط کاملاً استریل و گندزدایی شده، در درون لوله های آزمایش محتوی محیط غذایی مصنوعی قرار گرفته و با تأمین نیازهای نوری و حرارتی مناسب تبدیل به یک گیاه کامل می گردد. این تکنیک همانطور که اشاره شد امکان تولید هزاران گیاهچه مشابه گیاه مادری را در مدت زمان بسیار کوتاهی و در فضای فیزیکی بسیار محدودی فراهم می‌سازد که با انتقال این گیاهچه ها به سطح گلخانه و مزرعه تولید انبوهی از گیاهان مورد نظر را می توان باعث شد. در اصلاح نباتات با استفاده از تکنیک کشت بافت و نیز تولید کالوس یا گیاهچه ها در مقیاس وسیع و انجام گزینش در بین نمونه ها می توان از ارقام مقاوم به استرسهای محیطی را تولید نمود. فنون فوق فرصتهای مناسبی در بخشهای مختلف تحقیقاتی، اقتصادی

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

بوجود آورده است که با تقویت بخش دولتی و فعال نمودن بخش خصوصی کارایی این بخشها را برای تأمین و تولید محصولات اساسی کشور را، بطور قابل ملاحظه ای می توان افزایش داد. (51 و 98)

تاریخچهٔ اهمیت کشت بافت:

مفهوم کشت بافت گیاهی خلاصهٔ عبارت کشت پروتوپلاست گیاهی، سلول گیاهی، بافت و کشت اندام گیاهی است. کشت بافت و سلول گیاهی بر اساس نظریهٔ شوان مبنی بر دارا بودن خاصیت توتی پوتنسی سلولها پایه گذاری شد. توتی پوتنسی خاصیتی است که بر اساس آن یک سلول دارای توان تبدیل شدن به موجود کامل است. در سالهای اخیر، تکنیک کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قدرتمند برای تکثیر و اصلاح بسیاری از گونه های گیاهی تبدیل گشته است. این تکنیک با ابراز نظریهٔ گوتلیب هابرلاندت در مورد خاصیت توتی‌پوتنسی در سلول گیاهی در آغاز قرن بیستم آغاز گردید. هارلاند پیشنهاد نمود که روشهای جداسازی و کشت اندام گیاهی باید توسعه یابد و ادعا نمود که اگر محیط و مواد غذایی سلولهای کشت شده، دستورزی شده باشند، آن

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سلولها باید صفات ارثی مربوط به مراحل رشد و نموی گیاه اولیه را تکرار نمایند. دیدگاه هابرلاند در حقیقت قابل توجه بود زیرا وی حتی بیان داشت که خارج از سلولهای سوماتیکی زنده، جنینهای مصنوعی به صورت غیر جنسی رشد و نمو می یابند.(5) احتمالاً وایت نخستین کسی بود در سال 1954 مسئله کشت سلولی را به روشنی بیان کرد. او بیان داشت که تفاوتهای بین سلولهای دیگر در آن ارگانیسم می باشد. لذا امکان دارد بتوان با جدا نمودن سلول، پتانسیل نهفته توتی پوتنت را به آنها بازگردانید. البته احتمال دارد که این خاصیت در سلول برای همیشه از دست رفته باشد. اسکوگ و میلر در 1957 پیشنهاد نمودند که اثرات متقابل کمی بین اکسین و سیتوکینین نوع رشد و مراحل مورفولوژیک را که باید در گیاه رخ دهد، تعیین می کنند. مطالعات آنها در توتون نشان داد که نسبت بالای اکسین به سیتوکسین باعث القای رشد ریشه می شود؛ درحالیکه نسبت بالای سیتوکسین به اکسین باعث القای رشد ساقه میگردد، هرچند که این الگو پاسخ کلی و عمومی نیست. (1 و 5 و 9 و 98)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

دستورزی نسبت اکسین به سیتوکینین در بسیاری از گونه ها و جنسها برای ریخت زایی موفقیت آمیز بوده است. کارهایی که توسط مورل[1] (1960) روی ازدیاد ارکیده انجام گردیده است، آغازی برای کاربرد تکنیک کشت بافت گیاهی برای تکثیر و اصلاح بسیاری از گونه های گیاهی بود که منجر به توسعه و گسترش استفاده از محیطهای کشت جدید با غلظتهای بالای نمک توسط موراشیگ و اسکوک[2] گردید.

در سال 1966 نیز گوها[3] و محشوری[4] امکان ایجاد تعداد زیادی از گیاهچه هاپلوئید از دانه داتوره بوسیله کشت بساکهای نابالغ را ثابت کردند. (98)

در سال 1970 اولین امتزاج موفقیت امیز پروتوپلاست در محیط کشت تحقق یافت. در همین سال انتخاب موتانهای بیوشیمیایی در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت. در 1974 تولید گیاهان هیبرید حاصل از امتزاج پروتوپلاستهای هاپلوئید به نتیجه رسید. (1 و 98)

[1] - morel
[2] –moraching & skog
[3] –Guha
[4] –Maheshwari

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

تحقیقات در زمینه کشت بافت گیاهی از سال 1975 به بعد بطور چشمگیری افزایش یافت و از دهۀ 1980 به بعد به عنوان بخش مهمی از بیوتکنولوژی گیاهی مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است بطوریکه در سال 1977 توسط چلتون و همکاران ادغام موفقیت آمیز DNA پلاسمید Ti از Agrobacteriam tumefaciens به گیاهان صورت گرفت. (98 و 100)

در حال حاضر کشت بافت به عنوان پیش نیاز مهندسی ژنتیک از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از طرفی کشت بافت بعنوان مکمل روشهای کلاسیک متداول در اصلاح نباتات بکار می رود نه جایگزین آن (86 و 100)

اساس گیاه شناسی برای کشت بافت:

ظرفیت طبیعی گیاهان به منظور تکثیر توسط فرآیندهای غیرجنسی، اساس تکثیر در تکنیک کشت بافت است. کشت بافت به سادگی به ما کمک می کند تا از پتانسیل طبیعی موجود در گیاه برای رشد و تکثیر استفاده کنیم که البته تکنیکی بسیار کارآمد و قابل پیش بینی است (62 و 96)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

اهداف مورد نیاز با استفاده از تکنولوژیهای جدید کشت بافت و مهندسی ژنتیک:

- تکثیر سریع گیاهان جهت استفاده در تحقیقات اصلاحی ژنتیکی.
- تولید گیاهان هاپلوئید و دای هاپلوئید
- ایجاد هیبریداسیون سوماتیکی بین گونه ای و بین جنسی
- ایجاد موتاسیونهای القایی
- حفظ و نگهداری منابع گیاهی از طریق کشت بافت
- انتقال ژنهای خارجی مطلوب به سلولهای مورد نیاز از طریق کشت بافت و مهندسی ژنتیک
- تولید گیاهان عاری از ویروس
- ایجاد لاینهای مقاوم به امراض و بیماریها
- ایجاد لاینهای مقاوم به شوری و خشکی
- تهیه لاینهای مقاوم به علف کشها

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

www.kandoocn.com

فصل دوم

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

www.kandoocn.com

خصوصیات زراعی

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

فصل دوم

تاریخچه:

طبق نظر واویلوف دانشمند روسی، مبدأ یونجه مرکز خاور نزدیک آسیای صغیر، قفقاز ایران و مناطق کوهستان روسیه است. مرکز جغرافیائی یونجه را غالباً کشور ایران می دانند. باید گفت که یونجه مدتها پیش از زمانی که از آن در تاریخ ذکری به میان آمده است، کشت می شد و هم اکنون نیز بطور وحشی در اکثر نقاط دنیا رشد می یابد. مطالعات خانم سینکایا (sinskaya) نشان می دهد که یونجه از لحاظ مبدأ دارای دو مرکز است. نخستین مرکز آن ناحیه کوهستانی قفقاز بود که ارقام جدید یونجه های اروپائی از آن بدست آمده است. دومین مرکز مستقل پیدایش را آسیای مرکزی می دانند.

تاریخچه یونجه، سرگذشت مهمترین گیاه علوفه ای دنیا و اولین گیاه علوفه ای اهلی شده است که بشر اولیه اهمیت و ارزش آن را بعنوان غذای دام تشخیص داده است. از نظر تکاملی، توجه به کشت یونجه بطور چشمگیری موفقیت آمیز بوده است که علت این امر شاید وجود سیستم ریشه ای مناسب آن است که طی قرون متمادی و تکامل همزیستی باکتری ریزوبیوم و ریشه یونجه، گیاه یونجه به

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

یک منبع ازت سرشاری دست یافته است که نیاز این گیاه به این عنصر غذایی را مرتفع می نماید. از طرفی ریشه یونجه بعلت عمیق و راست بودن، توانایی کافی در جذب رطوبت از اعماق خاک را داراست که گیاه را در شرایط خشکی از خطر نجات می دهد. همچنین گیاه یونجه در اثر خشکی و سرما به حالت رکود و خواب رفته و بعد از وجود شرایط مناسب به رشد خود ادامه خواهد داد. ساقه های خزنده یونجه (stolon) و ریشه های خزنده زیرزمینی (Rizom) و طوقه به خاک نشسته یونجه مقاومت گیاه را در مقابل سرما و یخبندان افزایش می دهد. (6 و 62)

اهمیت اقتصادی:

غذای دامهای نشخوار کننده، سیستم پیچیده ای را در دنیا از تظر تولید غذائی به نمایش می گذارد. 75 درصد غذای تولید شده دنیا را حیوانات نشخوارکننده مصرف می کنند.

60-80 درصد غذای حیوانات نشخوارکننده را علوفه تامین می نماید. 18 درصد غذای بشر و 36 درصد از پروتئین مصرفی انسان را علوفه تامین می کنند

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

و از این لحاظ بهترین وسیله برای تقویت غذائی بشر می باشد. یونجه گیاهی است که بیشترین تولید در میان علوفه ها را در دنیا به خود اختصاص داده است. در دنیا یونجه بعنوان غذای دام بطور مستقیم بصورت چراگاه و یا در دامداریهای صنعتی مورد استفاده قرار می گیرد و بعنوان منبع هیدرات کربن و پروتئین دام مورد استفاده قرار می گیرد.

کشور ایران دارای 20 میلیون هکتار زمین قابل کشت است که سالیانه حدود 10 میلیون هکتار به حال آیش گذاشته می شود و حدود 8/5 تا 9 میلیون هکتار به زیر کشت می رود. 5/6 میلیون هکتار به کشت گندم و بقیه به سایر محصولات شتوی و صیفی اختصاص دارد که 284936 هکتار آن را یونجه تشکیل می دهد. (6 و 64)

گیاهشناسی یونجه:

گیاهی است چند ساله دارای ریشه ای راست و مستقیم که به نام ریشه اولیه یونجه معروف است. این ریشه بعد از قرار گرفتن بذر در خاک و جذب رطوبت، بدون انشعاب است. به موازات تشکیل این ریشه قسمت زیر لپه یا

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

هیپوکوتیل در زیر سطح خاک نمودار می شود. و با طویل شدن آن باعث جوانه زدن و خارج شدن از سطح خاک می شود که در این مرحله گیاهی است حساس نسبت به کمبود آب، افزایش بیش از حد آب، شوری خاک و سله بستن. وقتی زیر لپه یونجه از سطح حاک نمودار گردد، در این موقع یونجه جوانه زده فقط دارای دو لپه یا کوتیلدون است که بصورت برگهای متورم به نظر می آیند و بعد از مدتی از بین رفته و برگهای اصلی از مرکز آن بوجود می آیند که دارای دمبرگی طول می باشند که معمولاً قلبی شکل بوده و شباهتی به برگهای اصلی یونجه ندارد. که بعد از طی زمان نخستین برگ مرکب 3 برگچه ای نمایان می شود.

علاوه بر ریشه اصلی، ریشه های جانبی نیز از سلولهای حاشیه استوانه مرکزی ریشه اصلی نمودار می شود. که عامل موفقیت یونجه در مقابل عوامل نامساعد وجود سیستم مناسب ریشه می باشد. بعد از کشت چند هفته از رشد و نمو گیاه و وجود رابطه همزیستی ریشه گیاه با باکتریهای ریزوبیوم یونجه دیگری نیازی به ازت خاک ندارد. علاوه بر آن ریشه عمیق و راست یونجه موجب جذب رطوبت از اعماق تا 5 متر نیز می شود. که امتیاز باارزشی در مقاومت به خشکی

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

است. ساقه های خزنده روی زمین (استولون)، ریشه های خزنده زیرزمینی (ریزوم) از قسمتهایی هستند که در طول مدت رشد و نمو این گیاه به وجود می آیند.

ساقه اصلی یونجه چهارگوش به نظر می رسد و مغز آن از سلول های پارانشیمی نسبتاً بلند و فشرده پر شده است و دارای انشعابات بسیار زیاد و ظریفی است که هر کدام برگهای مرکب زیاد دارد. ساقه یونجه در نزدیک سطح خاک، انشعابات زیادی تولید کرده که به مرور زمان چوبی و ضخیم می‌شود و به طوقه تبدیل می گردد. که از این محل ساقه های کوتاه منشعب و ضخیم بوجود می آید که تبدیل به ساقه های بلند و اصلی یونجه می شود. تعداد ساقه ها بین 5 تا 40 عدد است که از ناحیه طوقه خارج می شود و از هر ساقه بعد از چیدن یا رسیدن، ساقه دیگری تولید می شود. بعد از گذشت چند سال طوقه بصورت توده انبوهی درمی آید که در داخل خاک و یا خارج از خاک قرار می گیرد. ساقه های هوائی راست، سبزرنگ و پوشیده از کرک های نرم است. ارتفاع این ساقه ها در ارقام مختلف، در برداشت های مختلف، در مناطق گوناگون و در خاکها، با یکدیگر متفاوت است.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

برگ های یونجه مرکب، رنگ برگچه های یونجه سبز تیره، تخم مرغی، سطح زیرینشان پوشیده از کرک است. برگچه و سطح برگ مرکب یک دمبرگچه کوتاه دارد ولی برگچه های جانبی فاقد دمبرگچه می باشند. در قاعده دمبرگ دو گوشوارک یا استیپول وجود دارد که به دمبرگ متصل هستند، هر کدام زائده ای باریک و بلند در انتها و نیز دندانه هائی ظریف و کوچک در قاعده دارد. برگچه های یونجه کشیده، طویل و تقریباً در انتهای آن مضرس است. برگچه ها دارای یک رگبرگ اصلی یا رگبرگچه هستند که تا راس برگچه امتداد می یابد و از این رگبرگچه اصلی، رگبرگچه های فرعی منشعب می شود. گل یونجه دارای خصوصیات ویژه ای است. رشد و نمو گل یونجه، از انتهای شاخه ها با تغییر حالت از رشد و نمو رویشی به زایشی آغاز می شود. این تغییر حالت در فصل بهار از دهمین تا چهاردهمین گره از طوقه یونجه و در فصا تابستان از ششمین تا دهمین گره صورت می گیرد. بنابراین مفهوم آن این است که یونجه هایی که در بهار به گل می نشینند دارای رشد و نمو زیادتری هستند و ارتفاع ساقه آنها هم بیشتر است ولی یونجه هائی که در تابستان به گل می نشیند ارتفاع کمتری دارند. هر گل دارای یک کاسه، یک جام، ده پرچم و یک

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مادگی است. کاسه گل شامل پنج کاسبرگ متصل است که به پنج قسمت یا دندانه تقسیم می شود و طول هر قسمت تقریباً برابر طول کاسه است. جام گل شامل 5 گلبرگ به نامهای درفش، بال و ناو به هم پیوسته است. رنگ گل یونجه معمولی شبهی از رنگ ارغوانی یا بنفش است. رنگ گل یونجه داسی مدیکاگو فالکاتا، زرد تیره و رنگ یونجه مدیکاگو لوپولینا، زرد رنگ است. رنگ گل ارقام مختلف گونه های جنس میکاگوممکن است سفید، بنفش، زرد و یا رنگارنگ باشد. مادگی یونجه شامل یک برچه با تخمدان فوقانی، خامه صاف و میان تهی و کلاله مشخص است. تخمک ها بطور متناوب در طول شکاف شکمی تخمدان تشکیل می شوند. معمولاً ده تا دوازده تخمک در تخمدان یونجه رشد می کند، ولی تعدادشان ممکن است بین شش تا هیجده عدد تغییر کند. درون گل یونجه، ده پرچم قرار دارد که نه عدد آنها به هم متصل و دهمین پرچم، نزدیک به درفش آزاد است. میله های پرچم مادگی را احاطه می کنند. (6)

آب و هوا:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

گیاه یونجه بهترین رشد را در مناطقی دارد که هوای آن مناطق، خشک، آفتابی، گرم و نیز آب زیادی در دسترس داشته باشد. که در شرایط ایران جلگه خوزستان، دشت مغان و منطقه جیرفت مطلوب به نظر می رسد. بطور کلی در ایران می توان سه منطقه مختلف آب و هوائی را برای رشد و نمو یونجه در نظر گرفت: مناطق خشک، نیمه خشک و مرطوب. مستعدترین مناطق برای رشد و نمو یونجه، در صورت وجود آب کافی مناطق خشک و پس از آن مناطق نیمه خشک و در آخر مناطق مرطوب است.

یونجه در مقابل تغییرات دمای محیط حساس نیست و قادر است دمای 50 تا 60 درجه سانتیگراد زیر صفر و 50 درجه سانتیگراد بالای صفر را تحمل نماید. یونجه با ریشه های عمیقی که دارد می تواند در مناطق نسبتاً خشک و کم آب مقاومت کند.

کشت یونجه در ارتفاعات مختلف انجام می گیرد. از ارتفاع 2465 متری در آبعلی 1644 متری در همدان تا ارتفاع 1000 متری در ابرقو کشت می شود. کشت یونجه در ارتفاع پایین تر مثل ابادان و اهواز (13 متر) و حتی پایین تر از سطح دریای آزاد در رشت، امکان پذیر می باشد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

یونجه در محل های گوناگونی و در خاکهای مختلف رشد و نمو می یابد. در نیم کره شمالی تا نیم کره جنوبی از مناطق کوهستانی تا مناطق جلگه در خاکهای سنگین تر خاکهای سبک و شنی رشد می یابد.

بغیر از مرحله جوانه زدن در سایر مراحل رشد به شوری خاک مقاوم است. در خاکهای آهکی نیز یونجه رشد خوبی می تواند داشته باشد. (6)

کاربرد بیوتکنولوژی در اصلاح یونجه:

چگونه بیوتکنولوژی باید برای توسعه یک برنامه پیشرفته اصلاحی یونجه بکار برده شود تا واریته های بهتر، متناسب برای تحویل در تولید مثل با حداکثر خاصیت هتروزیگوسیتی ایجاد شود، موضوعی است که اخیراً مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. در این مقوله، بهبود نژادهای والدینی و بکارگیری هیبریداسیون می تواند تغییر و تبدیل در واریته را در جهت اهداف مشخصی افزایش دهد. موارد زیر جزو بارزترین راهکارهای بیوتکنولوژی برای بهبود یونجه است (64 و 103 و 104 و 89)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مهندسی ژنتیک:

ژنهای بالقوه برای مهندسی ژنتیک عبارتند از: ژن پروتئینی Bacillus thuringiensis برای کنترل حشرات بال پولکی، ژنهای پروتئینی پوشش ویروس، ژن مقاومت به علف کش، ژنهای بازدارنده آنزیم (تجزیه کننده) پروتئین برای بهبود کمیت و کیفیت و از بین بردن آنزیمهای هضم کننده پروتئینی قارچی و شکارچی حشرات (Abelson, 1989, Ryan, 1939)، ژنهای پروتئینی بازدارنده آنزیم (تجزیه کننده) پلی گالاکتوز برای جلوگیری از فعالیت endo-polygalacturonase میکرو ارگانیسم های از بین برنده دیواره سلولی (Degra et al 1988)، ژن glutamin-synthetose anti-sense برای افزایش محصول، ژنهای آنزیم کننده، کیتین برای هیدرولیز کردن جلد حشرات تغذیه کننده (Abelson , 1989) و مواردی از قبیل مقاومت به آلومینیوم. ورای سهولت دسترسی، محدودیت عمده در ترکیب ژنهای مورد نظر به درون واریته های تجارتی همان پروسه ای خواهد بود که بوسیله آن واریته های یونجه اصلاح می شوند. واریته های یونجه با ترکیب تعداد زیادی افراد اصلاح شده و واریته ترکیبی را بوجود می آورند. این پروسه

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سهم ژنتیکی فرد را در جمع به حداقل می رساند. (83 و 103)

هیبریداسیون گسترده:

تکنیکهای پروتوپلاسم و درآوردن جنین برای هیبریداسیون یونجه های زراعی گونه های یونجه یک ساله Medicago با لگومهای دیگر مثل اسپرس (Onobrychis vicifolia Scop) و شبدر (Lutus corniculatus L.) بکار می رود. یکی از برجسته ترین کارهای این شیوه انتقال مقاومت می باشد (مقاومت به نفخ). (87 و 92)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

www.kandoocn.com

فصل سوم

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

کشت بافت

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

فصل سوم

بررسی منابع:

کشت بافت یونجه:

اولین گزارش مربوط به کشت بافت یونجه توسط ساندروز وبینگهام در سال 1972 انتشار یافت. آنها گزارش کردند که کالوس می تواند تخمدان نارس[۱]، میان گرهها، هیپوکوتیل[۲] و حتی پرچم نارس[۳] تولید شود. همچنین همهٔ گیاهان تولید شده دارای کروموزومهای سوماتیکی برابر گیاهان دهنده بودند. بعد از این تحقیق راندمان باززایی رو به پیشرفت گذاشت. آرسیونی و همکاران(1990) تعداد ی از گزارشات کشت بافت یونجه که شامل نوع گونه، کالتیوار، ریزیونجه، محیط کشت القاء کالوس[۴] و یا محیط کشت رشد[۵]، محیط باززایی و نوع باززایی[۶] را گردآوری کردند. (8)

---

۱ - Immature ovaries

۲ - Hypocityl

۳ - Ymmature anthers

٤ - Callus induction medium

٥ - Growth medium

٦ - Type of regeneration

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در سال 1972 ساندرز[1] و بینگهام[2] تولید کالوس را در محیط نیمه جامد بررسی کردند. تحقیقات آنها نشان داد که اضافه کردن NAA، تیروزین یا سیتوکینین هرکدام به تنهایی یا به صورت ترکیب، کالوس زایی را افزایش می‌دهد. بهترین تولید که روی محیط بدست آمد شامل مواد غیرآلی و ویتامینها ازجمله 100mg/l اینوزیتول و 2gr/l عصارهٔ مخمر بود. توانایی کالوسهای تازه برای باززایی بستگی به سطوح مختلف هورمونی داشت ولی طول مدت روز در تمایز اثری نشان نداد. از کشت بساکهای بالغ، قسمتهای میان گره، هیپوکوتیل، بذور و تخمک بالغ، کالوس و گیاه باززایی شده بدست آمد.

در واقع آزمایشات دقیق تأثیر هورمونها در سطح القاء کالوس اولین بار توسط دانشمندان فوق بررسی شد، آنها مشاهده کردند که وقتی 2-4-D در محیط آغازیدن وجود نداشت جوانه ای هم تشکیل نشد. بنابراین 2-4-D تنها هورمونی است که مسئول همراهی القاء کالوس و اندامزائیهای بعدی باشد. (89 و 84)

[1] - Saunders

[2] - Bingham

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در سال 1987 وان[1] و لینگ[2] تحقیقی در مورد اثرات کاینتین در کالوسهای یونجه انجام دادند:

محیطهای کالزایی B5، B2K، 17951 برای مطالعات اثرات کینتین مورد استفاده قرار گرفت و مورفولوژی، هیستولوژی و باززایی در یونجه ها بررسی شد. حضور کینتین در القاء کالوسهای ضروری تشخیص داده شد. کالوسهایی که توسط کینتین تولید شده بودند در محیط B5 و 17951 دارای سلولهای متراکم بودند که حاوی ناحیهٔ مریستمی بودند و تمایز بالایی در گیاهچه های حاصل از محیط باززایی نشان دادند. اکثر کالوسهای تولید شده دارای سلولهای تخصصی و ساختمان قابل انعطاف بودند. بعد از انتقال کالوسها به محیط هورمون دار کالوسهای حاصل باززایی شدند. در این آزمایش از دمبرگهای دومین یا سومین برگهای رأس ساقه استفاده شد. (99 و 100)

کالوس را می توان برای مدت زمان طولانی یا کوتاه مدت حفظ کرد. این توانایی اکثراً به ژنوتیپ وابسته است. بعضی وقتها کشتهای طولانی مدت را می

---

[1] - Wan

[2] - Linag

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

توان بوسیلهٔ افزودن سطوح بالای سیتوکینین وادار به جنین زایی کرد. این موضوع بوسیلهٔ استوارک[1] و همکاران گزارش شده است. (8)

مطالعه ای در سال 1985 روی جنین زایی و باززایی یونجه توسط مک کنزی[2] و ناگاجان[3] انجام شد. ده کولتیوار و لاینهای حاصل از دو گونهٔ یونجه *M.sative* و *M.media* برای توانایی جنین زایی انتخاب شدند و گیاهچه های حاصل از ریشه و هیپوکوتیل در سه محیط جداگانه کشت شدند. این سه پروتوکول دارای مقادیر متفاوت از نمکها، ویتامینها و هورمونها بودند. پروتوکولی که مقادیر زیادی از 2-4-D و مقدار کمی از سیتوکسین داشت بیشترین کالوس جنین زا را تولید کرد. دولاین اصلاحی M.media که درصد بینابینی از نظر جنین زایی داشت درصد بسیار بالایی از باززایی را داشت. ریشهٔ خزنده M.media بیشترین درصد جنین زایی را تولید کرد.

3- جنین زایی

[1] - Stavarck et al

[2] - Makenze

[3] - Nagajan

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در سال 2002، Pasternak T.P و همکاران اثرات اکسین و pH را در فعالیت تقسیم سلولهای جنین زا در پروتوپلاست حاصل از برگهای یونجه بررسی کردند. اثرات جنین زایی در مقادیر پایین ($1M\mu$) و بالای ($10M\mu$) از 2-4-D تفاوت بود. سلولهای مواجه با میزان بالای 2-4-D دارای سیتوپلاسم متراکم گردید. کوچک باقی ماندند و توانستند به خوشه های سلولهای پیش جنینی تبدیل شوند. در حالی که سلولهای مواجه با 2-4-D پایین طول شدند ولی از بین رفتند یا کلنی تمایز نیافته دادند. در این بررسی ها از محیط m.s استفاده گردید.

در سال 2000، Iantcheva و همکاران میزان تشکیل جنین و باززایی را در محیطهای مایع در گونه های دیپلوئید Medicago شامل برگ و دمبرگ 5 گونهٔ *M.ciliaris* و *M.murex* و *M.ombicularis* و *M.polymorpha* و *M.truncatula* بررسی کردند. جنین ها به راحتی در محیط حاوی 1mg/l یا 4mg/l 2-4-D بدست آمدند. آنها از محیط القاء B5 استفاده کردند و از غلظتهای متفاوت 40 و 11 و 4 و 3 و 2 و 1 و 0.4 میلی گرم در لیتر از 2-4-D تکمیل شده با

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

0.2m/l کاینتین، 1mg/l آدنین و 500mg/l میواینوزیتول استفاده کردند. مشاهده شد که حضور 0.05mg/l و NAA برای بلوغ جنین سوماتیکی لازم است. رشد جنین گلبولی شکل تا رسیدن به مرحلهٔ تورپدو و در محیط B5 با 2-4-D 4mg/l انجام گرفت.

Walker و SATO در سال 1981 مقاله ای تحت عنوان مورفوژنز در کالوسهای Medicago sative و نقش یون آمونیوم در جنین زایی سوماتیکی منتشر کردند. آنها اظهار داشتند که وجود یون آمونیوم چه برای تولید ریشه چه برای جنین زایی سوماتیکی در شرایط In vitro ضروری است. مقدار یون لازم حدود 12.5 $m\mu$ در محیط باززایی بود. بیش از 50 $m\mu$ یون آمونیوم به عنوان بازدارنده عمل کرد.

Arcyoni و همکاران در سال 1982 جنین زایی سوماتیکی را توسط کشت سوپانسیون پروتوپلاست و کشت مزوفیل برگ یونجه های *M. corulea* و *M.glutinosa* بررسی کردند. شرایط رشد گیاه، سن گیاه و ایزولاسیون پروتوپلاست بررسی شد و نتایج بدست آمده حاکی از آن بود که میزان مناسبی

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

از اکسین و سیتوکسین در جنین زایی در گونه های مختلف M.corulea مؤثر است.

Kao و Myctayiuk (1980) کشت سوسپانسیون را در 9 گیاه یونجه انجام دادند و نتایج نشان داد که شرایط غذایی متفاوت برای جنین زایی مورد نیاز است (ازجمله سطوح مناسب هورمونی و نمکهای معدنی) هفت گیاه از نه گیاه قابل تبدیل به گیاه کامل بودند.

- در سال Brown 1985 و همکاران نقش زمینهٔ ژنتیکی را در جنین زایی سوماتیکی یونجه بررسی کردند. از 76 کولیتوار یونجه متعلق به دو گونه sativa و falcate بدون توجه به پروتوکول، ریز نمونه و محیط های کشت، پاسخ متفاوتی بدست آمد.

در سال Meyyer 1987 و همکاران اثرات نیتروژن و ساکارز را در جنین زایی کلونهای حاصل از *M.sativa* بررسی کردند. یک نیاز مبرم به آمونیوم برای جنین زایی و تمایز مشاهده شد. اسید آمینه ها نه تنها برای تمایز ضروری تشخیص داده نشدند بلکه به عنوان مهارکننده هم عمل کردند. به جز 1-2g/l کازئین هیدرولیز شده یا 4.4mM گلوتامین با 30mM پرولین که در شرایط

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

خاص 20-30% در افزایش جنین نقش داشت. ساکاروز زیاد یا کم مانع جنین‌زایی بود. کلونهای انتخاب شده از سه کولتیوار از *M.sativa* یک پاسخ مشابه به باززایی نشان دادند.

4- باززایی

Ray و Bingham در سال 1989 باززائی در یونجه های دیپلوئید را مورد مطالعه قرار دادند. این مطالعات نشان داد باززایی توسط ژنهای محدودی کنترل می شود. Bertnard و همکاران (2001) روش نواری را برای جنین زایی یونجه گزارش کردند و نشان دادند در روشی که برگها همه قطعه قطعه شده و در محلول آنزیمی به همراه مانیتول بجای ساکاروز (به عنوان اسمز نگهدارنده) نتایج کشت پروتوپلاست موفق تر بوده و جنین زایی در B5 موفقیت آمیز بوده است.

تحقیق دیگری توسط علیرضا مطلبی آذر و علی جعفری مفید آبادی (1379) برروی کالزایی، جنین زایی و باززایی در جمعیتهای یونجه ایرانی انجام گرفت. آنها مجموع چهار روش موفق را بررسی کردند روش اول روش مک کوی و

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

واکر بود که در آن از زیر نمونه هیپوکوتیل و محیط کشت پایه SH استفاده کردند. محیط القاء کال شامل 2-4-D+5NAA+2Kin 2 محیط القاء جنین شامل 2-4-D 11 و 1Kin بود. محیط باززایی Boi2y و در محیط بدون هورمون 30 روز تولید باززایی کرد. در روش ونزل و براون از زیر نمونه دمبرگ در محیط کشت MS استفاده شد. محیط القاء کال شامل 2-4-D 5+2Kin محیط القاء جنین شامل 2-4-D 5 و محیط باززایی MS بود. محیط القاء کال 2-4-D 2 و 0.25Kin در محیط القاء جنین شامل 2-4-D 10 و 1Kin محیط باززایی MS بدون هورمون بود. در روش آرسیونی و همکاران از ریزنمونه لپه استفاده شد و محیط کشت پایه MS، محیط القاء کال 2-4-D 2 و 0.25Kin و محیط القاء جنین 0.25Kin و 2-4-D 2 و محیط باززایی MS بدون هورمون بود. هر چهار روش پاسخ مناسبی در بر داشتند.

در سال 1984 آقای میتن (73) و همکارانش بررسی 35 کالیتوار یونجه را آغاز نمودند. در این آزمایشات تقریباً از هر یک از کولتیوار تعداد 20 ژنوتیپ انتخاب گردید و بدور آنها استریل شده و در محیط آگار کشت داده شدند.

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سپس هیپوکوتیل بذور جوانه زده را در محیط کشت SHNAAK کشت نمودند. بافت کالوس در هفته های ششم تا هشتم بوجود می آید. وقتی حداقل 2 گرم کالوس ایجاد شد آزمایش باززائی با روش Qalker و Sato آغاز می شود. کالوس های هر ژنوتیپ با هم مخلوط نموده و 10 نمونه 150 میلی گرمی از هر کدام در محیط کشت SH حاوی 50 میکرومول 2-4-D و 5 میکرومول کینینن است، کشت می گردد. بعد از 3 روز بافت را به محیط بلایدس[1] جاوی 100 میلی گرم در لیتر اینوسیتول و 2 گرم در لیتر عصاره مخمر منتقل می شود و در شرایط 37^0C و فتوپریود 16 ساعت با شدت نور $6Jm^{-2}s^{-1}$ نگهداری می‌شود. بعد از 21 روز تعداد جنینهای تکامل یافته شمارش می شوند. و اگر جنین تشکیل نشده بود ابعاد اندامهای سبز نیمه ارگانیک یادداشت می شود.

در سال 1985 آقای می جر[2] و همکارانش (69) برای بررسی گیاهان یونجه دیپلوئید از 19 کالتیوار استفاده نمودند. تعداد ژنوتیپ های مورد استفاده در هر کالتیوار متفاوت و بین 5 تا 58 ژنوتیپ بود. برای ضدعفونی سطحی بذور یونجه از اتانول 70 درصد استفاده شد که به مدت 1 دقیق درون محلول قرار

---

[1] - Blaydes

[2] - Meijer

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

می گیرد. و بعد به مدت 10 دقیق در محلول 100 میلی‌لیتری Hgcl2 0/2 درصد که قطره ای از Tween80 دارد ضدعفونی می گردد. سپس 5 بار با آب مقطر شستشو می گردند. بذور ضدعفونی شده را در محیط کشت MS بدون مواد تنظیم کننده رشد و حاوی 2 درصد ساکارز و آگار 0/8 درصد کشت می دهند. تمام محیطهای کشت را در حرارت 121^0C به مدت 20 دقیق انکوباسیون می نمایند. PH محیط کشت قبل از اتوکلاو شدن 5/8 می باشد. بذور در تاریکی و در حرارت 25^0C جوانه زده وقتی هیپوکوتیل ها به طول تقریبی 5 سانتیمتر بعد از مدت 2-3 هفته رسید آنها را به شرایط فتوپریود 16 ساعته به مدت 2-3 روز منتقل می نمایند. هیپوکوتیل ها را به ابعاد 5 تا 8 میلی متری بریده کوتیلدونها را برداشته و ساقه ها در همان محیط در ظروف 10 سانتیمتری پلی کربناته کشت می دهند. به ازای هر گیاهک، 3 اکسیدانت روی یکی از دو محیط کشت القاء کالوس درون پتریدیش های 2×60 میلی متری پلاستیکی قرار گرفتند. پتری دیش ها توسط پارافیلم مسدود شده و کلیه کشت ها در شرایط 25^0C و در تناوب نوری 16 ساعته با شدت نور فلورسنت m

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

$25\ mol\ m^{-2}s^{-1}$ نگهداری شدند پروتکل های محیطهای کشت قراردادی برای جنین زائی سوماتیکی عبارتند از:

پروتکل I- برای القاء کالوس، 30 روز در محیط کشت UM حاوی 0/25 میلی گرم در لیتر کینتین و 2 میلی گرم در لیتر 2-4-D قرار می گرفتند و سپس برای تشکیل جنین به مدت 30 روز در محیط کشت MS حاوی 0/05 کیلی گرم در لیتر BA و 0/05 میلی گرم در لیتر NAA قرار می گرفتند.

پروتکل II- برای تشکیل کالوس، 30 روز در محیط کشت B5h حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر کینتین و 1 میلی گرم در لیتر 2-4-D و برای القاء جنین، 21 روز در محیط کشت SH حاوی 1 میلی گرم در ایتر کینتین و 11 میلی گرم در لیتر

2-4-D و در نهایت برای نمو و تکامل جنین ها در محیط کشت Boi2y قرار می گرفتند.

پروتکل مجدداً با اکسپلانت های پتیول از کشت ساقه کلیه ژنوتیپ های قابل باززائی و تعداید از ژنوتیپ های غیرقابل باززائی، تکرار شدند. در آزمایشاتی که از پتیول استفاده شده بود 3 تکرار و هر تکرار حاوی 5 پتیول 5 تا 8 میلی

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

متری در هر پتریدیش استفاده گردید. جنین های سوماتیکی در محیط کشت SH را به آن 0/02 میلی گرم در لیتر 2ip و IAA اضافه گردیده بود و یا در محیط کشت MS پایه که به آن 2 درصد ساکارز اضافه شده بود کشت گردید.

آقای براون در سال 1985 به منظور مطالعه اثر متقابل محیط کشت × کالتیوار 4 پروتکل مختلف بکار بردند. برای مطالعه اثر متقابل کالتیوار × اکسپلانت از دو اکسپلانت هیپوکوتیل و کوتیلدون استفاده نمود. در این آزمایش برای استریل نمودن اکسپلانت ها از اتانول 70 درصد به مدت 20 ثانیه و از محلول هیپرکلریت کلسیم 7 درصد که به ازای 200CC حاوی یک قطره Tween-80 است، به مدت 20 دقیقه استفاده گردید و سپس با آب مقطر 3 بار شستشو داده شد و برای ایجاد گیاه از جنین سوماتیکی بزرگ و سبز شده استفاده شد که با انتقال به محیط کشت She حاوی 10 گرم در لیتر ساکارز، 0/02 میلی گرم در لیتر ایزوپنتیل آدنین این امر امکان پذیر گردید. جنین های فوق را در ظروف پلی کربناته 4 اینچی حاوی 50 میلی لیتر محیط کشت و به تعداد 5 جنین در هر ظرف قرار می دهیم.(26)

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

3-3- اثرات زمینه ژرم پلاسم در باززائی:

براون (1984) معتقد است که در یونجه بیشترین اختلاف ژنتیکی مشاهده شده در کالتیوارهای موجود می‌تواند از9 منبع ژرم‌پلاسم که بین سالهای 1850 تا 1947 در آمریکای شمالی بوجود آمده ناشی شده باشد. تقسیمات منابع ژرم‌پلاسم بر اساس تعدادی از صفات صورت می گیرد اما بیشتر بر اساس تقسیمات جغرافیائی انجام می‌پذیرد. تمام 9 منبع ژرم پلاسم قسمتی از ترکیب M.sativa×M.falcate هستند. که به آسانی با هم تلاقی می یابند و نسبت به میزان نسبی ژرم پلاسم M.falcate و M.sativa تغییر می‌یابند. بعلاوه 9 منبع ژرم پلاسم مطابق با فشار سلکسیون طبیعی که در طی قرون متمادی اعمال شده است، تغییر می یابند.

اگر کالتیوارهای مورد بررسی در آزمایشات مختلف بر اساس میانگین واکنش جنین زائی مرتب شوند و بوسیله منابع ژرم پلاسم تفکیک شوند، الگوی مشخصی نمایان می شود. در اتین آزمایشات معلوم شده است که محدوده گسترده ای از کالتیوارهای دارای حداقل چند ژنوتیپ که قدرت باززائی دارند، می باشند، و بعضی از ژنوتیپ ها که تولید جنین نمی کنند، تولید اندامهای سبز و

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ساختمان نیمه ارگانیک می نمایند. تجربه نشان داده است که وجود اندامهای فوق نشانگر پتانسیل پائین باززائی ژنوتیپ ها می باشد. کالتیوارهائی که واکنش باززائی متوسطی دارند هم تولید جنین می کنند و هم تولید اندامهای سبز و نیمه‌ارگانیک. (26 و 31)

در بررسی می جر و همکارانش در سال 1985 که 19 کالتیوار یونجه را بررسی نمودند جنین نتیجه گیری گردید که درصد ژنوتیپ هائی که تولید کالوس می کنند از 53 درصد در لاین S2128 زیرگونه Caerula تا 100 درصد در لاین MH2 زیرگونه xvaria متغیر بود. در این بررسی از دو محیط کشت UM و B5h استفاده گردید که محصول کالوس در B5h بیش از UM بود. بطور کلی ارقامی که پتانسیل باززائی بالائی هستند در هر دو محیط عملکرد بالائی هستند و بالعکس ارقامی که دارای عملکرد پائین هستند در هر دو محیط واکنش ضعیفی نشان می دهند. میزان کالوس حاصل از پتیول با هیپوکوتیل مشابه هم بود. در این آزمایش اکثریت لاین ها یا قابلیت باززائی کمی داشتند و یا واکنشی نشان نمی دادند. بهترین واریته از نظر تولید جنین سوماتیکی کالتیوار F2 از زیرگونه Falcata بود. در این کالتیوار جنین های

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سوماتیکی بعد از 15 تا 25 روز در محیط کشت UM قابل تشخیص بودند. در بعضی از موارد چنین بنظر می رسید که جنین ها بجای ایجاد شدن از کالوس مستقیماً از قطعات اکسپلانت بوجود می آید. در این کالتیوار کالوس های اولیه 60 تا 70 درصد از ژنوتیپ ها پس از 30 روز تولید جنین های زیادی می کردند که تعداد آنها در محیط کشت UM بیش از B5h بود ژنوتیپ های F2 که در کشت های کالوس اولیه تولید جنین نکرده بودند، پس از انتقال به محیط کشت القا و جنین نیز تولید جنین ننمودند. در این کالتیوار بین ژنوتیپ های مورد بررسی تفاوت معنی داری از نظر وامنش جنین زائی رخ داد. بطوری که بعضی ژنوتیپ ها کالوس ترد، بیضی بدون جنین یا جنین های کم و بقیه کالوس نرم و آبدار نمودند. در این بررسی برخی ژنوتیپ های کالتیوار MH4 زیرگونه Xvaria، کالوس های اولیه، تولید جنین های بیشتری نمودند.

در تحقیقات Eltjo.G.M.Meijer که بررسی یونجه های دیپلوئید بود اگرچه لاین های 4 زیرگونه مورد تحقیق، پتانسیل باززائی کمی نشان می دادند، ولی نتایج حاصل در مقایسه با گزارش Brown (1985) و Mitten (1984) در زمینه اثر منبع ژرم پلاسم روی تولید جنین های سوماتیکی یونجه تفاوت قابل

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ملاحظه ای وجود ندارد. در تحقیقات Eltjo تعداد زیادی از رقم و لاین های تتراپلوئید مورد بررسی. یا قابلیت باززائی نداشتند و یا تولید جنین های سوماتیکی کمی می نمودند. میزان کم باززائی امکان تحقیق وجود رابطه بین قابلیت باززائی و منابع ژرم پلاسم را امکان پذیر نمی نمود. درچند در این مطالعه بیشترین باززائی در هیبرید falcata×cacrula و کالتیوار Falcata مشاهده شد، در صورتی که در مطالعات Mitten (1984) رقم بومی Ladak و در تحقیقات Brown Ladak (1985) و زیرگونه falcate را بعنوان منابع برتر شناسائی نمودند. در این مطالعه یک استثناء وجود داشت، Regen-B که خود از یک رقم تتراپلوئید Regen-S که دارای پتانسیل باززائی بالائی است بوجود آمده است. با این وجود Regen-S حامل ژنهای زیان آوری است که در حالت دیپلوئید فراوانی این ژنها افزایش می یابد. بنابراین افزایش ژنهای نامطلوب می توانست علت واکنش ضعیف و دور از انتظار Regen-B باشد (33).

آقای براون در سال 1988 به این نتیجه رسید که طور قابل توجهی 80 درصد کالتیوارهائی که دارای باززائی هستند از نظر فنوتیپی بعنوان تیپ های ریشه

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

خزنده طبقه بندی می شوند. آقای موری[۱] در سال 1957 رفتار ریشه های خزنده و مسیر تکاملی ساقه های نابجا را که از قطعات ریشه بوجود می آیند شرح داده است. این کالتیوارها بوسیله جداسازی جانبی، انشعاب مکرر ریشه ها و نمو ساقه های نابجا در فواصل ریشه ها مشخص می شوند. واضح است که منشاء ساقه های نابجا، فلوژن نزدیک ریشه های جانبی است. راجع به تظاهر ژنتیکی رفتار ریشه های خزنده اطلاعات کمی موجود است. بهرحال آقای بورتون[۲] (1937) معتقد است که این صفت ممکن است توسط تعداد زیاد ژن کنترل شوند و آقای رام باق[۳] معتقد است، منشاء این ژنها از منابع ژرم پلاسمی M.falcate و یا Ladak می باشد. بینگهام (1975) نیز ارتباط بین صفت ریشه های نابجا و باززائی را گزارش کرده است. اما نظریه بینگهام، نظریه براون را تأئید نمی کند. این همبستگی نشان می دهد که ممکن است ارتباطی بین ظرفیت تشکیل جنین های سوماتیکی و تکامل ساقه های نابجا در فواصل ریشه وجود داشته باشد. بهرحال تحقیقات آقای رام باق (1982) نشان می دهد که

---

۱ - Marry

۲ - Burton

۳ - Ramagugh

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

هرچند صفت خزندگی ریشه از ژرم پلاسم M.falcate به ارث می رسد، اما بنظر می رسد که ارتباط مستقیمی با تشکیل جنین های سوماتیکی نداشته باشد. اگر بین این دو صفت رابطه وجود داشت، بایستی انتظار داشت که هر دو صفت همراه با سلکسیون، بر له و علیه آنها، کاهش و افزایش نشان دهد. واکنش جنین زائی سوماتیکی در محدوده سلکسیون ریشه ها خزنده اختلاف معنی داری با شاهد ندارند. (24)

در تحقیقات براون (1988) مشخص گردید مفهوم ارتباط تشکیل جنین با زمینه ژنتیکی این است که تکثیر کالوس خوب ممکن است لازمه تولید خوب باشد. بهرحال ارتباط مشاهده شده بین باززائی و ژرم پلاسم بنظر می رسد که برای باززائی و کالوس وجود نداشته باشد. این مسئله در بررسی های می جر و همکارانش 01985) به این صورت تعریف می شود که کالتیوارهائی که دارای بهترین باززائی بودند در زمینه ژرم پلاسمشان با هم تفاوت داشتند و در بررسی ژرم پلاسم وحشی یونجه توسط داجاک[1] و همکارانش (1987) که روی مواد

[1] - Dajak

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

حاصل از پروتوپلاست صورت گرفت اثر ژنوتیپ های با باززائی بالا بوسیله فقدان تولید کالوس مشخص می شوند (24 و 26)

در باززائی *Medicago sativa* ژنوتیپ ویژه[1] و فقط تعداد کمی ژنوتیپ در بعضی کالتیوارها برای توانائی شان جهت باززائی گیاه از ریز نمونه جداسازی شده است. (16)

پتانسیل باززائی به نتایج یک گیاه ساراناک منتقل گردید که نشان می دهد باززائی قابل توارث می باشد. از گزینش دوره ای برای تجمع آللهای کنترل کننده صفات ژنتیکی مطلوب برای تولید رقم "Regen S" که فراوانی باززائی بالائی دارد مورد استفاده قرار گرفته است. در جریان توسعه و ایجاد یونجه "Regen S" از میان 12 درصد از ژنوتیپ هایی که از کشت هیپوکوتیل باززائی کرده بودند، در اولین نسل گزینش یک کلنی «دوپریت Duprait» و چهار کلنی «ساراناک» انتخاب گردید. پنج گیاه از طریق آمیزش بین گونه ای با یکدیگر تلاقی داده شدند و نتایج حاصل به منظور بررسی باززائی مورد آزمون قرار گرفتند. اولین نسل گزینش در افزایش فراوانی ژنوتیپ های تولید شده در

[1] - Genotype-specific

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

نسل دوم تا سطح 50 درصد مؤثر بوده اند. در نسل دوم 25 گیاه با باززائی شده گزینش گردیده و آمیزش یافتند تا جمعیت سومین نسل و نسلهای بعدی گزینش را بوجود آورند. در این تسل 67٪ ژنوتیپ ها با باززائی کردند و 75 گیاه با بازائی شده آمیزش یافتند تا "Regen S" را بوجود آوردند. در حین سه نسل گزینش دوره ای فراوانی باززائی از 12 درصد تا 67٪ افزایش یافت که این مورد وراثت پذیری بالای صفت را نشان می دهد. یکی دیگر از استرین های قادر به باززائی یونجه بنام "Regen Y" می باشد که دارای توارث «صفت باززائی بالا» می باشد. وراثت پذیری بالای باززائی همچنین جهت اصلاح کلون یونجه HG2 برای استفاده در کشت سوپانسیون و گزینش سلول سوماتیکی بکار برده شده است (23 و 24)

ریش و بینگهام[1] (1980) نتیجه گرفتند که مدل دو ژن غالب، تمایز جوانه را کنترل می کند [89]. در سطح تتراپلوئید، وان و همکاران[2] (1998) نتیجه گرفتند که جنین زائی سوماتیکی تحت کنترل دو ژن غالب با اثرات تکمیلی

[1] - Risch and Gingham 1980

[2] _ Wan et al. 1982

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

است. میجر براون (1987) اظهار داشتند که دو مسیر متمایز توسعه ای 0نموی) برای جنین زائی سوماتیکی در یونجه وجود دارد. نتایج آنها از مطالعات مقایسه ای ژنوتیپ های گزینش شده از کالتیوار رنجلندر، رابلر، ورنال تا Regen-S، یک جمعیت یونجه با جنین زائی بالا که بوسیلهٔ دگر کشنی ژنوتیپ های جنین زا که از کالتیوار Dupuits و Saranac (بینگهام و همکاران 1975) (20) توسعه یافته، بدست آمده است. (71).

برخی از نتایج عمومی که در باززائی از کالوس و مطالعات مستقل صورت گرفته در برگیرنده محدودهٔ کاملی از ژرم پلاسم یونجه است. این موارد عبارتند از:

1- باززائی یک خصوصیت ژنتیکی است و وراثت پذیری بالائی دارد.

2- اکثر کالتیوارها، لاینها و منابع ژرم پلاسم حاوی ژنوتیپ هایی با توانائی باززائی هستند.

3- فراوانی ژنوتیپ های دارای خاصیت باززائی در اکثر ارقام حدود 10٪ است.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

4- ارقامی نظیر لاداک و رنجلندر وجود دارند که توانائی باززائی استثنائی دارند.

5- ارقامی با توانائی باززائی می توانند توسط روشهای اصلاحی مرسوم ایجاد گردند.

6- ارقامی که از ریشه آنها جوانه های فرعی یا نابجا بوجود می آید (یونجه هایی با ریشه های خزنده) باززائی بالائی دارند.

7- برخی ژنوتیپ های M.falcate و M.corula قادر به باززائی هستند.

8- رانده مان باززائی (تعداد جنین به ازاء هر پلات آزمایشی) را می توان توسط بهبود محیط کشت افزایش داد.

9- باززائی در یونجه اصولاً از طریق جنین زائی سوماتیکی صورت می گیرد.

10- اساساً هر بافت ریز نمونه بدست آمده از ژنوتیپ باززائی کننده که کالوس تشکیل دهد می تواند به گیاه باززائی شود (24).

www.kandoocn.com

انواع کشت بافت گیاهی:

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

کشت بافت را می توان بر اساس نوع بافت کشت شده به انواع زیر تقسیم نمود:

1- کشت جهت تولید کالوس:

اگر یک بافت تمایز یافته از گیاه جدا شده و تحت شرایط آزمایشگاهی کشت گردد و تولید توده تمایز نیافته ای به نام کالوس نماید آنرا کشت کالوس گویند. (1)

2- کشت جنین:

در این نوع کشت پس از حذف پوستهٔ بذر، جنین از بذر رسیده یا بذر نارس جدا شده و به عنوان جنین رسیده یا جنین نارس کشت می گردد. (1)

3- کشت اندام گیاهی:

شامل کشت برگ، دانه کامل، دانه نصفه، مریستم، نوک ساقه، ریشه، پرچم، تخمدان و سایر اندامها می باشد. (1)

4- کشت سلولی یا کشت معلق:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سلولهای منفرد که با استفاده از آنزیمها یا با روشهای مکانیکی از یک بافت گیاهی یا کالوس بدست می آیند و در محیط مایع در حین تکان دادن کشت می گردد. (1)

5- کشت پروتوپلاست:

به کشت پروتوپلاستهایی که در اثر هضم آنزیمی دیواره سلولی آن بوجود آمده اند اطلاق می شود. (1)

کشت سوسپانسیون:

از نظر تعریف به مجموعه ای از سلولها که در یک محیط کشت مایع شناور بوده و رشد و تکثیر پیدا می کنند سوسپانسیون سلولی گفته می شود. سوسپانسیون سلولی معمولاً با انتقال قطعاتی از کالوس به یک محیط کشت مایع بوجود می آید. البته این محیطهای کشت باید مرتباً توسط یک تکان دهنده تکان داده شوند که این کار باعث هوادهی به سلولها شده و از تجمع مواد رسوبی جلوگیری می کنند (81) اولین بار در سال 1956 ای. ام. شانتر، کشت تعلیقی نمونه ای از ریشه هویج را گزارش نمود. وی توانست از این نوع کشت

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

بافت، گیاهچه ای جدید ایجاد کند. ظروف حاوی این نوع کشت سلولی را معمولاً در دستگاههای چرخنده و یا تکان دهنده قرار می دهند، تا از چسبیدن سلولها به همدیگر جلوگیری شود. مواد متشکله مادۀ غذایی محلول کاملاً شبیه موادی هستند که در مادۀ غذایی نسبتاً جامد برای رشد کالوسها بکار برده می‌شود با این تفاوت که شامل آگار نمی باشد. [81 و 48]

اگر تکه های کالوس به محیط غذایی مایع منتقل شوند و محیط کشت شیکر مرتباً تکان داده شود، ممکن است سلولهای منفرد یا توده های متشکل از چند سلول در محیط جدا شوند. این سلولها در اثر تقسیم مجموعه سوسپانسیون سلولی را تشکیل می دهد. همچنین، ممکن است از یک سلول منفرد و یا توده کوچکی از سلولها که بصورت مکانیکی جدا شده اند، گیاهچه تولید نمود. بازیابی گیاه از کشتهای سوسپانسیون سلولی[1] مشکل تر از بازیابی گیاه از بافت کالوس می باشد. کشت معلق معمولاً از کالوس تهیه می شود زیرا سلولهای آن به آسانی از هم جدا شده و به راحتی بازیابی صورت می گیرد. [48 و 49]

مراحل رشد کشت سلولی:

[1] - Supension

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

پس از اینکه نمونه گیاهی مثلاً کالوس در محیط کشت مایع قرار گرفت، در ابتدا برای مدتی هیچگونه رشد و افزایش قابل توجهی در تعداد سلولها مشاهده نمی‌گردد. به این مرحله، مرحلهٔ رکود اولیه[۱] گفته می شود. سپس تعداد سلولها به صورت تصاعدی افزایش یافته[۲] و سپس افزایش سلولی به صورت خطی[۳] ادامه می یابد پس از آن سرعت تقسیم سلولی بتدریج کاهش یافته و وارد مرحله ثابت[۴] می شود. (97 و 99)

زمان واکشت هنگامی است که تعداد سلولها در حد ماکزیمم در واحد حجم باشد.

ضمناً اگر تعداد سلولها در محیط کشت خیلی کم باشد تکثیر بلندی صورت می گیرد یا متوقف می شود (97)

برای واکشت تا مقداری از سلولهای سوسپانسیون را به محیط کشت تازه اضافه می کنیم یا اینکه مقداری از محیط کشت تازه تهیه شده و استریل را به محیط کشت قبلی مجموعه همراه با مجموعه سوسپانسیون اضافه می کنند[98]

---

۱ - Lag phase

۲ - Exponetial Phase

۳ - Linear Phase

٤ - Stationary phase

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مبحث کشت سوسپانسیون در یونجه برای تولید بذر مصنوعی مورد توجه قرار گرفت.[71]

بذر مصنوعی یونجه و کاربرد آن:

بذر مصنوعی پدیده نوینی است که مشابه بذور بوتانیکی می باشد و شامل یک جنین سوماتیکی است که با یک پوشش حفاظتی احاطه شده است. پوشش بذر مصنوعی بایستی خطری برای جنین نداشته باشد و جنین را در مراحل کشت، حمل و نقل و نگهداری، حفاظت نماید و همچنین اجازه رشد به جنین بدهد بدون اینکه تغییراتی را پدید آورد. بذور مصنوعی ممکن است حاوی مواد غذایی به شکل اندوسپرم مصنوعی و نیز مواد لازم برای رشد و نمو باشد. پوسته دومی نیز ممکن است برای ممانعت از خشک شدن کپسول بکار رود. (19 و 20 و 21)

بسیاری از گیاهان که از طریق کشت بافت و سلول تکثیر می شوند، اغلب نمی توانند بوسیله بذر تکثیر یابند. بعلت کاهش ثبات ژنتیکی صفات مطلوب در این گیاهان نمی توان از بذور آنها استفاده نمود. برای غلبه بر این مشکل، تکثیر از

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

طریق کشت بافت می تواند مفید واقع شود. اما در اغلب گیاهان زراعی استفاده از این تکنیک پرهزینه است.

در ضمن استفاده گلخانه ای، تکثیر قلمه و ساقه نیز پرهزینه بوده و بوسیله گیاه مادری محدود می شود یا بعبارتی تعداد محدودی از هر گیاه بدین روش می توان تهیه نمود در صورتی که این محدودیت بوسیله استفاده از سیستم بذر مصنوعی از بین می رود. (19 و 20 و 21 و 71)

کاربرد بیوتکنولوژی:

بیوتکنولوژی کاربردهای بالقوه زیادی برای بهبود و اصلاح یونجه ارائه می‌دهد. ژنهای زیادی در یونجه که برای مهندسی ژنتیک پیشنهاد شده و روی آن کار صورت گرفته زیاد می باشد. ژن مقاومت به علف کش، ژن هضم کننده آنزیمهای هضم پروتئین ژن مقاومت به آلومینیم و ... که توسط مهندسی ژنتیک مورد مطالعه قرار گرفته است. (1، 7 و 9)

کاربرد دیگر بیوتکنولوژی، انتخاب سلولی است، وقتی یک صفت در سطح یک سلول بروز می کند. در یونجه لاین های سلولی مقاوم به ایتونین و سموم فوزاریوم شناسائی و از آنها استفاده شده است. همچنین شناسائی و کاربرد لاین

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

های سلولی مقاوم به شوری خشکی که بطور عمده ای در یونجه مورد بحث قرار می گیرد. (19 و 23 و 37 و 38)

جدایی جنین و تکنیک های کشت پروتوپلاسم برای هیبریداسیون سوماتیکی یونجه بکار می رود. با این روش می توان بین گونه های یکساله Medicago و سایر حبوبات مثل اسپرس هیبریدهائی تهیه نمود که در حالت معمولی امکان آن نمی رود. (19 و 23 و 47)

پتانسیل بذور مصنوعی:

جنین های سوماتیکی یا بذور مصنوعی متدی را برای ایجاد گیاه فراهم می کنند که از طریق کشت بافت میسر می شود. (71)

کاربرد بذر مصنوعی:

دلیل عمده بهبود بذور مصنوعی رسیدن به ایجاد ثبات و عمل کرد مطلوب است. تکنیکهائی مثل تکثیر رویشی و تولید بذور هیبرید و قلمه که بطور قابل

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ملاحظه ای یکنواختی را افزایش می دهند، در بسیاری از واریته ها مطلوب نبوده و یا پرهزینه است. تکنولوژی بذور مصنوعی می تواند منابع موجود در سیستم های تکثیر گیاهی مثل ریزازدیادی و قلمه را فراهم نماید. سودمندی عمده بذور مصنوعی تولید در مقیاس بالا و با هزینه کم می باشد. اگرچه سیستم بذور مصنوعی می تواند بسیاری از نواقص متدهای دیگر جبران کند، اما پذیرش این تکنولوژی به اهمیت گیاه و هزینه تولید، بستگی دارد (73)

از نظر تئوری، توانائی کاربرد یک پروپاگول (propagule) کوچک چند میلیمتری به جای یک گیاه یا نهال بزرگ چند سانتیمتری، انعطاف پذیری زیادی را برای تکثیر در مقیاس بالا فراهم می کند. هرگاه یک پروپاگول به اندازه یک بذر قابل تولید باشد، انتخاب گونه ها برای ازدیاد کلنی های گیاهی وسعت یافته و محصولات برای عملکرد و شرایط محیطی می توانند بهبود یابند. اندازه پروپاگول ها برای نگهداری کشت، حمل و نقل و ... بخوبی وقتی تعداد زیادی از آنها مورد نیاز باشد، مهم است در صورتی که مواد گیاهی بزرگتر برای طی مراحل فوق سخت تر و پرهزینه تر خواهد بود. با کشت مستقیم

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

پروپاگول ها در خاک مراحل قبل از کشت که معمولاً جهت سازگاری بکار می رود، خودبخود حذف خواهد شد.

بذور مصنوعی برای تکثیر هیبریدهائی که با دست گرده افشانی شده اند، ژرم‌پلاسم گیاهی و گیاهانی که دست ورزی ژنتیکی شده اند، بخصوص برای تکثیر ژنوتیپ های تاپایدار و عقیم بکار می رود، استفاده از بذور مصنوعی، نیازمندی به تشکیل ثبات میتوزی در تغییرات ژنتیکی را حذف می کند و ممکن است برای حفاظت نیز سودمند باشد. بذور مصنوعی وقتی که باروری بذر کاهش می یابد، مثل هیبریداسیون بین گونه ای و بین جنسی، در ترکیب مواد ژنتیکی مختلف مناسب خواهد شد. در این تلاقی ها که یا بصورت جنسی و یا غیرجنسی صورت می گیرد، مثل استخراج سیتوپلاسمی، تولید سیبرید، انتقال ژن منفرد، تکنیک بذر مصنوعی مفید خواهد بود. (20 و 21 و 23 و 45)

آقای Redenbaugh و همکارانش (1984 و 1986) کشف کردند که هیدروژل‌هائی مثل آلژینات سدیم می تواند برای تولید بذور مصنوعی بکار روند. فراوانی تولید گیاه از بذور مصنوعی یونجه 86 درصد در شرایط invitro و 20 درصد در شرایط گلخانه ای بود. آقای Vamdkawd در سال

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

1984 در یک کنفرانس در ژاپن می گوید: اگر یک جنین کاذب از هر سلول کشف شده بوجود آید، می توان بوسیله بعضی از تیمارها، آنها را نگهداری نمود و بفروش رساند و کشاورز نیز به آسانی می تواند از آنها استفاده کند و این بذور می توانند جانشین بذور حقیقی شوند و با این تغییر سیستم های اصلاح نباتات نیز تغییر می یابد. او مشاهده نمود که محدودیت های زیادی در این متد وجود دارد. آقای Walgate می گوید ما می توانیم همیشه جنین های سوماتیکی یونجه را در یک نوع لعاب بپوشانیم و به رویش 100 درصد برسانیم ولی جزئیات کار خویش را ارائه ننمودند. Syluie binachi نیز مشخص می کند که جنین های سوماتیکی یونجه انتخابی می توانند با آلژینات سدیم کپسوله گردند. البته جنین های سوماتیکی سایر محصولات نیز دارای پتانسیل کپسوله شدن هستند، اما نتایج حاصله از این محصولات بخوبی کپسولهای یونجه نیست. Lutz و همکارانش روی جنین های هویج کار کردند. آنها جنین های سوماتیکی هویج را با لایه ژلاتین کپسوله کردند. و این جنین های مصنوعی، جوانه زده و از کپسول خود خارج شدند. نتیجه تحقیقات آنها این بود که عامل

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

محدود کننده تولید گیاه در این سیستم، کیفیت پائین جنین های سوماتیکی است.

امکانات مورد نیاز برای کشت بافت و سلول گیاهی:

اندازه و وضعیت کشت بافت و وسعتی که آماده شده، بوسیله طبیعت ناشناخته و فراهم بودن سرمایه تعیین می شود. بهرحال یک آزمایشگاه کشت بافت وسایل و آمادگی های زیر را فراهم خواهد کرد (الف) شستشو و نگهداری وسایل شیشه ای وسایل پلاستیکی و دیگر لوازم آزمایشگاهی (ب) تدارک، استریل کردن و نگهداری محیطهای کشت (ج) استریل ساختن مواد گیاهی (ح) حفظ و نگهداری کشت ها در شرایط کنترل شده از نظر دما، نور و در صورت امکان رطوبت (هـ) مشاهده کشت ها حداقل دو آزمایشگاه و یا دو اطاق مجزا بایستی بدین منظور فراهم کرد. یکی برای شستشو و نگهداری وسایل آزمایشگاهی و تدارک محیطهای کشت که به آن اطاق محیط کشت (Media room) می گویند و دیگری اطاق یا آزمایشگاهی است که بمنظور نگهداری کشت ها فراهم می شود که به آن اطاق کشت (Culture room) گویند. اطاق کشت

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

بایستی دارای یک میز مشاهده کشت مجهز به بیونوکولر بوده و به قدر کافی دارای نور بسته به شرایط محیطی آزمایشگاه، کابینت انتقال استریل بایستی در اطاق کشت، در گوشه آزمایشگاه معمولی و یا بصورت اطاق انتقال ویژه، تعبیه شود.

وسایل معمول مورد نیاز برای تهیه محیط کشت شامل موارد زیر می باشد:

الف- جای ظروف با ارتفاع مناسب برای کارهای ایستاده.

ب- فریزر با برودت بسیار بالا برای نگهداری محلول ذخیره، محلول ها یانزیم، شیر و نارگیل و ...

ج- یخچال برای نگهداری مواد مختلف شیمیایی، مواد گیاهی، نگهداری کوتاه مدت محلول های ذخیره و ...

د- تنگ پلاستیکی برای ذخیره آب مقطر.

هـ- ترازو.

و- هات پلیت (hot plate) با همزن مغناطیسی برای حل مواد شیمیائی.

ز- PH متر.

ح- یک هواکش یا پمپ خلاء برای تسهیل در امر استریلاسیون.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ط- دیگ بخار برای گداختن آگار.

ی- اتوکلاو یا خوراک پز فشاری خانگی برای استریلاسیون محیطهای کشت.

یخچال . فریزر وسایل فوق را می توان در سالن یا اطاقی خارج از اطاق محیط کشت قرار داد. ترازو نبایستی در اطاق محیط کشت نگهداری شود.

اطاق کشت:

این اطاق برای نگهداری کشت ها در شرایط درجه حرارت کنترل شده بکار می رود. برای حفظ درجه حرارت حدود $۲۵\pm۲^{\circ}C$ از بخاری و پنکه استفاده می شود. برای تیمارهای حرارتی بالاتر و پایین تر از این مقدار از لامپ فلورسنت در انکوباتورها استفاده می شود. انکوباتور می تواند حتی خارج از اطاق کشت داخل سالن یا در هر جای آزمایشگاذه نصب گردد. بهرحال وقتی در خارج از اطاق کشت نصب گردد، بایستی پیش بینی های لازم برای اجتناب از خطراتی که ممکن است توسط مردم بوجود آید، نمود.

کشت ها معمولاً در نور پخش شده (کمتر از 1 کیلولوکس) رشد می کنند. همچنین برای نگهداری کشت ها در نور بالا (5 تا 1010 کیلو لوکس) و تاریکی مطلق بایستی بعضی شرایط را فراهم نمود. کنترل روزانه روشنائی لامپ

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

های فلورسنت می تواند بطور اتوماتیک انجام پذیرد. کابینت های بسته برای ایجاد شرایط تاریکی مناسب است.

اگر رطوبت نسبی در اطاق کشت از 50٪ کاهش یابد، شرایط افزایش رطوبت برای جلوگیری از خشک شدن سریع محیطهای کشت بایستی فراهم شود. با هر افزایش رطوبتی، سرپوش های کتانی (cotton plugs) نمودار شده و افزایش آلودگی کشت ها، اتفاق می‌افتد.

اگر کشت تعلیقی در آزمایشگاه صورت پذیرد، یک دستگاه همزن از نوع افقی یا از نوع لرزان بایستی داشته باشد. همزن هائی با نور و درجه حرارت کنترل شده مورد نیاز خواهد بود.

مواد و روشها:

انتخاب ارقام یونجه:

جهت مقایسه کالوس زایی، جنین زایی و باززایی گیاه و همچنین کشت سوسپانسیون از ارقام قره یونجه، رنجر و سینتتیک دانشگاه تبریز استفاده شد.

برای استفاده از هود یا کابینت، ابتدا سطح میز را با الکل 70 الی 95 درصد پاک می شود و سپس تمام وسایل مورد نیاز (شامل محیطهای کشت، چراغ الکلی، وسایل و ظروف، قوطی کبریت، اتومایز، آب مقطر، فلاسکهای خالی استریل آب بعد از شستشوی مواد و هر وسیله مورد نیاز دیگر) به داخل آن منتقل می شود. بعد از اسپری کردن اطاق، هود یا کابینت با الکل 70 الی 90 درصد به کمک اتومایز، دیواره، درب هود را کاملاً بسته و چراغ U.V را روشن می کنیم. بعد از این مدت لامپ U.V خاموش شده و لامپ فلورسنت معمولی روشن می شود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

اشعه ماوراء بنفش موجب افزایش غلظت ازن که یک گاز سمی است در داخل اطاقک می شود. بنابراین از نظر حفظ سلامت لازم است حدود 15 تا 20 دقیقه بعد از خاموش کردن لامپ U.V به اطاقک برای ادامه عملیات مراجعه نمود که در این مدت شخص می تواند دستهای خویش را بشوید. بعد از داخل شدن به داخل اطاقک در را به آرامی می بندند. کفشها خارج از اطاقک بهتر است درآورده شود و داخل اطاقک مانتوی آزمایشگاه پوشیده و دستها را با الکل 95-70 درصد می شویند. لباس را بهتر است در قسمت در معرض قرار دادن اشعه ماوراء بنفش پوشید. بعد از چمد دقیقه چراغ الکلی روشن می شود. حالا شرایط برای انجام عملیات استریل آماده است.

در بسیاری از آزمایشگاهها اطاقک فوق جای خود را به هود استریل می دهد. (Laminar air flow cabinet) با این هود 15-10 دقیق بعد از روشن نمودن می‌توان کار را شروع کرد. در اتاقکهای معمولی این امکان وجود ندارد. لامینار فلو دارای موتور کوچکی برای دمیدن هواست. هوا البته از یک فیلتر درشت عبور داده می‌شود و سپس از یک فیلتر نرمتر بنام HEPA air (High efficiency particulate air) معروف است عبور

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

می کند و در خلال عبور از فیلترهای فوق ذرات گرد و غبار بزرگتر از 0/2 میلی متر را گرفته و آلودگیهای باکتریایی و قارچی را از بین می برد. سرعت خروج هوای استریل از فیلتر نهایی حدود 2±27 متر در ثانیه است که برای جلوگیری از آلودگیهایی که در فضای کار که توسط شخص بوجود می آید، کافی بنظر می‌رسد. جریان هوا در داخل لامینار فلو به هیچ وجه مانع کار چراغ الکلی نمی‌شود.

تهیه محیط کشت:

جهت کشت بافت ارقام انتخابی از محیط پایهٔ MS به همراه مواد تکمیل کننده و هورمونها استفاده گردید:

در ابتدا محلولهای ذخیره مواد کم مصرف تهیه گردید و سپس برای هر بار تهیهٔ محیط کشت، علاوه بر محلولهای ذخیره، مواد پرمصرف، ساکاروز آگار توزین و به محیط افزوده گردید.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

روش تهیه محیط کشت MS:

1- محلولهای ذخیره:

محلول الف – مقدار لازم به شرح زیر از هرکدام از مواد در 100 میلی لیتر آب مقطر حل گردید سپس برای هر لیتر از محیط کشت، 10 میلی‌لیتر از ان استفاده گردید (غلظت × 10)

H_3Bo_3 62 میلی گرم

$MnSo_4,4H_2O$ 223 میلی گرم

$ZnSo_4,7H_2O$ 86 میلی گرم

روش تهیه محلول ذخیره الف بدین صورت است که حدود 60 میلی لیتر آب مقطر درون بشر 200 میلی لیتر ریخته و در حین بهم زدن ابتدا اسید بوریک را به آن اضافه کرده بعد از حل شدن کامل به ترتیب $MnSo_4$ و سپس $ZnSo_4$ را در آن می ریزیم و سپس به حجم 100 میلی لیتر می رسانیم.

محلول ب- مقدار ذکر شده از هرکدام از مواد زیر در 500 میلی لیتر آب مقطر حل شده و در یخچال نگهداری می شود (غلظت 100X)

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

KI	41/5 میلی گرم
KI	12/5 میلی گرم

محلول ج- مقدار ذکر شده از هرکدام از مواد زیر در 200 میلی لیتر آب مقطر حل شده و در یخچال نگهداری می شود سپس برای هر لیتر از محیط کشت مقدار 0/1 لیتر از آن برداشته می شود (غلظت 10000X).

$CuSo_{۴},۵H_{۲}O$	50 میلی گرم
$CoCl_{۲},۶H_{۲}O$	50 میلی گرم

محلول د- مقدار ذکر شده از هر یک از مواد زیر را در 100 میلی لیتر آب مقطر حل کرده و برای هر لیتر محیط کشت 10 میلی لیتر از آن برداشته می شود (غلظت 100X).

$Na_{۲}EDTA.۲H_{۲}O$	372/5 میلی گرم
$FeSo_{۴},۷H_{۲}O$	278/5 میلی گرم

روش تهیهٔ این محلول بدین صورت که ابتدا Na_2EDTA را در 40 میلی لیتر آب مقطر نیمه گرم حل می کنیم. سولفات آهن را نیز جداگانه در 50 میلی لیتر آب حل کرده و بعد از حل شدن کامل هر دو، در حین بهم زدن و به آرامی

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

محلول Na_2EDTA را روی سولفات آهن می ریزیم و آنرا در تاریکی و در یخچال نگهداری می کنیم.

محلول هـ - مقدار ذکر شده از هرکدام از مواد زیر را در 100 میلی لیتر از آب حل کرده و برای هر لیتر از محیط کشت 10 میلی لیتر از آن برمی داریم (غلظت 100X).

پیریدوکسین (ویتامین B_6)	5 میلی گرم
تیامین (ویتامین B_1)	10 میلی گرم
گلایسین	20 میلی گرم
اسید نیکوتینیک	5 میلی گرم

محلول و – مقدار 20 میلی گرم از هورمون 2-4-D را ابتدا در چند میلی لیتر الکل اتیلیک 70٪ حل کرده و روی همزن قرار می دهیم و سپس به آرامی آب مقطر را به آن اضافه می‌کنیم تا به حجم 100 میلی لیتر برشد. سپس برای محیط کشت کالوس زایی جنین نارس مقدار 10 میلی لیتر و برای محیط باززایی میزان 5 میلی لیتر از آن استفاده می گردد (1).

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 1- ترکیبات معدنی محیط کشت پایهٔ MS برحسب میلی گرم در لیتر

ترکیبات	میلی گرم در لیتر	ترکیبات	میلی گرم در لیتر
NH_4NO_3	1650	$ZnSO_4$ ،$7H_2O$	8/60
KNO_3	1900	KI	0/83
$CaCl_2$،$2H_2O$	440	Na2MoO2،4H2O	0/25
KH_2PO_4	170	$CuSO_{40}5H_2O$	0/025
H_3BO_3	6/20	$CoCl_{20}6H_2O$	0/025
$MnSO_{40}H_2O$	16/90	$MgSO_{40}7H_2O$	370
$Na_2EDTA2H_2O$	37/25	$FeSO_{40}7H_2O$	27/85

جدول 2- مواد آلی تکمیل کننده و هورمون در محیط های کشت بر حسب میلی گرم در لیتر

ترکیبات	میلی گرم در لیتر

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

پیروکسیدین[۱]	0/5
تیامین[۲]	1
گلیسین[۳]	2
اسید نیکونیتیک[۴]	0/5

محیط کشت:

برای تهیهٔ محیط کشت این آزمایش، 400 میلی لیتر آب مقطر را در یک لیوان ارلن 2 لیتری ریخته و روی همزن می گذاریم.

مقدار 10 میلی لیتر از محلول های ذخیرهٔ (الف)، (ب)، (د)، (هـ) و مقدار 0/1 میلی لیتر از محلول ذخیرهٔ (ج) و مقدار لازم از محلول ذخیرهٔ (و) به آن می افزاییم. مقدار لازم از NH4NO3، KNO3، CaCl2، KH2PO4 و MgSO3 را طبق جدول 6 به آن اضافه نموده و 100 میلی گرم از میولینوزیتول و 30 گرم ساکارز به آن اضافه می کنیم و حجم محلول را به 900 میلی لیتر می رسانیم. با استفاده از NaOH یا HCl، pH محلول را در

[۱] - Pridoxine HCl
[۲] - Thiamine HCl
[۳] - Glycine
[۴] - Nicotinic acid

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

حد 5/7 تا 5/8 تنظیم می کنیم. سپس میزان 7 گرم آگار به آن اضافه کرده و حجم محلول را به یک لیتر می رسانیم. دهانهٔ ارلن را با دو لایهٔ آلومینیم بسته و اتوکلاو می نماییم (دمای 121 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه و فشار یک بار).

بعد از اتوکلاو، زمانی که دمای محلول به 60-50 درجه سانتی گراد رسید، در شرایط سترون و در زیر لامینارفلو، آنرا در ظروف پتری دیش 10 سانتی متری توزیع می کنیم.

در هر پتری 30-25 میلی لیتر محلول ریخته و بعد از سرد شدن و ژله ای شدن محیط، ریز نمونه ها را بلافاصله کشا کرده و سپس پتری ها را با پارافیلم بسته و در اتاقک رشد قرار می‌دهیم.

- سترون کردن محیط کشت، ظروف پتری و سایر لوازم:

ارلن در بسته حاوی محیط کشت در دمای 121 درجه سانتی گراد و فاشر یک بار به مدت بیست دقیقه سترون گردید. ظروف پتری، ارلن حاوی آب مقطر، لیوانهای پیرکس جهت قرار دادن پنش و اسکالپل نیز در همین شرایط اتوکلاو

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

گردید. وسایل ضروری مانند پنس، قیچی و اسکالپل در شرایطی که در فویل آلومینیمی پیچانده می شد، در دمای 130 درجه سانتی گراد و به مدت 2 ساعت، در آون بصورت خشک استریل می گردد.

روش تهیه محیط کشت SH:

محلولهای ذخیره:

الف- استوک ماکرو:

مقدار لازم به شرح زیر از هرکدام از مواد در 250 میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس برای هر لیتر از محیط کشت 25 میلی لیتر از آن استفاده گردید (غلظت 100X)

$(NH_4)H_2PO_4$	3 گرم
KNO_3	25 گرم
$Mgno_4.5H_2O$	4 گرم

ب- استوک کلسیم:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مقدار ذکر شده از هرکدام از مواد زیر را در 250 میلی لیتر آب مقطر حل کرده سپس برای هر لیتر از محیط کشت 25 میلی لیتر از آن استفاده گردید:

(غلظت 100X)

$CaCl_2.2H_2O$ 4 گرم

ج- استوک آهن:

مقدار ذکر شده از هرکدام از مواد زیر را در 250 میلی لیتر آب مقطر حل کرده سپس برای هر لیتر از محیط کشت 25 میلی لیتر از آن استفاده گردید:

(غلظت 100X)

$Feso_4.7H_2O$ 0/15 گرم

$Na_2.EDTA$ 0/2 گرم

د- استوک میکرو:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مقدار ذکر شده از هر یک از مواد زیر در 250 میلی لیتر آب مقطر حل کرده و برای هر لیتر محیط کشت 2/5 میلی لیتر از آن برداشته می شود (غلظت 100X)

$MnSo_4.H_2O$	1 گرم
$ZnSo_4.7H_2O$	0/1 گرم
H_3BO_3	0/5 گرم
Na_2MOO_4	0/01 گرم
$CuSO_4.5H_2O$	0/02 گرم
$CaCl_2.OH_2O$	0/01 گرم

هـ - استوک ید:

مادهٔ زیر را در 250 میلی لیتر آب مقطر آب حل کرده و برای هر لیتر محیط کشت 2/5 میلی لیتر از آن برداشته می شود (غلظت 1000X)

KI	0/1 گرم

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

و- استوک ویتامین:

مواد زیر را در 250 میلی لیتر آب مقطر حل کرده و برای هر لیتر محیط کشت 2/5 میلی لیتر از آن برداشته می شود (غلظت 1000X)

Nicotinic acid	0/5 گرم
Thiamine HCl	0/5 گرم
Pyridoxine	0/5 گرم

سترون کردن محیط کشت، ظروف پتری و سایر لوازم:

ارلن در بسته حاوی محیط کشت در دمای 121 درجه سانتیگراد و فشار یک بار به مدت 30 دقیقه سترون گردید. ظروف پتری، ارلن حاوی آب مقطر، لیوانهای پیرمس جهت قراردادن پنس و اسکالپل نیز در همین شرایط اتوکلاو گردید. وسایل ضروری مانند پنس، قیچی و اسکالپل در شرایطی که در فویل آلومینیمی پیچانده می شد، در دمای 130 درجه سانتیگراد و به مدت 2 ساعت، در آون بصورت خشک استریل می گردید.

بافت گیاهی:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جهت انتخاب مناسبترین بافت از ژنوتیپهای مورد مطالعه از بذر کامل، برگ و هیپوکوتیل استفاده شد.

بذر:

بذور ارقام مورد نظر بمدت چند ثانیه با اتانول 70٪ شستشو داده سپس بمدت 25-20 دقیقه با محلول 2/5٪ هیپوکلرید سدیم که یک قطره تون 80 (یک قطره مایع ظرفشویی) به آن اضافه شده است، ضد عفونی سطحی می گردد. لازم است تا در اتین مدت شیشه های حاوی هیپوکلرید سدیم و بذور بوسیلهٔ دست یا با استفاده از شیکر تکان داده شود. پس از اتمام این مدت بذور را در داخل محفظهٔ هود (که قبلاً تمام سطح آن با محلول رقیق مایع ظرفشویی و الکل ضدعفوتی شده است) پنج دفعه با آب مقطر استریل شستشو می دهیم و پس از این بذور برروی محیط جامد MS (جدول 19) در ظروف پتری 10 سانتی متری کشت شدند. در هر پتری 10 عدد به بذر کشت گردید. (شکل 2)

در این مرحله هورمون به محیط کشت اضافه نشد. بمدت دو هفته در دمای 25±1 سانتی گراد و 16 ساعت نور با شدت نور 3000-2500 لوکس قرار

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

داده شد. بعد از 6-5 روز گیاهچه های بذری که به اندازهٔ کافی رشد کرده بودند برای تهیه ریز نمونه مورد استفاده قرار داده شد.

تعدادی از بذور ضدعفونی شده نیز مستقیماً به محیطهای هورمون دار القاء کالوس برده شدند. شامل محیط پایه SH و مواد آلی تکمیل کننده به همراه چهار سطح هورمونی زیر برده شدند.

محیط (1): 2میلی گرم در لیتر 2-4-D +2میلی گرم در لیتر kin+5 میلی گرم در لیتر NAA

محیط (2): 5 میلی گرم در لیتر 2-4-D+2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (3): 5 میلی گرم در لیتر NAA+2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (4): 2 میلی گرم در لیتر 2-4-D+0/25 میلی گرم در لیتر Kin

به همراه 8 گرم در لیتر آگاز 30 گرم در لیتر شکر کشت گردید.

ریز نمونه ها بعد از 4 هفته به همان محیط و تحت همان شرایط واکشت شدند.

برگ جوان وهیپوکوتیل:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

برای بدست آوردن برگهای جوان و هیپوکوتیل دانه های سالم و بدون آن انتخاب و طبق شرایط کشت بذر، سترون شدند و در هر پتری 10 سانتی متری 10 عدد بذر سترون شده برروی محیط کشت جامد تحت شرایط سترون کشت گردید.

محیط کشت محیط پایه MS و مواد آلی تکمیل کننده و بدون هورمون بود.

از هر رقم 3 پتری کشت گردید و در دمای 1 ± 25 درجه سانتی گراد و 16 ساعت نور با شدن 4000-3500 لوکس قرار داده شدند.

بعد از 4 روز زمانی که گیاهچه ها حدود 2 سانتی مترطول داشتند تحت شرایط سترون پتری های غیرآلوده باز شدند و برگها و هیپوکوتیلهای آنها توسط اسکالپل به قطعات 2 میلی متری تقسیم شد و در پتری ریشهای حاوی محیط پایه SH و مواد آلی تکمیل کننده به همراه چهار سطح هورمونی که در بالا ذکر شد برده شدند. در هر پتری حدود 10 قطعه برگ و یا 10 قطعه هیپوکوتیل کشت شد و در دمای 1 ± 25 درجه سانتیگراد و تاریکی قرار داده شدند.

ریز نمونه ها بعد از 4 هفته که کالوسها رشد کرده بودند به همان محیط و تحت همان شرایط واکشت شدند.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

صفات اندازه گیری شده در دوره کال زایی:

از آنجا که صددرصد کالوس زایی داشتیم مطالعات آماری در مرحلهٔ کالوس زایی فقط برروی اندازه کالوسها اندازه شد و بعد از واکشت دوم میزان رشد کالوس (حجم کالوس)، با استفاده از استاندارد هوکرونی برز (شکل 1) اندازه‌گیری گردید.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

محیط جنین زایی:

وقتی کالوسها به مقدار کافی از سه رقم یونجه تولید شد به محیطهای جنین‌زایی شامل محیطهای پایه B5 و MS تکمیل شده با مواد زیر برده شد:

محیط (1): 1 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 0/2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (2): 3 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 0/2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (3): 6 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 0/2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (4): 9 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 0/2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (5): 1 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 1/2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (6): 3 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 1/2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (7): 6 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 1/2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (8): 9 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 1/2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (9): 1 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (10): 3 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (11): 6 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 2 میلی گرم در لیتر Kin

محیط (11): 6 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 2 میلی گرم در لیتر Kin

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

محیط (12): 9 میلی گرم در لیتر 2-4-D + 2 میلی گرم در لیتر Kin

بمدت دو هفته کالوس ها در این محیطها در شرایط 25 ± 2^{0C} در دورهٔ روشنایی 16 ساعت نور و 8 ساعت تاریکی برده شدند و بر حسب میزان جنین زایی بررسی شدند.

روش تهیه محیط کشت B5:

محلولهای ذخیره:

الف – استوک میکرو:

مقدار لازم به شرح زیر از هرکدام از موارد را در 250 میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس برای هر لیتر از محیط $0/25^{C.C}$ از محلول برداشته می شود:

$MnSo_4.H_2O$	1 گرم
H_3BO_4	0/3
$ZnSo_4.7H_2O$	0/2
$Na_2MOO_4.2H_2O$	0/25
$CuSo_4.5H_2O$	0/025

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

ب- استوک ماکرو:

مقدار لازم به شرح زیر از هرکدام از مواد را در 250 میلی لیتر آب مقطر حل گردید سپس برای هر لیتر از محیط کشت 25^{cc} از محلول برداشته می شود.

$Na_2HPO_4.H_2O$	0/15 گرم
KNO_3	2/5 گرم
$(NH4)2SO_4$	0/134 گرم
$MgSo_4.7H_2O$	0/25 گرم

ج- استوک کلسیم:

مقدار لازم از مادهٔ زیر را در 250 میلی لیتر آب مقطر حل گردید. سپس برای هر لیتر $2/5^{C.C}$ از محلول برداشته می شود:

$CaCl_2.2H_2O$	15 گرم

د- استوک ید:

مقدار لازم از مادهٔ زیر را در 250 میلی لیتر آب مقطر حل گردید سپس برای هر لیتر $0/25^{CC}$ از محلول برداشته می شود:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

KI 0/075 گرم

و- استوک آهن:

مقدار لازم از موارد زیر را در 250 میلی لیتر آب مقطر حل گردید سپس برای هر لیتر 25CC از محلول برداشته می شود:

Na2EDTA 0/0215 گرم

$FeSo_4$ 0/ 0215 گرم

هـ - استوک ویتامین:

مقدار لازم از مواد زیر را در 250^{CC} آب مقطر حل کرده و مقدار 0/25 برای هر لیتر محلول برداشته می شود:

نیکوتینیک اسید 0/1 گرم

تیامین HCl 1 گرم

پیردوکسین Hcl 0/1 گرم

میواینوزیتول 1 گرم

به همراه 30 گرم ساکاروز و 0/1 گرم در لیتر میواینوزیتول برای هر لیتر محلول و PH محلول حدود $5/5 \pm 0/3$ تنظیم می گردد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

محیط باززایی:

جنینهای گلبولی شکل برای بلوغ بمدت سه هفته به محیط Bio2y برده شد و در این محیط جنینهای کروی به جنینهای قلبی شکل تمایز یافتند و رنگ جنینها از کرمی به سبز تبدیل شد. محیط Bio2y همان محیط B5 است به همراه 2 گرم در لیتر عصارهٔ مخمر و در این محیط از ترکیبات هورمونی استفاده نشد.

محیط تبدیل به ...

در این مرحله جنینهای قلبی شکل به محیط جوانه زنی حاوی محیط پایه SH به همراه ترکیبات هورمونی 6 میلی گرم در لیتر 2-4-D و 0/2 میلی گرم در لیتر Kin برده شدند.

محیط کشت سوسپانسیون:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

500 میلی گرم از کالوسهای جنین زا به داخل ارلنهای 100 میلی لیتر حاوی 20 میلی لیتر از محیط کشت مایع B5 به اضافه 1 میلی گرم در لیتر 2-4-D و 0/2 میلی گرم در لیتر Kin منتقل شدند. ارلنها برروی تکان دهنده افقی با 150 دور در دقیقه در 16/8 ساعت روشنایی در 5 تکرار و در دمای 27 درجه سانتیگراد قرار گرفت. واکشتها هر 5 روز یکبار در هفته اول و هر 10 روز یکبار در طی واکشتهای بعدی انجام شد.

پس از مشاهدهٔ تشکیل جنین در تعلیق سلولی شش هفته ای 1 میلی لیتر از هر محیط توسط سمپلر 1 میلی لیتری برداشته و روی فیلتر قرار داده شد و تعداد جنینها روی فیلتر در واحد میلی لیتر اندازه گیری شد.

محاسبات آماری:

اندازه گیریهای لازم در آزمایشگاه انجام شد و داده ها در طرح فاکتوریل با طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با استفاده از برنامه های نرم افزار SPSS و MSTATC تجزیه و تحلیل آماری شد. ضریب همبستگی بین داده های حاصل از جنین زایی و باززایی اندازه گیری گردید و اثرات متقابل بین صفات

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

مختلف نیز بررسی شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL رسم گردید.

در تمامی تجزیه و تحلیل زمانی که واریانسهای درون تیماری همگن نبودند از تبدیل لگاریتمی استفاده شد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

www.kandoocn.com

فصل چهارم

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

www.kandoocn.com

بحث و نتیجه‌گیری

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری:

انتخاب ارقام یونجه:

جهت مقایسه کال زایی، جنین زایی و باززایی گیاه از بذور جمعیتهای قره یونجه، رنجر و واریته سنتیک دانشکده کشاورزی تبریز استفاده شد.

محیط القاء کال:

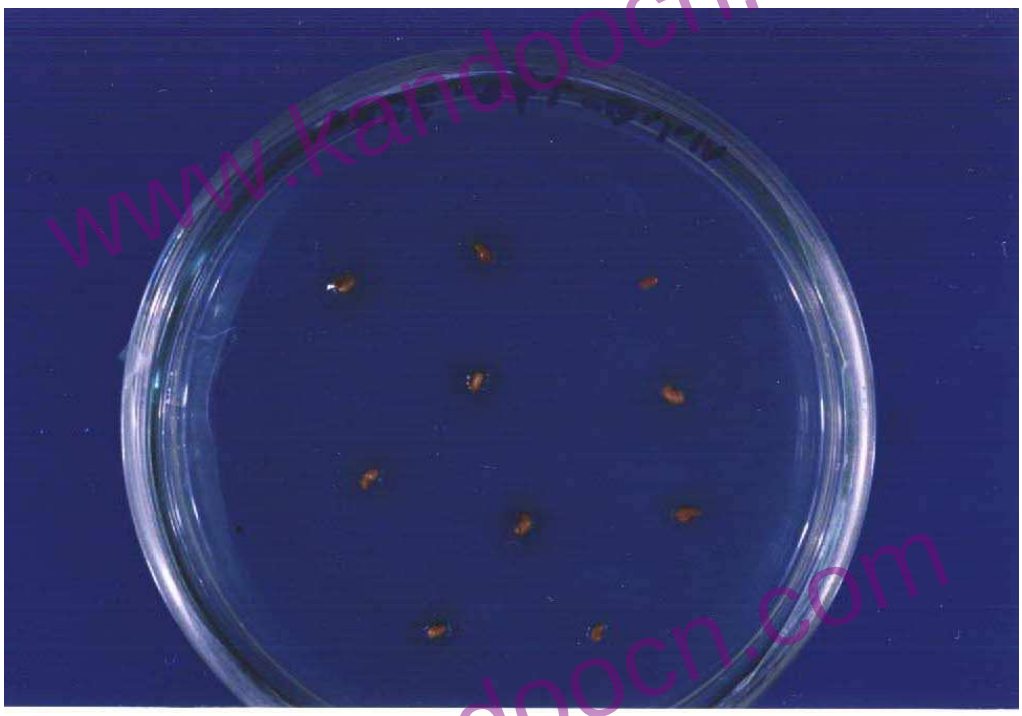
در مورد ریز نمونه های برگ و هیپوکوتیل حدوداً 4 روز بعد از قرار دادن ریزنمونه ها در محیط القاء کال، اولین علایم آغازیدن کال روی ریز نمونه ها مشاهده شد. به این صورت که ابتدا هیپوکوتیل متورم و سپس اپیدرم لایه لایه شده و سلولهای زیرلایه اپیدرمی شروع به تقسیم کرده و کال زایی آغاز شد. پس از ده روز براحتی کال در زیر نمونه ها قابل مشاهده بود. (شکل 3و4و5) در مورد ریزنمونه بذر پس از 7 روز از قرار دادن ریزنمونه ها در محیط القاء کال اولین علائم آغازیدن کال روی ریزنمونه ها مشاهده شد به این ترتیب که بذرها متورم شده و سپس کال زایی آغاز شد پس از 14 روز براحتی کال در ریزنمونه ها قابل مشاهده بود. بعد از 20 روز، کال رشد کرده از ریزنمونه های برگ و هیپوکویتل آمادهٔ بازگشت شد و کالهای حاصل از ریزنمونه بذر پس از 30 روز آماده بازگشت شد. کالوسهای بدست آمده کرمی و ترد بودند (شکل 6 و 7). قبل از بازگشت از آنجا که همهٔ نمونه ها در محیط SH، 100 درصد

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جنین‌زایی داشتند، فقط قطر کالها به عنوان فاکتور مورد اندازه گیری بررسی شد.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید



شکل 2 : کاشت بذر های استریل در محیط کشت هورمون دار

شکل 3: نمونه از کالوس آبدار و غیر جنین زا

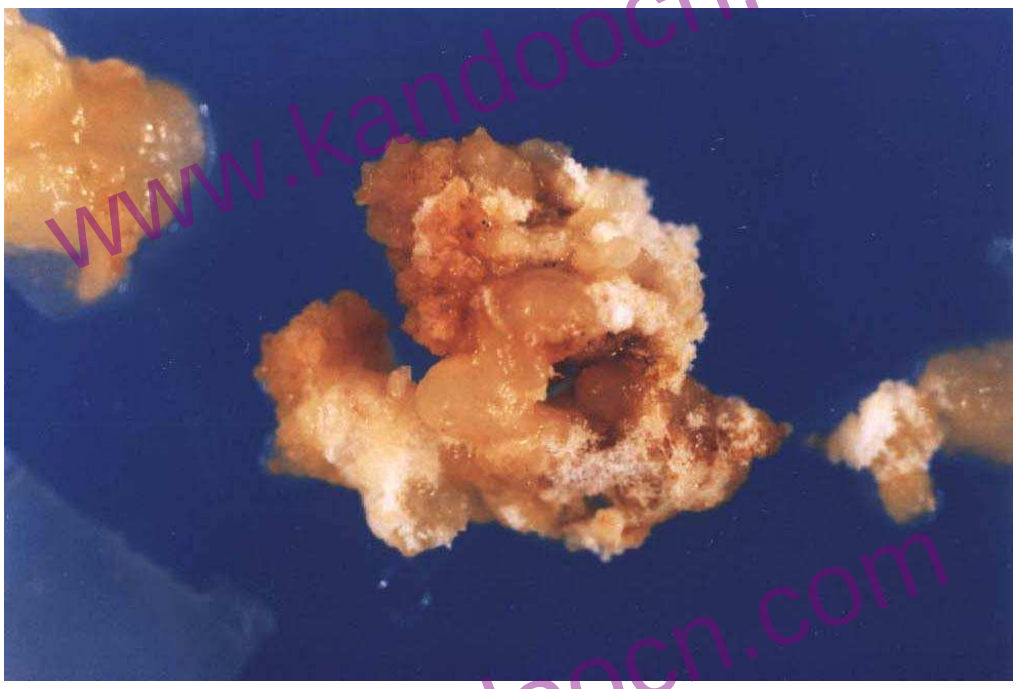
www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 4: نمونه از کالوس غیر جنین زا

www.kandoocn.com

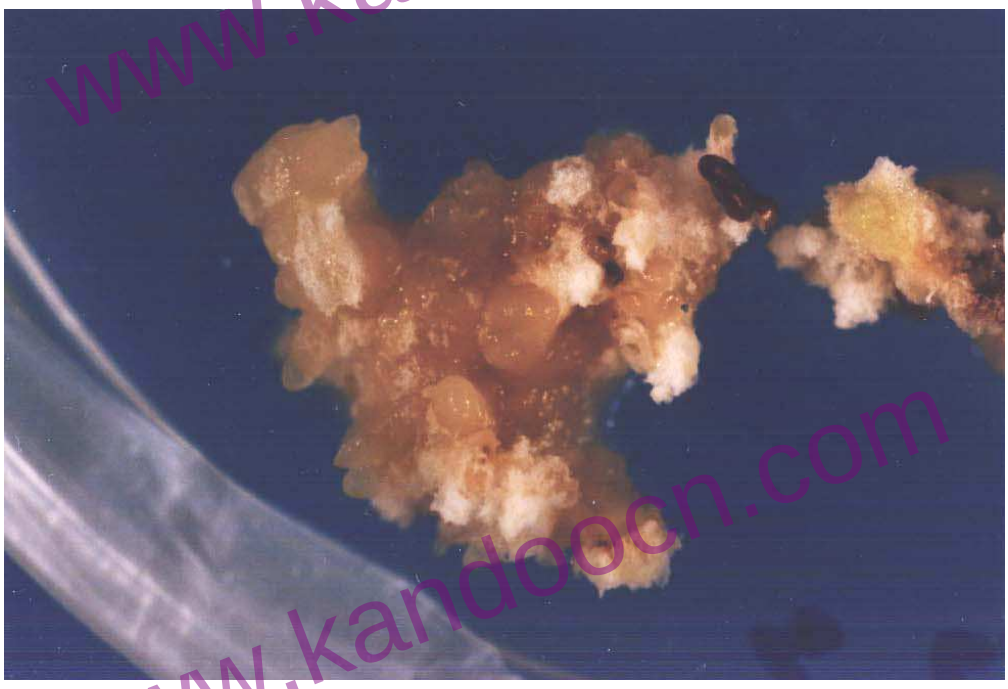
جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید



شکل 5: نمونه ای از کالوسهای جنین زا

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 6: شروع تشکیل کال در ریز نمونه بذر



شکل 7: نمونه ای از کالوسهای حاصل از کاشت بذر

الف – مقایسه اثر ریزنمونه در رشد کالوسها:

طبق جدول 3 ضمیمه مشاهده می شود در القاء کالوس سطوح هورمونی مختلف بکار رفته تفاوت معنی دار نداشتند که این نتیجه با آنچه توسط مک‌کوی و واکر انجام دادند در سال 1984 منطبق بود آنها بیان داشتند که میزان بالای 2-4-D و مدت زمان القاء در محیط حاوی 2-4-D در القاء کال و اندامزایی نقش عمده ای داشته اند و ما چون از سطوح هنورمونی با مقدار بالای 2-4-D استفاده کردیم سطوح هورمونی اختلاف معنی داری در رشد کالها

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

نداشتند. اما اثر متقابل بین ریز نمونه و رقم و همچنین ریزنمونه و هورمون اثر معنی داری روی رشد کالوسها داشتند. از مقایسات میانگین طبق جدول 2 و 3 بهترین ریزنمونه و رقم و همچنین اثرات متقابل آنها تعیین گردید.

همانگونه که در جدول شماره 4 ضمیمه مشاهده می شود، ریزنمونه بذری بهتر از ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ عمل کرده است و ریزنمونه هیا هیپوکوتیل و برگ در رشد کالوس تفاوت معنی داری با یکدیگر در سطح 5٪ ندارند. ولیکن ریزنمونه‌بذر درسطح 5٪ اختلاف معنی‌دار با دو ریزنمونه‌دیگر دارد. (نمودارB)

ایانتچوا و همکاران (2001) بیان کردند که از بین ریزنمونه های برگ و دمبرگ، برگها بهترین کالزایی را داشتند. البته آنها از ریزنمونه بذر استفاده نکرده بودند بنابراین نتایج آنها با نتایج ما متفاوت بود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

بررسی اثر ارقام در رشد کالوسها:

با توجه به جدول 5 ضمیمه مشاهده می‌شود که رقم قره یونجه در سطح احتمال 5٪ اختلاف معنی داری با دو رقم دیگر داشته و این رقم بیشترین رشد را در محیط کشت SH داشت و در گروه a قرار گرفت و ارقام سنتتیک و رنجر کالوس کمتری در محیط SH نسبت به قره یونجه داشتند و در گروه b قرار گرفتند (نمودار A) که نتیجه بدست آمده با آنچه که توسط ولیزاده و توشیاکی کامیل (1372) مبنی بر اینکه مقدار کال در واریته های مختلف متفاوت بود منطبق بود. همچنین مطلبی آذر و همکاران (1379) نیز نتیجه ای مبنی بر اختلاف رشد کالها در ارقام مختلف را بیان داشتند و نایگان و مکنز (1985) نیز اختلاف ژنوتیپهای یونجه در کالزایی را بیان کردند.

بررسی اثر متقابل سطوح هورمونی مختلف با ریزنمونه در رشد کالوسها:

با توجه به جدول ضمیمه 6 مشاهده می شود در رشد کالوس اثر متقابل سطح هورمونی دوم شامل 2 Kin میلی گرم در لیتر و 2-4-D 5 میلی گرم در لیتر با ریزنمونه بذر مهمتر از بقیه عمل کرده است و در گروه a قرار می گیرد و بقیه

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

اثرات متقابل سطوح هورمونی و ریزنمونه ها در گروههای پایین تر قرار می گیرند و همچنین طبق جدول 7 ضمیمه مشاهده می شود اثر متقابل بذر با رقم فرد یونجه بیشترین رشد کالوس را نشان می دهند و در گروه a قرار می گرد و بعد آن اثر متقابل به زربارقم سنتیک بیشترین رشد کالوس را نشان داده و در گروه b قرار می گیرد و بقیه اثرات متقابل کمتر از موارد فوق در رشد کالوس نشان دادند. (نمودار C و D و E)

محیط القاء جنین:

در این مرحله تعدادی از کالهای رشد یافته، به محیط القاء جنین زایی جامد بازگشت شد و به مدت 4-3 روز در شرایط تاریکی و روشنایی 16/8 و 2±26 درجه نگهداری شد. در این مرحله تعدادی از سلولهای کال دستخوش تغییرات می شود که این تغییرات بصورت تشکیل جنین های کروی در مرحله بعدی قابل مشاهده بود (شکل 8).

درصد جنین زایی به این صورت تعیین شد که تعداد کالوسهای جنین زا در ظرف پتری شمارش می شد. کالوسهای جنین زا دارای ساختار متراکم و سازمان یافته بودند.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

طبق جدول شماره 8 ضمیمه می بینیم که محیط کشت، هورمون و رقم تأثیر معنی داری در جنین زایی گذاشته اند ولی اثرات متقابل بین این فاکتورها اثر معنی داری روی جنین زایی نداشته است. بدین معنی که فاکتورهای فوق مستلزم از هم عمل کرده اند یا واکنش سه رقم یونجه در محیطهای کشت و سطوح هورمونی مختلف یکسان وبده است. ونزل و براون (1991) نشان دادند که تقسیم سلولی بعد از 10 روز و تحریک جنین زایی بعد از 28 روز در محیط القاء کال اتفاق می افتد. میجر و براون (1987) و آرسیونی و همکاران (1982) مشاهده کردند که تحریک جنین زایی بعد از انتقال کالها به محیط القاء جنین بهتر رخ می‌دهد.

www.kandoocn.com

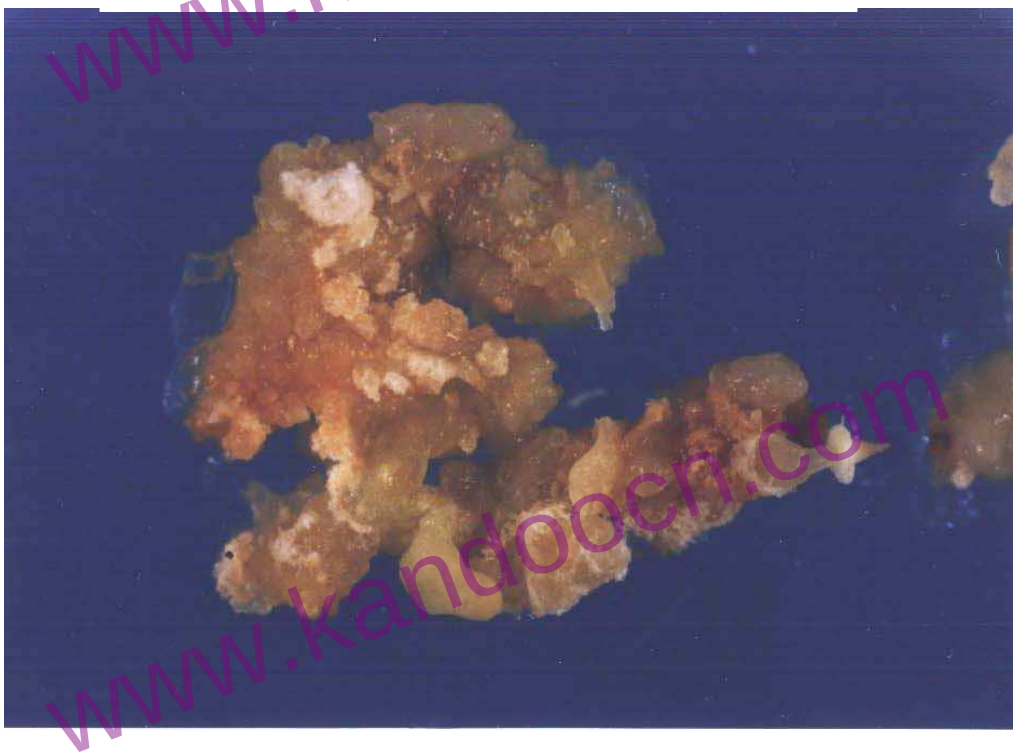
جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل8: تشکیل جنین کروی شکل

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 9: تشکیل جنین لپه ای شکل



www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 10: تشکیل جنین نیزه ای شکل

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

بررسی تأثیر نوع محیطهای کشت در جنین زایی:

با توجه به جدول ضمیمه شماره 9 می بینیم که در مقایسه میانگین بین محیطهای کشت B5 و MS، محیط B5 در جنین زایی بهتر از محیط MS عمل کرده است و در گروه a قرار می گیرد و محیط MS در گروه b جا می گیرد. (نمودار F)

بینگهام و ری (1989) در بررسی جنین زایی و باززایی در یونجه های دیپلوئید محیط B5 را موفق تر از سایر محیط ها گزارش کردند. در بررسیها نیز بین محیط B5 و MS نتیجه گرفته شد که محیط B5 در جنین زایی از لحاظ آماری بهتر از محیط MS عمل کرده است.

بررسی تأثیر سطوح هورمونی در جنین زایی:

با توجه به جدول ضمیمه شماره 10 می بینیم سطوح هورمونی ششم 2-4-D 1میلی گرم در لیتر به همراه 0/2Kin میلی گرم در لیتر در جنین زایی بیشترین درصد جنین را ایجاد کرده و در گروه a قرار می گیرد و سطوح هورمونی دیگر – البته بجز سطوح هورمونی 13 شامل 2-4-D 9 میلی گرم در لیتر به همراه

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

Kin 2 میلی گرم در لیتر در گروههای پایین تر از آن قرار می گیرد (نمودار G)

که این نتایج با یافته های پاسترناک و همکاران (2002) که اثرات اکسین و PH را در فعالیت تقسیم سلولهای جنین زا در پروتوپلاست حاصل از برگهای یونجه بررسی کردند و بیان کردند در میزان بالای 2-4-D با کالوسهای جنین را با سیتوپلاسم متراکم مواجه گردیدند درحالیکه سلولهای در معرض 2-4-D پایین طویل شدند و از بین رفتند یا کلنی تمایز نیافته اند تا حدودی مطابق بود، بدان معنا که میزان بالای اکین نسبت به سیتوکسین باعث ایجاد جنین زایی شد ولی این افزایش مقدار اکسین نسبت به سیتوکسین به نسبت خاصی منجر به تولدی جنین می شد و سایر نسبتهای هورمونی در گروههای پایین تر از نظر جنین زایی قرار گرفتند.

بررسی اثر رقم در جنین زایی:

با توجه به جدول ضمیمه شماره 11 رقم سنتتیک بیشترین درصد جنین را نسبت به ارقام دیگر یعنی قره یونجه دارد که در گروه a قرار می گیرد و رقم یونجه در گروه b و رقم رنجر در گروه c به ترتیب بعد از سنتتیک ایجاد کرده بودند.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

محیط باززایی:

بعد از 10 روز اولین علائم گره زایی (جنینهای کروی) در این محیط روی کال ظاهر شد (شکل 8) و بعد از 20 روز جنینهای کروی سفید سبز شدند و پس از چند روز جنینهای کروی به جنینهای قلبی شکل تمایز یافتند.

با توجه به جدول ضمیمه شماره 12 می بینیم که سه رقم مورد مقایسه از نظر باززایی تفاوت معنی داری با هم دارند و مقایسه میانگینها طبق جدول ضمیمه شماره 13 نشان می دهد که از نظر باززایی رقم سنتتیک با حداکثر میانگین در گروه a رقم قره یونجه در گروه b و رقم رنجر در گروه C قرار می گیرد و همچنین طبق جدول ضمیمه 14 می بینیم بین ریزنمونه ها از نظر باززایی تفاوت معنی دار است و ریزنمونه برگ در این مرحله با حداکثر میانگین در گروه a و ریزنمونه های بذر و هیپوکوتیل در گروه b قرار می گیرند.

بنابراین محیط Bio2y، رقم سنتتیک و ریزنمونه برگ بیشترین باززایی را دارد (نمودار H)

محیط تبدیل به گیاه:

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

در این مرحله جنینها ابتدا به صورت نیزه ای شده سپس مرحله لپه ای مشاهده می شود. (شکل 10 و 11) سپس جنینهای لپه ای جوانه زنی کرده و شاخساره و ریشه تولید کردند. (شکل 12 و 13 و 14 و 15)

با توجه به جدول ضمیمه ی 13 می بینیم که سه رقم مورد مقایسه از نظر تبدیل به گیاهچه تفاوت معنی داری با هم دارند و مقایسه میانگینهای سه رقم رنجبر، قره یونجه و سنتیک (جدول ضممیه 14) نشان می دهد که از نظر باززایی رقم سنتیک با حداکثر میانگین در گروه a و رقمهای قره یونجه و رنجر هر دو در گروه b قرار می گیرند. بنابراین در محیط MS و مقدار هورمونی 2-4-D 6 میلی گرم در لیتر و Kin 0/2 میلی گرم در لیتر رقم سنتیک بیشترین گیاهچه را داده بود. (نمودار I)

ما در این مرحله از نتایج مطلبی آذر و همکاران (1379) در این محیط بیشترین تبدیل به گیاهچه را داشتند استفاده کردیم و فقط اثر ژنوتیپ را در تبدیل به گیاهچه بررسی کردیم.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 11: ریشه زایی در محیط تبدیل به گیاهچه

شکل 12: رشد ریشه در محیط تبدیل به گیاه

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 13: شاخه زایی در محیط تبدیل گیاهچه

شکل14: نمونه از تولید شاخه و ریشه

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

کشت سوسپانسیون:

در این مرحله برای هر ارلن 500 میلی گرم از کالهای رشد یافته، به محیط کشت سوسپانسیون به منظور جنین زایی برده شدند.

در این مرحله برای 500 میلی گرم از کالوسهای جنین زا را که به ارلنهای 100 میلی لیتری حاوی 20 میلی لیتر از محیط کشت مایع B5 حاوی 2-4-D 1 میلی گرم در لیتر و Kin 0/2 میلی گرم در لیتر منتقل شدن بودند مطالعه کردیم. پس از 10 روز تغییراتی در کالوسهای مشاهده شد. به این ترتیب که سلولهایی که از هم در اثر نیروی شیکر جدا شده بودند متورم شده و حالت کروی بخود گرفته بودند. (شکل 16) به همین ترتیب از مراحل مختلف که در هر بار واکشت مشاهده می شد شکلهایی تهیه شد و پس از 6 هفته از اولین کشت جنینهای در تعلیق سلولی را برای شمارش زیر میکروسکوپ بردیم بدین صورت که

1 میلی‌لیتر از هر محیط توسط سمپلر 1 میلی لیتر برداشته و روی فیلتر قرار داده شد و تعداد جنینهای روی فیلتر در واحد میلی لیتر اندازه گیری شد، سپس در طرح کاملاً تصادفی داده ها مورد تجزیه آماری قرار گرفت.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

با توجه به جدول ضمیمه 17 نتیجه می گیریم در محیط کشت B5 بحالت سوسپانسیون از نظر جنین زایی بین ارقام تفاوت معنی داری وجود دارد. از مقایسه میانگین بین ارقام با آزمون دانکن طبق جدول ضمیمه 18 نشان می دهد که رقم سنتتیک درصد جنین بالایی را در سطح هورمونی 2-4-D 1 میلی گرم در لیتر و 0/2Kin میلی گرم در لیتر و محیط B5 نسبت به ارقام رنجر و قره یونجه تحت شرایط یکسان داده است و در گروه a قرار گرفته و ارقام یعنی رنجر و قره یونجه به ترتیب در گروههای پایین b و c قرار می گیرند سپس اگر هدف نگهداری خصوصیات برتر رقم سنتتیک از طریق تولید بذر مصنوعی باشد. محیط B5 و مقادیر هورمونی بالا توصیه می شود (نمودار J و K)

بحث و نتیجه گیری و پیشنهادات:

در خصوص کالزایی ریزنمونه بذری و رقم قره یونجه بیشترین رشد کالوسها را دارا بودند. در مورد جنین زایی محیط کشت MS با سطح هورمونی حاوی 3 میلی گرم در لیتر 2-4-D و 1/1 میلی گرم در لیتر kin و رقم سنتتیک بیشترین درصد جنین زایی را دارا بود.

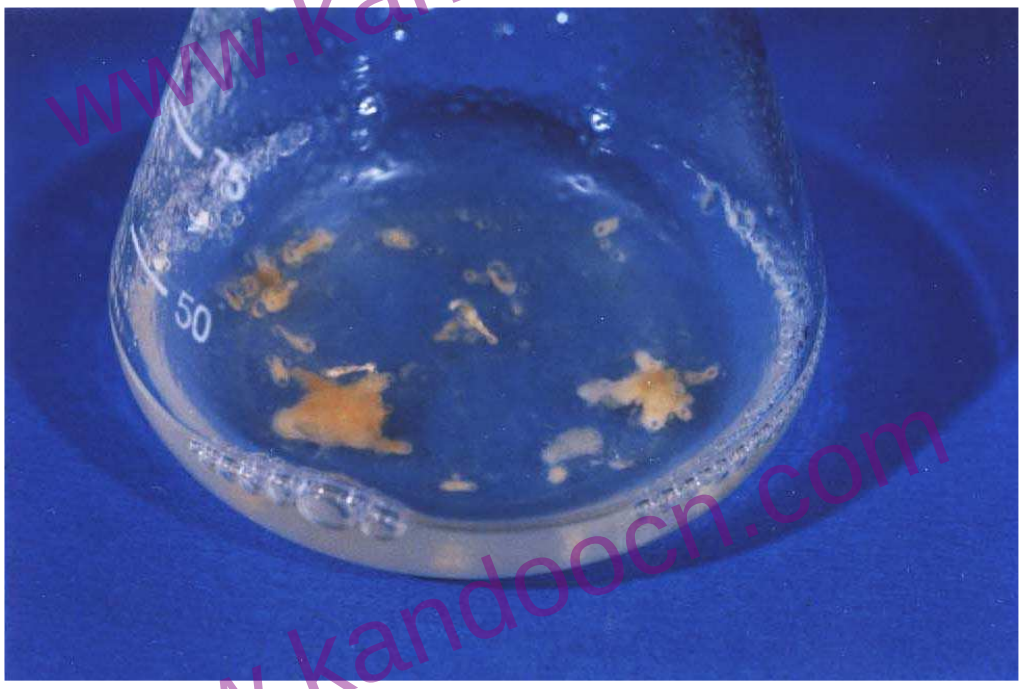
www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

برای تولید بذر مصنوعی نیز از کالوسهای جنین زا در محیط کشت سوسپانسیون رقم سنتتیک و محیط B5 و مقدار هورمونی 1 میلی گرم در لیتر 2-4-D به همراه 0/2 میلی گرم در لیتر Kin توصیه می شود.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید



شکل 15: نمونه ای از کشت سوسپانسیون

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 16: نمونه ای از کالوس جنین زا در کشت سوسپانسیون

شکل17: جوانه زنی جنین در محیط سوسپانسیون

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 18: ایجاد شاخه در محیط کشت سوسپانسیون

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

شکل 18: نمونه ای از مراحل تکاملی جنین در محیط سوسپانسیون

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

منابع:

1- امیدی، م (1379). بررسی کشت بافت، تنوع سیتوژنتیکی و پروتئینی جو. رساله دکتری تخصصی اصلاح نباتات (ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک) دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

2- باقری. ع (1376) مبانی کشت بافتهای گیاهی. دانشگاه فردوسی مشهد 406 صفحه

3- تورز. کا.سی (1373) فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی خوشخوی. م(مترجم) چاپ اول مرکز نشر دانشگاه شیراز صفحه (1-103)

4- عبدمیشانی. س و ع. الف. ش. بوشهری (1377) اصلاح نباتات تکمیلی (جلد اول) بیوتکنولوژی گیاهی.

5- فاضل زاده.ع. (1382) بررسی تأثیر تیمارهای دمایی بر باززایی کالوس در کشت جنین نارس جو. پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

6- کوچکی،ع،مترجم. (1373) زراعت در مناطق خشک. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. 202 صفحه

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

7- مطلبی آذر. ع و ع. جعفری مفیدآبادی (1379) بررسی میزان کالزایی، جنین زایی سوماتیکی و باززلیی گیاه در جمعیتهای یونجه ایرانی با استفاده از چهار روش رایج، دانش کشاورزی جلد 1 شماره 2 صفحات 13-1.

8- مهرابی.ع.1. (1381) بررسی کال زایی و باززایی در کلزا و امکان ارزیابی مقاومت به شوری در این گیاه با استفاده از تکنیک کشت بافت. پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

9- نوری قنبلانی، ق. مترجم (1371) تجربیاتی در کشت بافتهای گیاهی، انتشارات دانشگاه تبریز. شماره 323. 411 صفحه

10- ولیزاده، م و کامیا. ت. 1372. بررسی کال زایی، رشد کال و پروتئین کال در گونه های یونجه (Medicaago) اولین کنگره علوم زراعی ایران. مشهد.

11-Agrawal. L.R, (1998) Fundamenteds of plant breeding in hybrid seeds.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

12-Alexander I.K, Debchev P.D, Attanassov A.I. & Scrag A.H (1994) Alfalfa embryo production in airlift vessels via Domatic embryigenetsis, Plant cell, Tissue and Organ cutture 38:19-23

13-Allen, S.G., A.K. Dobrenz, and P.G. Bartels. 1986. Physiological response of Salt-tolerant and non tolerant alfalfa to salinity during germination. Crop Scince 26:1004-1008

14-Al-Niemi, T.S. W.F. camphell, and M.D. Rumbaugh. 1992. Response of alfalfa cultivars to salinity during germination and post germination growth. Crop Scince 32:976-980

15-Arcyones, Davey.M.R, Santos. A.V. P and Cockyng. E. (1982) Somatic embryogenesis in tissue from mesophyl and cell suspension protoplast of *Medicage caerulea* and M.glytirosa. Plant Physiology: 3:105-110

16-Atanassov, A. and D. C. W. Brown (1984) Plant regeneration *Medicage sativa* L. plant cell tissue and organ culture 3:149-162

17-Ayaydin F, Vissi E, Meszaros T, Miskolczi P, Kovacs Y, Feher A, Dombradi V, Erdodi F, Gergely P

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

and Dudits D(2000). Inhibitation of serin / threonine specific protein phosphat ases causes premature activation of cdc2 MSF Kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule Organisation in aifaalfa. Plant J. 23:85-86

18-Bhoywani. S.S. and M. K. Razdan. (1990.) Plant tissue culture: Theory and Practice, Elsever.

19-Binarova.P., Nedelnik.J, Fellner. M and NedbaLkova .B . (1990) Selection for resistance to filtrates of *Fasarium SPP*. In embryogenic cell suspension culture of *Medicage Sativa* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 22:191-196

20-Bingham E.T, Hurley L.V, Kaatz D.M and Sanders JW (1975) Breeding Alfaifa wich Regenerates from Callus Tissue in culture Crop SCi 15:719-721

21-Bingham E.T., McCoy T.J. and Walker K.A. (1988), Alfalfa tissue culture. pp.903-929. In Alfalfa and alfalfa improvements. Eds., Hanson, A.A. Madison , Wisconsis, USA.

23-Boger. L., Calderini. O, Binarova. P, Mattauch. M, Till. S, Kiegerl. S, Jonak. C., Barker. P, Huskisson. N. S etal (1999). A MAP Kinase is activated late in plant

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

mitosis and become localized to the plane of cell division. Plant Cell 11:101-113

24-Brown. DCW, Frost L.A. and Koehl. E. M. (1983) The effect of germplasm source in the invitro embryogenesis is response of cultivated alfalfa. The Genetis Soc. 14: Abstr, NO. D5

25-Brown. D. C. W. (1988) Germplasm Determination of Invitro somatic Embryogenesis in Alfalfa. HORTSCIENCE: 26-28

26-Brown. D. C. W., Nagarajon. P and Walton. P. D. (1989). Embryogenic Invitro responses in creeping and noncreeping rooted selection from M. Sativa. J. Genet. & Breed. 43: 73-76

27-Carneiro J.P.B.G., Varennes.A, Serrao. M.G, Vaz. F, Pires F.P, Oliveria. A and Sousa M.I.M.T (1997) Productividade das luzernas anuais em alguns solos de portugal. Past. Forr. 18: 35-47

28-cloutier. S. and Londry B.S. (1994) Molecular markers applied to plant tissue culture. Invitro Cell & Develop Biol. Plant. 30:32-39

29-Compton. M.E and Veillex. R. E. (1991) Variation for genetic recombination among tomato plants

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

regenerated from three tissue culture systems. Genome. 34: 810-817

30-Compton, M. E. (1994). Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 367:242-317

31-Crawford EJ, Lake AWH & Boyce KG (1989) Breeding annual Medicages species for Semiarid conditions in solution Australia. Agr. 42:399-437

32-Crea, F., M. Bellucci, F. Damianic, and S. Arcioni. (1995). Genetic Control of somatic embryo genesis in alfalfa (*Medicago Sativa* L. cv. Adriana). Euphytica 81: 151-155

33-Croughan T.P., Chu O.R., (1991). Rice (Oryza sativa L.): Establishment of callus cultures and Regeneration of Plants. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 14, Ric (ed. By Y.P.S. Bajaj): 19-36

34-das Naves LO, Duque SRL, de Almeida Js, Fevereiro PS (1999) Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula spp*. Narboneniss and *M. truncatula* Gaerth CV. Yem along. Plant Cell Rep 18:398-405

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

35-Davletova S, Mesiaros T, Miskolczi P, Oberschall A, Torok K, Magyar Z, DuditsD, Deak M (2001) Auxin and heat Shoke activation of a novel member of the calmadolin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cell. J EXP Bot 52: 215-221

36-Dencher PD, Velcheva M, Dragijska R, Kulklin AI & Attanassov AI (1990) Someatic embryogenesis in Medicago. Bioteknol. Biotekh. 52:66-70

37-Dencher PD, Velcheva M and Attanassov (1991) A new approach to direct someatic embryogenesis in Medicago 10:338-341

38-Dencher PD.et al., (1993). Kinetic studies of embryo development and nutrient utilization in an alfalfa somatic embryogenesis system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33:67-73

39-Dijak M & BROW DCW (1987) Patterns of direct and indirect embryogenesis from mesophyll protoplast of *Medicago sativa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 9:121-130.

40-Dixon R.A (1994). Isolation and maintenance of callus and cell suspension culture. PP. 1-20. In: Plant Cell Culture a practical approach. Eds., Dixon, R.A

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

and R.A. Gonzales. Second edition, Oxford University Press.

41-Dole J and Binrova P (1989) The effects of colchcine on ploidy level, morphology and embryogenic capacity of alfalfa suspension culture. Plant Sci. 64: 213-219.

42-Dudits D, Bogre L, Gyorgyey J (1991) Molecular and Cellular approaches to the analogs of plant embryo development from somatic cells invitro. J Cell Sci. 99:475-487.

43-Dudits D, Gyorgyey J, Bogre L and Boka L (1995) Molecular biology of somatic embryogenesis In TA Thorp, Invitro embryogenesis in plants. Kluwer Academic publishes, Netherland 6:267-308

44-Dung T.N, Buivanle A and Van T.T (2000) Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration pf rice (*Oryza sativa L.*) using thin cell layer culture of aplical meristemic tissue. Jornal of Plant Physiology 157. P: 559-565

45-Feher A, Pasternak T, Dudits D (2002) Activation of embryogenic cell division in leaf protoplastderived alfalfa cells: The role of auxin and stress. Plant

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

Physiology.

46:13-14 .www.sci-u-szeged hu/ABS.

46-Finer J.J., 1996. Plant regeneration Via Embryogenicf Suspension cultures. Plant Cell Culture. (ed. R.A. Dixon and R.A. Gonzales) 6:99-125

47-Fintad k, Brown DCW & Joy k (1993) Charactrization of compentence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 34:125-132

48-Frankin C.J., Dixon R.A., (1996). Initiation and maintenance of callus and cell suspension cultures. Plant cell culture: (ed. R.A. Dixion and R.A. Gonzales): 1-25

49-Gallego N, Hita O , Villalobos N, Dorado A, Martin L & Guerra H (2000) Somatic emkbryogenesis and plant regeneration in *Medicage arbora.L*- Invitro Plant Physiol.

50-Groose.R.W and E.T.Bingham (1984). Variation in plants regenerated from tissue culture of tetraploid alfalfa heterozygous several traits. Crop Science 24: 655-658

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

51-Gupta, P.K. (1998.) Genetics and biotechnology in evo p improvement, Rakesh kumar RastoGi. India.

52-Hicks, G.S., (1994). Shoot induction and organegenesis invitro: A development perspective. In Vitro Cell Dev. Biol. 30P:10-15

53-Iantchera A, Vlahova M, Bakalova E, kondorosi E, Elliott MC, Attanassov A (1999) Regeration of diploid annual medics via direct somatic embryygenesis promoted by thidiazuran and benzylaminopurine. Plant Cell Rep 18:904-910

54-Iantcheva A, Viahova M, Trinh TH, Brown SC, Slater A, Elliot MC, Attanassov A (2001) Assement of polysomaty, embryo formation and regeneration in liquid media for various species of diploid annual Medicago. Plant Sci 160:621-627

55-Iigo Winicov and Dhundy R.B (1999) Transgenic Overexpression of the Transcription Factor Alfin1 Enhances Expression of the Endogenous MSPRP2 Gene in Alfalfa and Improves Salinity Tolerance of the Plants. Plant Physiol 120: 473-480

56-Ivanova A, Velcheva M, Dencher P, Attanassor A Van Onckelen H (1994) Endogenous hormone levels

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

during direrct somatic embryogenesis in *Medicage Falcata*. Plant Physiol 92:80-85

57-Jimenez VM, Bangerth F (2001) Endogenous hormone level in explants and in embryogenic and none-embryogenic cultures of carrot Plant Physiol 111:389-395

58-Kalidas S and Bryan DMCK (1993) Proline, thioproline and postassium mediated stimulation of somatic embryogesis in alfalfa (Medicago sativa L.) Plant Sci 88:185-193

59-Kau.K.N and Mychayluk.M.R.(1981). Embryoid formation in alfalfa cell suspension culture from different plants. Invitro vol 17., No 7, 645-648.

60-Kielly, G.A., S.R. Bowley. (1992). Genetic control of somatic embryogenexis in alfalfa. Genome 35:474-477.

61-Kuklin A.I., Denchev P.D, Attanassov A & Scragg A.H (1994) Alfalfa embryo production in airlift vessels via diroct embryogerios Plant Cell Tissue and Orgon Culture 38:19-23

62-Kumer de, K, 1997, Plant tissue culture, New Central book, Ayency, LTD, India.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

63-Lai, F.M. and B.D. Mckerie. (1993). Effect of nutrition on maturation of alfalfa (*Medicage sativa L.*) Somatic embryos. Plant Science 91:81-95

64-Lai, F.M. and B.D. Mckersie. 1994. Scale-up of somatic embryogenesic in alfalfa (*Medicago sativa L.*) I. Subculture and indirect Secondary somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37:131-158

65-Lee M and R.L. Phillips (1987) Genetic variation in progeny of regenerated maiz plants. Genome 29:834-835.

66-Levee V, Bertrand M, Duval M, Bilodeau P, Aquins S, Vezina L.R. (2001) An efficient system for protoplast culture from alfalfa (*Medicages sativa L.*) suitable for plant transformation and regeneration www.medicago.com

67-Lupotto E. (1983). Propagation of an embrygogenic culture of Medicage sativa 1:95-104

68-Marie H, Milena C, Josef E, Jerzy z and Ivana.M (2000) Effect of inhibitation of phenylpropanoid biosynthesis peroxidase and IAA-Oxidas activities

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

and auxin contention alfalfa supension culture. Plant Physiol 38:949-956

69-Mejer GME & Brown DCW (1987) Role of exogenous reduced nitrogen and sucarose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 10:11-19

70- McElroy. A.R. and D.C.W. Brown. (1992). A transplant Plug technique for production of alfalfa a (*Medicaye sativa L.*) Plant from somatic embryos. Can. Y. Plant Sci. 72:483-485

71- Mckersie BD, Senaratna T, Bowley SR, Brown DCW, krochko A & Bewley YD (1989) Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicagor Sativa L.*). Invitro Cell. Devel Biol. 25: 1183-1188

72- Mckersie BD & Bowley SR (1993) Synthetic seeds of alfalfa: Application of sybthetic seeds to Crop improvement. 9:231-255

73- Mitten. D.H, Sato. S.J, Skokut TA (1984) Invitro regenerative potential of alfalfa a germplasm sources. Crop Sci. 24:943-945

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

74- Nagarajan, P. and P.D. Walton (1987) A comparison of somatic chromosomal instability in tissue culture regenerates from *Medicago Media*. Pers Plant Cell Reports: 109-113

75- Neves L.O, Duquas SRL, Almedia JS & Feverioro MP. 1999. Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago trancatula spp. Naborasis* and *M. trauncatula spp.yemalong*.

76- Neves.L.O. and et al (2001) Micropropagation of Medicago trancatual. spp. Jemalong and *Medicago truncatual. spp. Narbonensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 67:81-84

77- Nolon k, Rose Ry and Gorst JE (1989) Regeneration of *Medicago trancatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis from regenerated plant. Plant Cell Rep 8:278-281

78- Nolon K, Rose RY (1998) Plant regeneration from cultured *Medicago truncatula* with particular

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

reference to absisc acid and light treatment. ASU J Bot 46:151-160

79- Nomura K, Komamine A (1995) Physiological and s biological aspects of somatic embryogenesis. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands, PP 249-266

80- Novak.F.J. and et al. (1984). Invitro, somatic embryogenesis – A new selection system in alfalfa: In proceeding of the *M.sative*: cultured In vitro. American Jornal Bot: 65 (6): 654-659

81- Pasternak.T.P, Prinsen.E, Ayaydin.F, Miskolczip, Potter, G, Asard H, Onckelen H.A. embryogenic all devision in lefa proplast derived cell of alfalfa. Plant Physiol 129:1807-1819

82- Pasternak. T.P, Prinsen E, Ayadlin F, Miskozip, Potters G, Asard H, Van Oncken H.A, Dudits D & Feher A. (2002) The Role of Auxin, PH and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derivied Cell of Alfalfa. Plant Physiol. 129: 1807-1819

83- Philips G.C, liubstenberger J.F., Itan sen.E.E. (1995) Plant Regeneration from Callus and Cell

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

Suspension Culture by Somatic Embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture. (ed.o.y , Gemborg G.C. Philips) 9:81-102

84- Raxdan, M,K (1999), An interoduction to plant tissue culture, Oxford of IBH Pubhishnyco.

85. Ray. Y. M and Bingham .E.T. (1989). Breeding diploid alfalfa for regeneration from tissue culture, Crop Science 29:1545-1548.

86. Reish, B.(1982). Variability among plants from ethionine resistant alfalfa tissue cultures. 5th intl. cang. plant tissue and cell culture.

87. Rose RY, Nolan KE, Bicego L (1999) the development of the highly regenerable seed line jemalong 2HA for transformation of medicage. Trancatula implications for regenerability via somatic emryogenesis J plant physiol 165: 788-791

88.Santos. D & Feverio. P. (2002) Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago trancatula*. Plant Cell, tissue and Organ Culture 70: 155-161.

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

89. Saunders. Y. W. and Bingham. E. T. (1972). Production of alfalfa plants from callus tissue. Crop Science. 12: 804-805

90. Schafer Y (1985) Regeeration in alfalfa tissue culture. Plant Physiol. 79: 584-589

91. Shah, S.H., W. Wright and M. Y. Merret. (1993) Cation Cotolerance in Callus Cultures of *Medicago Sativa L*. tolerant to sodium chloride. Plant Science. 9:84-88

92. Shetty K & Mckersie BD (1993) Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicagr sativa L*.) Plant Sci. 88: 185-193

93. Skokut. T. S., J. Manchester and J. Schuefer. (1985). Regeneration in alfalfa tissue culture: Stimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15NMR determination of nitrogen utilization. Plant physiol 79: 579-583

94. Song Y, Sorensen EL, Liang GH (1990) Direct embryogenesis from single mesophyll protoplast in alfalfa (*Midicago sativa L*.) Plant Cell Rep 9: 21-25

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

95. Stavarek S.J., T. P.Croughanande, D. W. Rains (1980) Regeneration of Plants from long term cultures of Alfalfa cells. Plant Sci. 19: 253-261

96. Taji. A, P. Kumar & P. Lakshmanan (2001) Invitro Plant Breeding. An imprint of Haworth Press Inc. New York. London. Oxford.

97. Trieu. A, Harrison, M (1996). Rapid Transformation of *Medicago truncatula*: Reneration via shoot organization: Plant Cell Reports 16: 6-11

98. Torres, K, C (1994) Tissue culture techniques for horticultural crops.

99. Walker. K. A and Sato. S. Y (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago Sativa*, the role of ammonium ion in somatic embryo genesis. Plant Cell, Tissue, Organ Culture. 1: 109-121

100. Wan. Y, Sorenson. E. L and Liang. G. H (1988) The effect of kinetin on callus characters in alfalfa (*Medicago sativa*) Euphytica 30: 249-254

101. Wanoy A, Sorenson. E. L. and Liang. G. H (1988) Genetic control of invitro regeneration in alfalfa (*Medicago sativa*). Euphytica 39: 3-9

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

102. Wenzel. G. L. and Brown. D. C. W (1991) Histological events leading to somatic embryo formation in cultured petioles of alfalfa. Invitro Cell. 27: 190-196

103. Yolanda C, Guerra H, Martin A.B, Gallego P, Hita O, Dorado A & Villalobs N. (2001) Differences in invertase activity in embryogenic and non-embryogenic cali from *Medicago arborea*. Plant Cell Tissue and Organ culture 67:145-151

104. Zimmeman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell 5: 1411-1423

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

www.kandoocn.com

جداول پیوست

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 3- تجزیه واریانس داده های مربوط به رشد کالوس در محیط ها، ارقام یونجه و ریزنمو نه های مختلف

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
هورمون	2	0/797	1/0249$^{n.s}$
ریزنمونه	2	8/499	10/9265**
ریزنمونه× هورمون	6	3/057	3/9298**
رقم	2	11/304	14/5311**
هورمون×رقم	6	0/980	1/2601$^{n.s}$
ریزنمونه×رقم	4	2/707	2/48*
هورمون×ریزنمونه×رقم	12	1/192	1/5324$^{n.s}$
خطا	36	0/778	

** به ترتیب معنی دار درسطوح احتمال 5 و 1 درصد

ns اختلاف غیرمعنی دار

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 4-مقایسه میانگین بین ریزنمونه ازلحاظ رشدکال درسطح احتمال 5٪

ریزنمونه	میانگین	
بذر	18/1	a
هیپوکوتیل	15/39	b
برگ	15/01	b

S_X=0/18

LSD = 0/5164

جدول 5- مقایسه بین ارقام یونجه از لحاظ رشد کالوس در سطح احتمال 5٪

ریزنمونه	میانگین	
رقم یونجه	16/27	a
سنتتیک	15/37	b
یونجه	14/93	b

S_X=0/18

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

LSD = 0/5164

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 6- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری سطوح هورمونی و ریزنمونه از لحاظ رشد کالوس (P<٪5) از طریق آزمون دانکن

	میانگین	
سطوح هورمونی 2 × بذر	17/39	a
سطوح هورمونی 4 × بذر	16/44	ab
سطوح هورمونی 3 × بذر	16	bc
سطوح هورمونی 1 × بذر	15/77	bcd
سطوح هورمونی 1 × هیپوکوتیل	15/22	cd
سطوح هورمونی 4 × بذر	15/22	cd
سطوح هورمونی 4 × هیپوکوتیل	15/22	cd
سطوح هورمونی 3 × بذر	15/11	cd
سطوح هورمونی 4 × بذر	15/1	cd
سطوح هورمونی 1 × برگ	15/05	cd
سطوح هورمونی 3 × برگ	15	cd

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

سطوح هورمونی 3 × برگ	14/77	d

جدول 8-تجزیه واریانس جنین زایی:

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
محیط	1	3/204	13/9371**
هورمون	11	0/970	4/2190**
محیط × هورمون	11	0/227	1/0304$^{n.s}$
رقم	2	0/305	n.s
			27/4307**
محیط×رقم	2	0/121	0/5259$^{n.s}$
هورمون×رقم	22	0/198	0/8594$^{n.s}$
محیط×هورمون×رقم	22	0/14	0/6104$^{n.s}$
خطا	72	0/23	

** به ترتیب معنی دارد در سطح احتمال 1 و 5 درصد

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

n.s اختلاف غیرمعنی دار

جدول 9-مقایسه میانگین بین محیطهای کشت B5 و MS در جنین زایی

محیط	میانگین	
B5	46.43	a
Ms	46.04	b

S_X=0/05652

LSD = 0/5193

جدول 10-مقایسه سطوح هورمونی در جنین زایی در سطح احتمال 5٪

محیط	میانگین درصد جنین زایی	
محیط هورمونی 1	17/39	a
محیط هورمونی 2	16/44	ab
محیط هورمونی 3	16	bc
محیط هورمونی 4	15/77	bcd
محیط هورمونی 5	15/22	cd

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

محیط هورمونی 6	15/22	cd
محیط هورمونی 7	15/22	cd
محیط هورمونی 8	15/11	cd
محیط هورمونی 9	15/1	cd
محیط هورمونی 10	15/05	cd
محیط هورمونی 11	15	cd
محیط هورمونی 12	14/77	d

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 11-مقایسه میانگین جنین زایی در ارقام یونجه

رقم	میانگین درصد جنین زایی	
سنتتیک	46/5	a
قره یونجه	46/26	b
رنجر	45/79	c

S_X=0/06922

LSD = 0/1951

جدول 12- جدول تجزیه واریانس باززایی در ارقام یونجه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین باززایی	F
رقم	2	1/635	33/6429*
ریزنمونه	2	1/385	28/5000*
رقم×ریزنمونه	4	0/036	0/7500$^{n.s}$
خطا	9	0/049	

** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد

n.s اختلاف غیرمعنی دار

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 13- مقایسه میانگین بین ارقام از لحاظ باززایی در سطح احتمال 5٪

رقم	میانگین درصد جنین زایی	
سنتتیک	3/042	a
قره یونجه	2/454	b
رنجر	2	c

S_X=0/09037

LSD = 0/2891

جدول 14- مقایسه میانگین ریزنمونه از لحاظ باززایی در سطح احتمال 5٪

ریزنمونه	میانگین	
برگ	3/042	a

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

بذر	2/333	b
هیپوکوتیل	2/125	b

S_X=0/09037

LSD = 0/2891

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول15-جدول تجزیه واریانس تولید گیاهچه درمحیط کشت بافت درارقام یونجه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
رقم	2	2059/422	11/4403*
ریزنمونه	2	397/088	2/2059$^{n.s}$
رقم×ریزنمونه	4	431/118	2/3949$^{n.s}$

جدول 16- جدول مقایسه میانگین ارقام از لحاظ تولید گیاهچه

ارقام	میانگین	
سنتتیک	94/26	a
قره یونجه	66/04	b
رنجر	59/35	c

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

S_X=5/477

LSD = 17/56

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

جدول 17- جدول تحزیه واریانس جنین زایی در سه رقم یونجه در محیط کشت سوسپانسیون

منابع تغییر	df	MS	F
ارقام	2	851/677	37/852
خطا	12	22/5	

جدول 18- جدول مقایسه میانگین ارقام از لحاظ جنین زایی در محیط کشت سوسپانسیون

ارقام	میانگین	
سنتتیک	49	a
رنجر	34	b
قره یونجه	23	c

S_X=2/121

www.kandoocn.com

جهت خرید فایل به سایت www.kandoocn.com مراجعه نمایید یا با شماره های ۰۹۳۶۶۰۲۷۴۱۷ و ۰۹۳۰۳۵۲۲۸۸۶ تماس حاصل نمایید

LSD = 6/536

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

www.kandoocn.com

cn.com