Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Investigation of some effective factors in the *Invitro* soybean regeneration (*Glycine max* L.)

Sharif Biabani

M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Maku Azad University, Maku, Iran. Email: sharifbiabani@gmail.com

Rustam Aghazadeh Golaki

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Maku, Iran. Email: Agazadeh.rustam@iaumaku.ac.ir

Ebrahim Dorani

Associate Professor, Department of Breeding and Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email: uliaie@tabrizu.ac.ir

Abstract

Objective

Soybean (*Glycine max* L.) is one of the most important agricultural products that is of special importance not only because of its capacity in oil production but also because of its role in human and animal nutrition. One of the effective methods in overcoming the breeding problems of this crop is the use of *in vitro* culture techniques and molecular methods. The use of plant tissue culture techniques is one of the effective methods in overcoming the breeding problems of this crop. Tissue culture and plant regeneration in the handling process depend on several factors. The aim of this study was to optimize the effective factors such as genotype, type of micro sample, type of gelling agent and combination of growth regulators in soybean regeneration.

Materials and methods

After germination and seedling growth of Saman and DPX cultivars in culture medium, hypocotyl and cotyledon micro samples in culture medium containing BAP hormone treatments (0, 1 and 2 mg/l) And IBA (0, 0.1 and 0.5 mg/l) were cultured. Subsequently, the samples were recovered in culture media containing IBA (0, 0.5, 1 and 1.5 mg/l) with agar (5, 6 and 7 g) or gellate (2 and 3 g) were cultured. Separately, the effect of growth regulators on soybean cultivars was performed

as a CRD-based factorial experiment, the effect of gelling agents on organogenesis and rooting experiment of cultivars was performed in a completely randomized design with three replications and each replicate containing six samples.

Results

The results of this study showed that in the cotyledon sample of Saman cultivar under hormonal treatment of 2 µg/l BAP and 0.1 µg/l IBA, the highest rate of organogenesis and number of regenerated branches were observed. Also, the presence of 7 g of agar in the culture medium showed the highest rate of organogenesis and the number of regenerated branches. In addition, a concentration of 1.5 micrograms per liter of IBA induced the highest rooting rate.

Conclusions

Saman cultivar showed better results in regeneration and rooting than DPX cultivar. Findings of this study can be used for gene transfer and genetic engineering studies for Saman cultivar and other soybean cultivars.

Keywords: DPX, Regeneration, *Invitro* culture, Saman Cultivar, Soybean

Paper Type: Research Paper.

Citation: Biabani Sh, Aghazadeh Golaki R, Dorani E (2021) Investigation of some effective factors in the *Invitro* soybean regeneration (*Glycine max* L.). *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 121-138.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (4), 121-138. DOI: 10.22103/jab.2021.17917.1327

Received: October 1, 2021. Accepted: October 30, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بررسی برخی عوامل موثر در باززایی درون شیشه‌ای سویا (*Glycine max* L.)

شریف بیابانی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد ماکو، ماکو، ایران. ایمیل: sharifbiabani@gmail.com

رستم آقازاده قولکی

*نویسنده مسئول: استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران. ایمیل: Agazadeh.rustam@iaumaku.ac.ir

ابراهیم دورانی

دانشیار گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. ایمیل: uliaie@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۸

چکیده

هدف: سویا (*Glycine max* L.) یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است که نه تنها به دلیل ظرفیتش در تولید روغن بلکه به دلیل نقش آن در تغذیه انسان و دام دارای اهمیت ویژه‌ای است. یکی از روش‌های کارآمد در غلبه بر مشکلات اصلاحی این گیاه زراعی، استفاده از تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای و روش‌های مولکولی است. با توجه به اهمیت کشت بافت و باززایی گیاه در روند مهندسی ژنتیک گیاهی، کارایی موفقیت در این رابطه به عوامل متعددی ازجمله گونه و ژنوتیپ گیاهی، نوع ریز نمونه، غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و غیره بستگی دارد.

مواد و روش‌ها: پس از جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های ارقام سامان و DPX در محیط کشت، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون در محیط کشت‌های حاوی تیمارهای هورمون BAP (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و IBA (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر) واکشت شدند. پس از آن، نمونه‌های به دست آمده مجددا در محیط‌های کشت حاوی هورمون IBA (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر) به همراه آگار (۵، ۶ و ۷ گرم) یا ژلرایت (۲ و ۳ گرم) کشت شدند. بطور جداگانه، مطالعه اثر تنظیم کننده‌های رشدی بر ارقام سو.یا بصورت آزمایش فاکتوریل، ازمایش اثر مواد ژله کننده بر اندام‌زایی و آزمایش ریشه‌زایی ارقام در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و هر تکرا ر شامل شش ریزنمونه اجرا گردید.

نتایج: نتایج این پژوهش نشـــان داد که در ریزنمونه کوتیلدون رقم ســـامان تحت تیمار هورمونی۲ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۱ میکروگرم در لیتر IBA بیشترین میزان اندام‌زایی و تعداد شاخه‌های باززایی شده، مشاهده شد. همچنین، وجود ۷ گرم آگار در محیط کشت بیشترین میزان اندام‌زایی و تعداد شاخه‌های باززایی شده را نشان داده است. علاوه بر این، غلظت ۱/۵ میکروگرم در هر لیتر از هورمون IBA بالاترین میزان ریشه‌زایی را القا کرد.

نتیجه‌گیری: رقم بومی سامان نسبت به رقم DPX در شرایط کشت بافت گیاهی عملکرد و نتایج بهتری در باززایی و ریشه‌زایی نشان داد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند برای انجام مطالعات انتقال ژن و مهندسی ژنتیک برای رقم سامان و سایر ارقام سویا استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: باززایی ،رقم سامان، سویا، کشت درون شیشه، DPX

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: بیابانی شریف، آقازاده قولکی رستم، دورانی ابراهیم (۱۴۰۰) بررسی برخی عوامل موثر در باززایی درون شیشه‌ای سویا (*Glycine max* L.). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۴)، ۱۲۱-۱۳۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

مسئله گرسنگی از ابتدای ظهور بشر وجود داشته و شکی نیست که علت اصلی مهاجرت‌ها، دسترسی به منابع غذایی بوده است. رشد جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه در ۵۰ سال آینده در حالی اتفاق می‌افتد که در حال حاضر در برخی نقاط جهان سوء تغذیه پدیده‌ای شایع بوده و بالغ بر ۸۰۰ میلیون نفر از مردم دنیا روزانه با گرسنگی و بی غذایی روبرو هستند. از طرفی ۴۰ درصد از زمین‌های دنیا که در حال حاضر برای کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند، با تخریب جدی روبرو هستند (Godfray et al. 2010). مطالعات نشان می‌دهند که تولیدات غذایی جهان تا سال ۲۰۲۵ باید دو برابر شود تا نیازهای جمعیت رو به رشد در حد فعلی رفع گردد. محدودیت‌های اقلیمی مانعی برای رشد و توسعه زمین‌های کشت است. بیوتکنولوژی مدرن، فناوری نوینی است که می‌تواند با تغییر ساختار ژنتیکی محصولات زراعی و سایر گیاهان، عملکرد آن‌ها را در واحد سطح افزایش دهد و از طرفی امکان توسعه کشت آن‌ها را در زمین‌های شور، خشک یا اقلیم‌هایی با تنش‌های غیر زیستی مانند سرما، گرما و تنش‌های زیستی مانند آفت‌ها و بیماری‌ها فراهم آورد و از این رهگذر موجب افزایش عملکرد در واحد سطح شود (Verma et al. 2014).

سویا یکی از مهمترین محصولات کشاورزی است که نه تنها به دلیل ظرفیتش در تولید روغن بلکه به دلیل نقش آن در تغذیه انسان و دام دارای اهمیت ویژه‌ای است. به دلیل حساسیت بالای این گیاه به تنش‌های محیطی به ویژه شوری و خشکی، تلاش‌های زیادی در جهت افزایش مقاومت آن در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی صورت گرفته است، اما اصلاح سویا با روش‌های سنتی با توجه به خودلقاح بودن این گیاه و تنوع ژنتیکی کم واریته‌های آن، مشکل آفرین است. بنابراین اصلاح سویا از طریق مهندسی ژنتیک یکی از روش‌های کارآمد در غلبه بر مشکلات اصلاح این گیاه می‌تواند باشد (Raza et al. 2017). مهندسی ژنتیک گیاهی شامل روش‌های مدرن کشت بافت و زیست شناسی سلولی و مولکولی برای اصلاح نباتات است (Mohammadhassan et al. 2014). با توجه به اهمیت کشت بافت و باززایی گیاه در روند مهندسی ژنتیک گیاهی، کارایی موفقیت در این رابطه به عوامل متعددی از جمله گونه و ژنوتیپ گیاهی، نوع ریزنمونه، غلظت و نوع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و غیره بستگی دارد (Verma et al. 2014).

فناوری کشت بافت در کنار روش‌های سنتی اصلاح گیاهان، پتانسیل خوبی در زمینه اصلاح نباتات و تکثیر کلونال ارائه می‌دهد. دانشمندان در سراسر جهان به دنبال بکارگیری روش‌های درون شیشه‌ای در اصلاح گیاهان اقتصادی مهم برای تولید غذا، فیبر و سوخت هستند (Vargas et al. 2008). با افزایش جمعیت جهان و از دست دادن مداوم زمین‌های کشاورزی به خاطر مسکن و صنعت، استفاده از فناوری‌های جدید از قبیل کشت بافت برای مقابله با محدودیت‌های تولید از قبیل تنش‌های زیستی و غیرزیستی الزامی است (Hazell and Wood 2008). موفقیت در بسیاری از روش‌های درون شیشه‌ای در گیاهان عالی به موفقیت در باززایی گیاه از بافت و سلول منفرد بستگی دارد. دسترسی به یک روش کشت بافت تکرارپذیر، مهمترین عامل موفقیت در دست‌ورزی ژنتیکی گیاهان به حساب می‌آید. هرچند دستورزی ژنتیکی گیاهان ابزار قدرتمندی است که به طور گسترده در بهبود محصول و مطالعات بیولوژی مولکولی گیاهان استفاده می‌شود. ولی هنوز کارایی انتقال ژن به سویا در مقایسه با سایر دو لپه‌ای‌ها پیشرفت آنچنانی نداشته است (Mello-Farias and Chaves 2008).

به طور کلی موفقیت انتقال ژن متأثر از چندین عامل متفاوت از جمله کشت بافت و محیط باززایی می‌باشد (Li et al. 2017) .دستیابی به یک روش کشت بافت تکرارپذیر و ژنوتیپ‌های پاسخ دهنده به کشت بافت اولین قدم در مهندسی ژنتیک یک گیاه می‌باشد. کارایی موفقیت در این رابطه به عوامل متعددی از جمله گونه و ژنوتیپ گیاهی، نوع ریزنمونه، غلظت و نوع تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، مواد ژله‌کننده و غیره بستگی دارد (Verma et al. 2014).

گزارشات متعدد بر این نکته تأکید دارند که باززایی در سویا وابسته به ژنوتیپ است، حتی نوع، کیفیت و منبع ریزنمونه نیز در کارایی باززایی مؤثر می‌باشند (Soto et al. 2013). درسال‌های اخیر ریزنمونه‌های مختلف سویا برای باززایی مورد استفاده قرار گرفته است به طوریکه بیشترین کارایی باززایی سویا، از ریزنمونه‌های کوتیلدون و یا هیپوکوتیلدون گزارش شده است (Phat et al. 2015). در مطالعه ای Raza et al. (2017) باززایی نه ژنوتیپ مختلف سویا را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد بین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر پاسخ به باززایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در تحقیقات مربوط به سویا، بیشترین میزان باززایی

از ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ LS677 در محیط MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش شده است (Mangena et al. 2015). در مطالعه‌ای دیگر از بین دو ژنوتیپ کره‌ای سویا، ژنوتیپ Nampung بالاترین میزان باززایی را در محیط کشت B5 غنی شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر BAPو ۰/۱۷ میلی‌گرم در لیتر GA3 داشته است (Phat et al. 2015). تأثیر کینتین در شاخه زایی در محیط MS همراه با BAP مطالعه شده و معلوم گردیده ترکیب این دو هورمون مؤثرتر از تک تک آنها در ریز نمونه کوتیلدون سویا می‌باشد. به‌طوریکه بیشترین میزان باززایی در ترکیب ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر KIN به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شده است (Zhang et al. 2014). همچنین برتری BAP نسبت به کینتین و تیدیازول در باززایی سویا نیز گزارش شده است، به‌طوریکه بالاترین درصد القا این پدیده از ریزنمونه کوتیلدون در محیط MS با حضور ۴/۴۴ میکرومولار BAP بوده است (Arun et al. 2016).

مواد ژله کننده یکی دیگر از عوامل موثر در باززایی درون شیشه‌ای گیاهان محسوب می‌شود. مواد ژله‌کننده از طریق اثر در رشد و تمایز گیاه کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای نقش خود را ایفا می‌کنند. به طور کلی غلظت ماده ژله کننده ارتباط نزدیکی با تنش آبی دارد. غلظت‌های بالا مواد ژله‌کننده موجب تنش آبی و مشکل دسترسی به آب و مواد غذایی از محیط کشت می‌شوند. همچنین نوع و کیفیت ماده ژله کننده نیز در ارتباط با آبکی شدن و نکروزه شدن بافت دارای اهمیت بیشتری هستند (Ozel et al. 2008). انتخاب محیط کشت یا تهیه ترکیب آن برای موفقیت درکشت بافت ضروری است. هیچ محیط کشت مشخصی را نمی‌توان برای رشد انواع سلول‌ها توصیه کرد و اغلب لازم است تغییراتی در محیط کشت برای پاسخگویی انواع مختلف ریز نمونه صورت گیرد. این پژوهش با هدف بهینه سازی عوامل مؤثر از جمله ژنوتیپ، نوع ریز نمونه، نوع ماده ژله کننده و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی در باززایی سویا به عنوان اولین قدم در بهره برداری از مهندسی ژنتیک در اصلاح گیاه سویا طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۹۹ با تهیه بذور ارقام سامان و DPX از بانک بذر گروه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. بذور ارقام سامان و DPX سویا به مدت ۱۰ دقیقه درون آب مقطر حاوی مایع ضدعفونی کننده قرار داده سپس بذرها به مدت ۲ دقیقه در ۳۰ میلی‌لیتر محلول آب مقطر سترون‌سازی شده، حاوی ۲ قطره توین۲۰ و ۲ دقیقه در اتانول (۷۰٪ (V/V) قرار داده شد (Nejati Saravi et al. 2019). بذور دوبار با آب مقطر سترون‌سازی شده به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند و بعد از آن ۵ دقیقه در هیپوکلریت ۱٪ غوطه‌ور شده، نهایتاً ۳ بار در آب مقطر سترون‌سازی شده شستشو داده شدند (Nejati Saravi et al. 2019).

به منظور تهیه ریزنمونه‌های کوتیلدون و هیپوکوتیل، بذور ارقام مورد ارزیابی در محیط کشت MS با ۳٪ ساکاروز و ۰/۸٪ آگار با pH=۵/۸ قرار داده شد. لازم به ذکر است که تمامی مراحل در زیر هود لامینار انجام گرفت. بعد از گرفتن ریز نمونه‌ها، پتری

دیش‌های حاوی ریز نمونه‌ها به داخل اتاقک رشد با دمای ۲۳ درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده شدند (Nejati Saravi et al. 2019). در این پژوهش، آزمایش اثر تنظیم کننده‌های رشدی: مطالعه اثرات سطوح مختلف BAP (صفر، ۱ و ۲ میکروگرم در هر لیتر) و IBA (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میکروگرم در هر لیتر) بر روی دو رقم سامان و DPX، بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی، آزمایش اثر مواد ژله کننده بر اندام‌زایی و ریشه‌زایی ارقام و آزمایش تاثیر مقادیر مختلف هورمونی بر روی تعداد و درصدریشه‌زایی بصورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و هر تکرا ر شامل شش ریز نمونه بصورت جداگانه اجرا گردید. پس از حدود یک ماه صفات درصد باززایی و درصد ریشه‌زایی مطالعه شد. به منظور تجزیه آماری و بررسی نتایج از نرم افزار SPSS استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید و نتایج به صورت جدول و نمودارهای مقایسه‌ای ارائه شد.

نتایج و بحث

آزمایش اول: اثر تیمارهای هورمونی بر ریزنمونه‌های دو رقم گیاه زراعی سویا (*Glycine max* L.): در این آزمایش هدف نهایی بررسی اثرات اصلی و متقابل دوجانبه بر روی صفات اندام‌زایی و تعداد شاخه‌های باززایی شده در هر دو رقم، هر دو نوع ریز نمونه و نیز تیمارهای هورمونی بود که براساس داده‌های جدول ۱ به طور جداگانه نسبت به نمونه شاهد معنی‌دار بودند. اثر متقابل ریزنمونه × ترکیب هورمونی در ارتباط با صفات اندام‌زایی و تعداد شاخه‌های باززایی در سطح ۱ درصد معنی دار بود. همچنین اثر متقابل رقم ×ریزنمونه و نیز رقم × تیمار هورمونی برای صفت تعداد شاخه‌های باززایی شده در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود، با این حال، میزان اندام‌زایی در این دو اثر متقابل تنها در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. (جدول ۱).

اثر رقم و ریز نمونه بر میزان اندام‌زایی: نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، نشان داد که بیشترین میزان اندام‌زایی در هر دو رقم سامان (۵۰/۹۲٪) و DPX (۴۰/۵٪) مربوط به ریزنمونه کوتیلدون است. همچنین، میزان اندام‌زایی رقم سامان برای هر دو نمونه کوتیلدون (۵۰/۹۲٪) و هیپوکوتیل (۱۵/۷۳٪) بیشتر از رقم DPX برای کوتیلدون (۴۰/۵٪) و هیپوکوتیل (۱۲/۴۹٪) مشاهده شد. لازم به ذکر است که اگرچه اندام‌زایی هیپوکوتیل در رقم سامان بیشتر از رقم DPX بود، اما این تفاوت معنی‌دار نیست (شکل ۱). گزارشات متعدد بر این نکته تأکید دارند که باززایی در سویا وابسته به ژنوتیپ است، حتی نوع، کیفیت و منبع ریزنمونه نیز در کارایی باززایی مؤثر می‌باشند (Soto et al. 2013). درسال‌های اخیر ریزنمونه‌های مختلف سویا برای باززایی مورد استفاده قرار گرفته است به طوریکه بیشترین کارایی باززایی سویا، از ریزنمونه‌های کوتیلدون و یا هیپوکوتیلدون گزارش شده است (Phat et al. 2015). باززایی نه ژنوتیپ مختلف سویا را Raza et al. (2017) مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که بین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر پاسخ به باززایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر تیمارهای هورمونی بر ریز نمونه‌های ارقام گیاه زراعی سویا

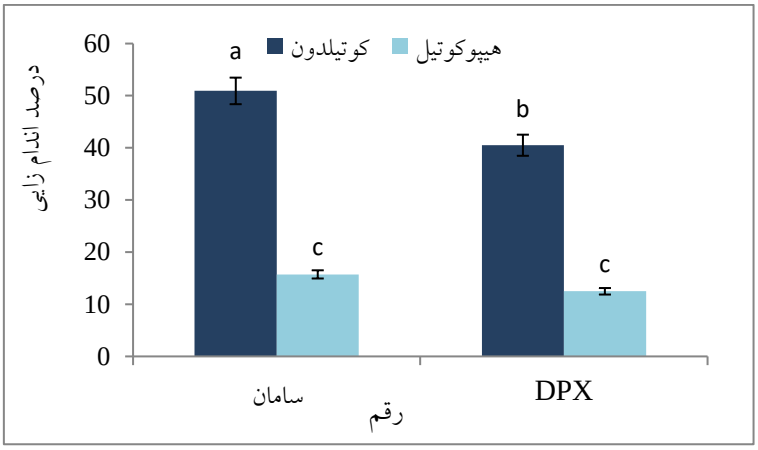
Table 1. Analysis of variance of the effect of hormonal treatments on explans of soybean cultivars

میانگین مربعات (MS)			
تعداد شاخه باززایی شده Number of regenerated branches	درصد اندام‌زایی % of organogenesis	درجه آزادی df	منابع تغییرات (S.O.V)
8.34**	1205.82 **	1	رقم (Cultivar)
69.82**	39447.25 **	1	ریزنمونه (Explant)
17.07**	11195.68 **	8	ترکیب هورمونی (Hormonal treatment)
2.68 **	156.29*	1	رقم ×ریزنمونه (Explant× Cultivar)
0.65**	85.86*	8	رقم × ترکیب هورمونی Hormonal treatment×Cultivar
4.76**	2571.44 **	8	ریزنمونه × ترکیب هورمونی Explants ×Hormonal combination
0.32**	17.36 ns	8	رقم×ریزنمونه ×ترکیب هورمونی Explants ×Hormonal combination× Cultivar
0.01	36.65	108	خطا (Error)
10.1	12.7		ضریب تغییرات(%) (CV)

ns، ** و* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال 5و 1درصد

ns: Non-significant, * and **: Significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

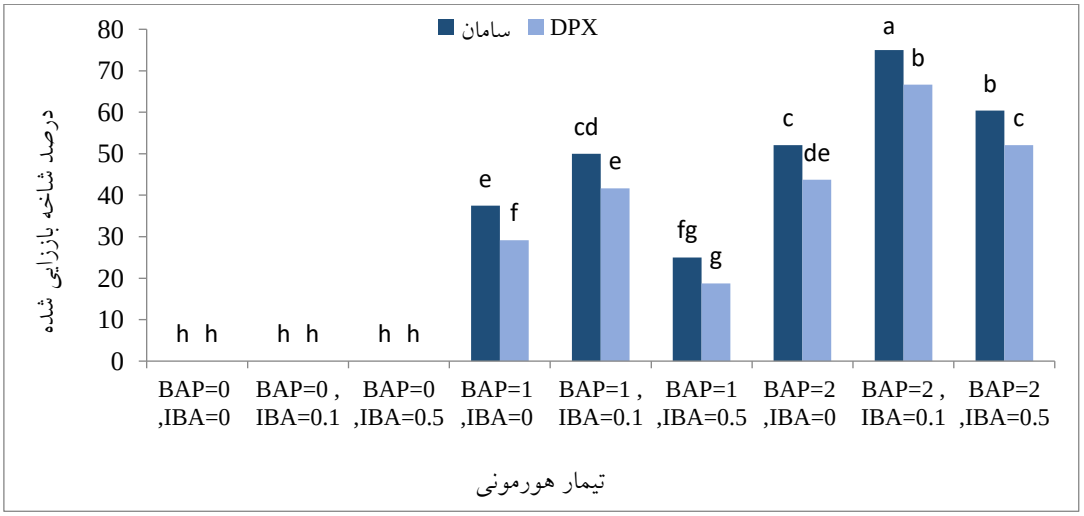
اثر رقم و ترکیب هورمونی بر میزان اندام بارزایی: نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف هورمون‌ها و ارقام سامان و DPX اختلاف معنی‌داری برای صفت اندام‌زایی وجود داشت، به‌طوری که بیشترین تعداد اندام‌زایی در تیمار هورمونی۲ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۱ میکروگرم در هر لیتر IBA برای هر دو رقم سامان (۷۵٪) و DPX (۶۶/۶۶ ٪) اندازه‌گیری شد. همچنین در تمامی تیمارهای هورمونی تعداد اندام‌زایی در رقم سامان از رقم DPX بیشتر و از جمله با تیمار شاهد اختلاف معنی دار بود (شکل ۲).



شکل ۱. مقایسه میانگین درصد اندام‌زایی اثر متقابل دو جانبه رقم و ریزنمونه

Figure 1. Comparison of the average percentage of organogenesis of the interaction between cultivar and explant

نتایج مطالعات Raza (2017) بر روی باززایی نه ژنوتیپ مختلف سویا نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر پاسخ به باززایی اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در مطالعه دیگر مربوط به سویا، بیشترین میزان باززایی از ریزنمونه کوتیلدون ژنوتیپ LS677 در محیط MS تکمیل شده با ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP گزارش شده است (Mangena et al. 2015). اثر هورمون‌های مختلف سیتوکینینی، اکسینی و ریزنمونه ها در سویا نشان دادند که کوتیلدون به عنوان یک ریزنمونه با پتانسل می تواند برای فرایندهای باززایی و تراریختی مورد استفاده قرار گیرد یافته‌های این مطالعه نشان داد که بیشترین درصد باززایی در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP و هورمون Kin بدست آمد (Faraz et al. 2019).

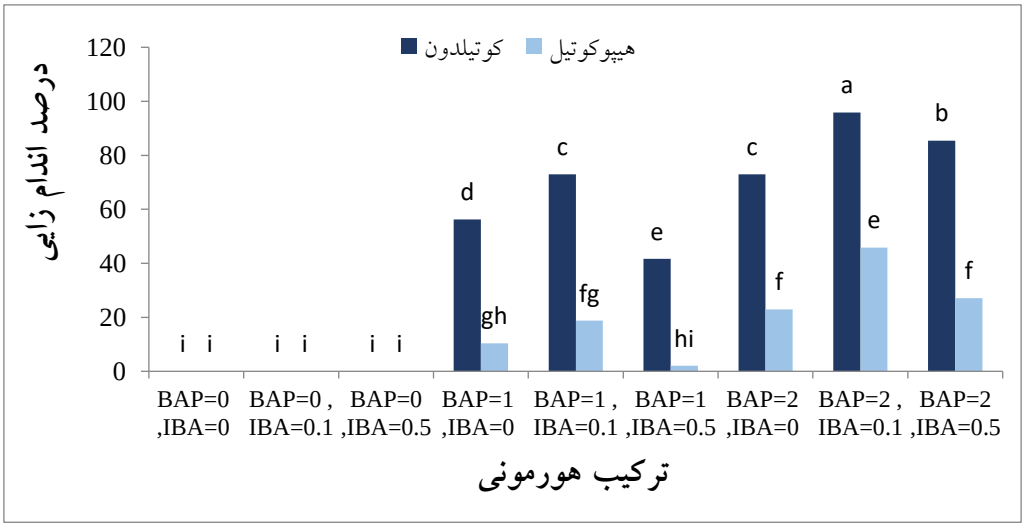


شکل ۲. مقایسه میانگین تعداد شاخه باززایی شده اثر متقابل دو جانبه رقم و تیمار هورمونی

Figure 2. Comparison of the average number of regenerated branches of the reciprocal interaction of cultivar and hormonal treatment

اثر ریز نمونه وترکیب هورمونی بر میزان اندام‌زایی: نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، نشانگر آن است که بین اثر متقابل سطوح مختلف تیمارهای هورمونی و نوع ریزنمونه ها بر میزان اندام‌زایی از جمله شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین اندام‌زایی در تیمار هورمونی۲ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۱ میکروگرم در هر لیتر IBA برای ریز نمونه کوتیلدون (۹۵/۸۳ ٪) گزارش شد. هر چند که همین تیمار هورمونی برای ریزنمونه هیپوکوتیل (۴۵/۸۳ ٪) نیز بالاترین نرخ اندام‌زایی را در پی داشت. همچنین در تمامی تیمارهای هورمونی میزان اندام زایی در ریزنمونه کوتیلدون به طور بسیار معنی‌داری از ریزنمونه هیپوکوتیل بیشتر بود. این نکته نیز جالب توجه است که به طور کل اندام‌زایی در عدم حضور هورمون BAP رخ نداده است (شکل ۳). پس می‌توان نتیجه گرفت که هورمون‌ها اثر متقابل با یکدیگر دارند و اثرات همدیگر را با افزایش بزرگ شدن سلولی و تقسیم سلولی بهبود می بخشند. علت تعامل هورمون‌های اکسینی با هورمون های سیتوکینینی در تقسیم سلولی این است که در سلول ابتدا باید بزرگ شدن سلول اتفاق بیفتد و سپس تقسیم سلولی صورت می گیرد و تا زمانی که اندازه سلول به یک حد معین نرسیده باشد تقسیم صورت نخواهد گرفت، همچنین مراحل اولیه تقسیم سلولی نیازمند حضور اکسین می باشد (Sharifi et al. 2004). بنابراین غلظت هورمونی۲ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۱ میکروگرم در هر لیتر IBA برای ریز نمونه کوتیلدون نقش موثری را اندام‌زایی در ریزنمونه کوتیلدون دارد. در میان پژوهش‌هایی که تاکنون صورت گرفته است، استفاده از ریزنمونه کوتیلدون گیاهان جهت ریزازدیادی و باززایی در کشت درون شیشه‌ای به خصوص در مطالعات انتقال ژن توصیه می گردد (Abdolinasab 2018). همچنین، در مطالعه‌ای که Nejati Saravi (2019) بر روی کشت بافت گیاه زراعی سویا انجام دادند، از دو ریزنمونه ساقه و کوتیلدون استفاده شد. در این مطالعه، بیشترین میزان کالوس‌زایی در اثر تیمارهای هورمونی در ریزنمونه کوتیلدون مشاهده گردیده است. نتایج مطالعه تاییدکننده این موضوع هست که ریز نمونه‌های مختلف سویا عکس العمل‌های متفاوتی نسبت به تیمارهای هورمونی در محیط‌های کشت نشان داده و بین تیمارهای هورمونی و ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت (Sharifi et al. 2004).

اثر متقابل سه جانبه رقم، ریزنمونه و تیمار هورمونی بر تعداد شاخه باززایی شده: نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، نشان دهنده آن است که بیشترین تعداد شاخه بازازایی شده در ریزنمونه کوتیلدون رقم سامان تحت تیمار هورمونی۲ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۱ میکروگرم در هر لیتر IBA (۵/۱۶) و کمترین آن در ریزنمونه هیپوکوتیل رقم DPX تحت تیمار هورمونی۱ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۵ میکروگرم در هر لیتر IBA (صفر) گزارش شد که در واقع شاخه زایی رخ نداده بود. به طور کلی، ریزنمونه کوتیلدون در رقم سامان در تیمارهای مختلف هورمونی بیشترین میزان شاخه را در شرایط محیط کشت نسبت به ریزنمونه‌های دیگر در این رقم و نیز رقم باززایی کرده است (شکل ۴).



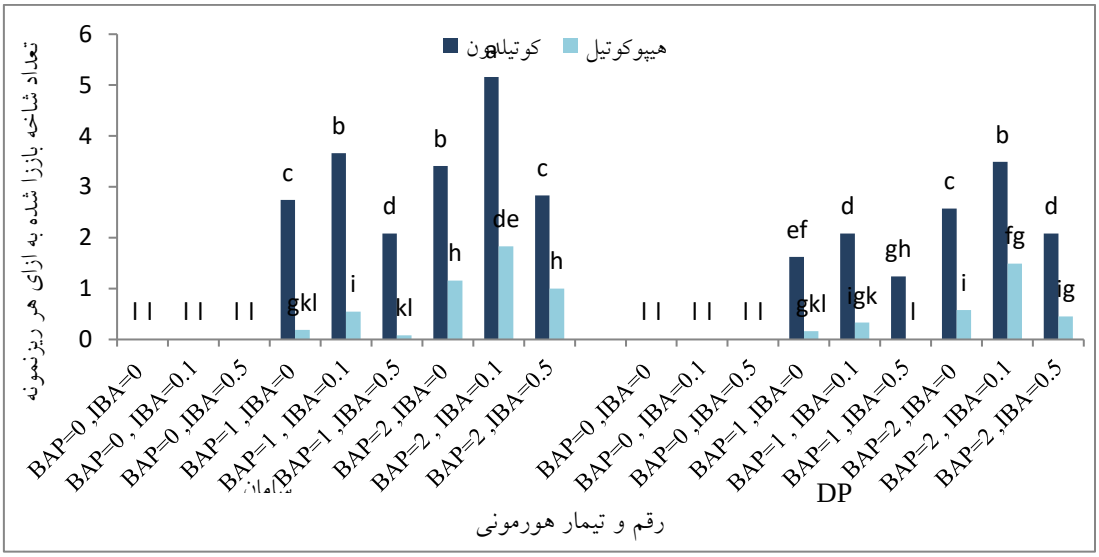
شکل ۳. مقایسه میانگین درصد اندام‌زایی اثر متقابل دو جانبه ریزنمونه و تیمار هورمونی

Figure 3. Comparison of the average percentage of organogenesis of the interaction between explants and hormonal treatment

اثر متقابل سه جانبه رقم، ریزنمونه و تیمار هورمونی بر تعداد شاخه باززایی شده: نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، نشان دهنده آن است که بیشترین تعداد شاخه بازازایی شده در ریزنمونه کوتیلدون رقم سامان تحت تیمار هورمونی۲ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۱ میکروگرم در هر لیتر IBA (۵/۱۶) و کمترین آن در ریزنمونه هیپوکوتیل رقم DPX تحت تیمار هورمونی۱ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۵ میکروگرم در هر لیتر IBA (صفر) گزارش شد که در واقع شاخه زایی رخ نداده بود. به طور کلی، ریزنمونه کوتیلدون در رقم سامان در تیمارهای مختلف هورمونی بیشترین میزان شاخه را در شرایط محیط کشت نسبت به ریزنمونه‌های دیگر در این رقم و نیز رقم باززایی کرده است (شکل ۴).

تاکنون مطالعه‌ای بر روی کشت بافت رقم سامان گیاه زراعی سویا صورت نگرفته است. از سوی دیگر، از ریز نمونه بذر رقم DPX سویا تنها توسط Abbasi et al. (2016) به همراه رقم گرگان ۳ این گیاه زراعی به منظور تراریختی به وسیله *Agrobacterium tumefaciens* استفاده شده است که در طی تراریختی از تکنیک کشت بافت بهره گرفته شد. و از این رقم در کشت بافت استفاده کردند و ریز نمونه‌های حاصل را تحت تیمارهای هورمونی 2,4D و کینتین قرار دادند(Abbasi et al. 2016). در میان نتایج این تحقیق، مشخص شد که بهترین تیمار برای باززایی و شاخه‌زایی در کشت بافت گیاه زراعی سویا برای تمام ریزنمونه‌ها در هر دو رقم، غلظت ۲ میکروگرم در هر لیتر BAP و ۰/۱ میکروگرم در هر لیتر IBA مشاهده شد.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ٤. مقایسه میانگین تعداد شاخه باززایی شده اثر متقابل سه جانبه رقم، ریزنمونه و تیمار هورمونی

Figure 4. Comparison of the average number of regenerated branches of the threefold interaction of cultivar, explant and hormonal treatment

ازمایش دوم: مطالعه اثر مواد ژله کننده بر روی رقم سامان: در این آزمایش، رقم سامان به دلیل اینکه در طی آزمایش قبلی همواره عملکرد بهتری را نشان داد، برای ادامه آزمایشات انتخاب و رقم DPX به منظورکاهش هزینه‌های مطالعه حذف شد.نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که میزان اندام‌زایی و تعداد شاخه‌های باززایی شده توسط مواد ژله کننده محیط کشت در سطح 1 درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

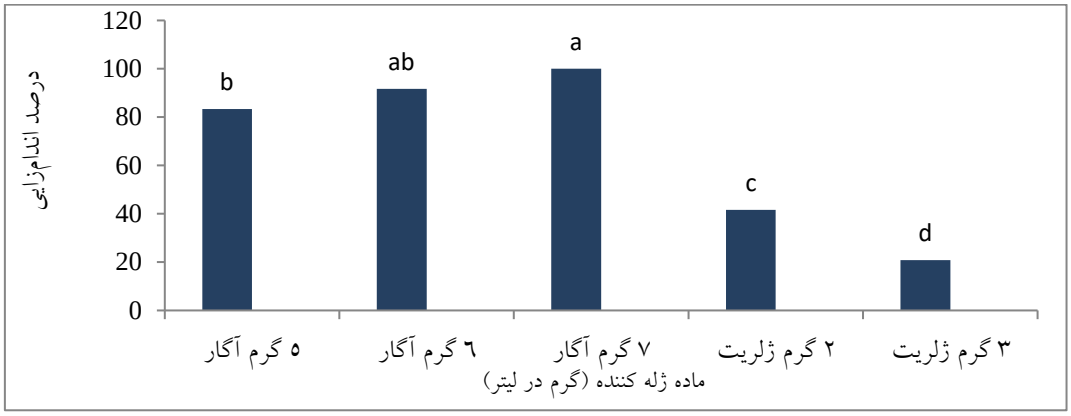
جدول ۲. جدول تجزیه واریانس ماده ژله‌کننده بر روی رقم سامان

Table 2. Analysis of variance of the gelling agent on Saman cultivar

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)	
		درصد اندام‌زایی % of organogenesis	تعداد شاخه باززایی شده Number of regenerated branches
ماده ژله کننده (gelling agent)	4	4736.55**	10.69**
خطا (Error)	15	87.94	0.10
ضریب تغییرات(%) (CV)		28.1	16.5

معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد **: Significant at 0.01

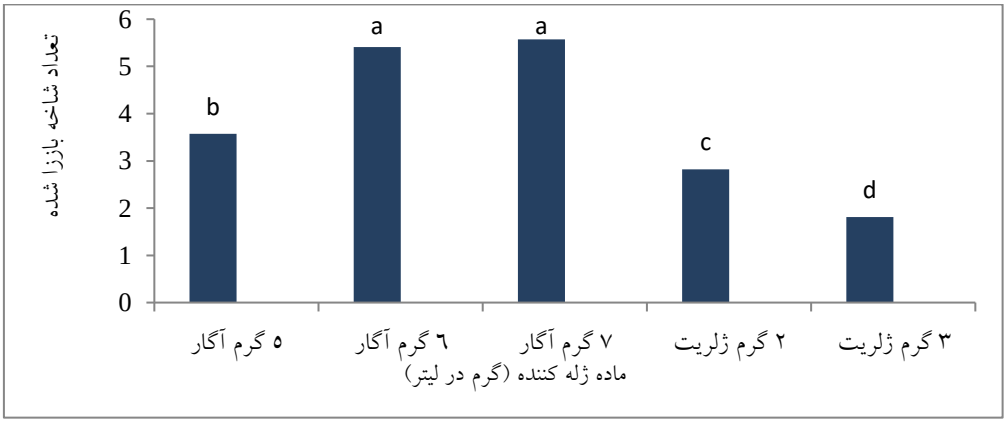
تاثیر مواد ژله کننده بر میزان اندام‌زایی: نتایج جدول تجزیه واریانس ۲ و مقایسه میانگین (شکل ۲) نشان داد که استفاده از مقادیر مختلف آگار، میزان اندام‌زایی را نسبت به کاربرد غلظت‌های متفاوت ژلریت به طور معنی‌داری افزایش می دهد بر این اساس، وجود ۷ گرم آگار در محیط کشت بیشترین میزان اندام‌زایی (۱۰۰٪) و مقدار ۳ گرم ژلریت در محیط کشت کمترین میزان اندام‌زایی (۲۰/۸۲٪) ایجاد کرد (شکل ۵).



شکل ۵. مقایسه میانگین درصد اندام‌زایی در ماده ژله کننده

Figure 5. Comparing the average percentage of organogenesis in the gelling agent

تاثیر مواد ژله کننده بر تعداد شاخه‌های باززایی شده: نتایج جدول تجزیه واریانس نشانگر آن است که سطوح ۶ و ۷ گرم آگار که از لحاظ آماری تفاوتی با یکدیگر نداشتند و توانستند بیشترین تعداد شاخه‌ها را (به ترتیب ۵/۴۱ و ۵/۵۷ به طور میانگین) باززایی کنند. در حالیکه کمترین تعداد شاخه‌های باززایی شده (۱/۸۱) در محیط کشت حاوی ۳ گرم ژلریت مشاهده شد. به طور کلی، غلظت‌های مختلف آگار همواره به شکل معنی داری تعداد شاخه‌های بیشتری در ریزنمونه‌های رقم سامان گیاه سویا نسبت به مقادیر مختلف ژلریت ایجاد کرد. همچنین، مشاهده شد که با افزایش میزان آگار تعداد شاخه‌های باززایی شده افزایش و با بالا رفتن مقدار ژلریت در محیط کشت تعداد شاخه‌های باززایی شده کاهش می‌یابد (شکل ۶).



شکل ٦. مقایسه میانگین تعداد شاخه باززا شده در ماده ژله کننده

Figure 6. Comparing the average number of organogenezid branches in the gelling agent

مواد ژله کننده یکی دیگر از عوامل موثر در باززایی درون شیشه‌ای گیاهان محسوب می‌شود. مواد ژله‌کننده از طریق اثر در رشد و تمایز گیاه کشت شده در شرایط درون شیشه‌ای نقش خود را ایفا می‌کنند. به طور کلی غلظت ماده ژله کننده ارتباط نزدیکی با تنش آبی دارد. غلظت‌های بالا مواد ژله‌کننده موجب تنش آبی و مشکل دسترسی به آب و مواد غذایی از محیط کشت می‌شوند. همچنین نوع و کیفیت ماده ژله کننده نیز در ارتباط با آبکی شدن و نکروزه شدن بافت دارای اهمیت بیشتری هستند (Ozel et al. 2008). در مطالعه‌ای از میان غلظت‌های مختلف ماده ژله‌کننده آگار، بیشترین میزان باززایی سویا در غلظت‌های ۵ و ۶ گرم در لیتر آگار حاصل شده است (Soto et al. 2013). مطالعات Mangena et al. (2015) نشان داده بیشترین میزان باززایی سویا در ۳ گرم در لیتر ژلریت بدست آمده است.

آزمایش سوم: تاثیر مقادیر مختلف هورمون IBA بر ریشه‌زایی و تعداد ریشه: بر اساس نتایج آنالیزهای آماری انجام شده میزان ریشه‌زایی و تعداد ریشه‌های باززایی شده توسط سطوح مختلف هورمون گیاهی IBA در سطح احتمال ۱ درصد گزارش شد (جدول ۳).

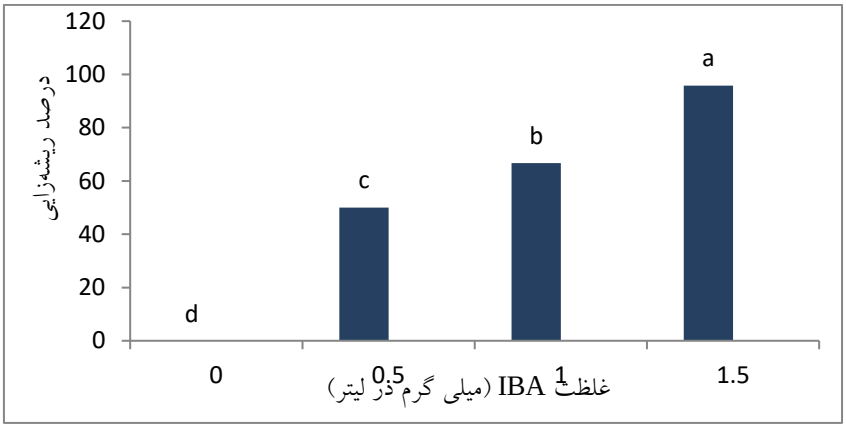
جدول ۳. جدول تجزیه واریانس صفات ریشه‌زایی و درصد ریشه‌زایی در رقم سامان

Table 3. Analysis variance of rooting and rooting percentage characters in Saman cultivar

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)	
		درصد ریشه‌زایی % of rooting	تعداد ریشه Number of roots
IBA	3	6452.32**	23.08**
خطا (Error)	12	109.94	0.46
ضریب تغییرات(%) (CV)		23.5	15.7

معنی‌دار در سطوح احتمال ۱ درصد **: Significant at 0.01**

نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، نشان داد که بین سطوح مختلف این هورمون گیاهی، به طور معنی داری غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر بیشتر میزان ریشه‌زایی (۹۵/۸۳٪) را در کشت بافت این گیاه ایجاد می‌کند. همچنین، کمترین میزان ریشه زایی (۴۹/۹۹ ٪) نیز توسط غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر از هورمون IBA القا شده بود. به طور کل، با افزایش میزان غلظت هورمون گیاهی IBA ، میزان ریشه‌زایی در ریزنمونه های رقم سامان گیاه سویا نیز بالا رفته است (شکل ۷).



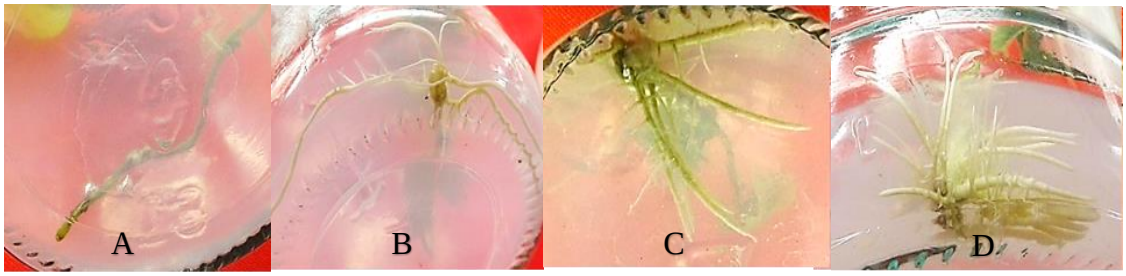
شکل ۷. مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی تحت غلظت‌های مختلف هورمون IBA

Figure 7. Comparing the average percentage of rooting under different IBA hormone concentrations

نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، بیانگر آن است که غلظت ۱/۵ میلی گرم بر لیتر از هورمون گیاهیIBA بالاترین تعداد ریشه (۵/۶۲) را در شرایط کشت درون شیشه‌ای این گیاه ایجاد کرد. که این نتایج مشابه یافته‌های مطالعه بر روی رقم ویلیامز سویا در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر هورمون گیاهیIBA بود (Sharifi et al. 2004). همچنین، کمترین تعداد ریشه (۲/۴۹) در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر از هورمون مشاهده شد. به طور کل، افزایش غلظت هورمون در محیط کشت، تعداد ریشه‌ها در گیاه سویا افزایش می‌دهد (شکل ۸). همچنین، تاثیرات سطوح مختلف هورمون IBA بر ریشه زایی و تعداد ریشه‌های باززایی شده رقم سامان گیاه زراعی سویا در شرایط آزمایشگاهی به طور کیفی در شکل ۹ مشاهده می‌شود.

شکل ۸. مقایسه میانگین تعداد ریشه‌های باززایی شده تحت غلظت‌های مختلف هورمون IBA

Figure 8. Comparing the average number of regenerated roots under different concentrations of IBA hormone



شکل ۹. ریشه‌زایی و تعداد ریشه تحت غلظت‌های مختلف هورمون IBA؛ آ) غلظت صفر میلی گرم در لیتر، ب) غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر ، پ) غلظت ۱ میلی گرم در لیتر، ت) غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر

Figure 9. Rooting and number of roots under different concentrations of IBA hormone; A) Concentration of zero mg / l, B) Concentration of 0.5 mg/l, C) Concentration of 1 mg/l, D) Concentration of 1.5 mg/l

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، تشکیل ریشه در گیاهان را افزایش می‌دهند. تاثیر اساسی اکسین در القای ریشه‌زایی و تشکیل آغازنده ریشه اثبات شده است. اکسین بر سرعت و افزایش درصد ریشه‌زایی اثر دارد (Asghari 2017). گیاهان اکسین طبیعی را در شاخه‌ها و برگ‌های جوان تولید می‌کنند، اما برای ریشه‌زایی موفقیت آمیز در شرایط کشت بافت نیاز است که اکسین مصنوعی به کاربرده شود. بیشترین موفقیت در ریشه‌زایی گیاهان کشت بافت شده توسط غلظت‌های مختلف ایندول بوتریک اسید (IBA)، جزء گروه هورمون‌های اکسین، به دست آمده است (Delcheh et al. 2014; Sukweenadhi et al. 2019).

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که رقم بومی سامان گیاه زراعی سویا نسبت به رقم DPX در شـــرایط کشـــت بافت گیاهی عملکرد بهتری دارد. همچنین انتخاب کوتیلدون به عنوان ریز نمونه جهت کشـــت در شـــرایط آزمایشگاهی می‌تواند بازدهی بیشتری را به نسبت ریز نمونه هیپوکوتیل داشته باشد. از سوی دیگر، کاربرد غلظت‌های بالای BAP (دو میلی گرم در لیتر) در کنار غلظت‌های پایین IBA (۰/۱ میلی گرم در لیتر) می تواند بالاترین نرخ باززایی و شاخه‌زایی را نشان دهد. در حالیکه غلظت های بالای هورمون IBA (۱/۵ میلی گرم در لیتر) به تنهایی می تواند بیشترین میزان ریشه زایی را در گیاه سویا در شرایط کشت بافت القا کند. در آخر نیز لازم به ذکر است که استفاده از آگار در اوزان بالا (۶ و ۷ گرم) برای تهیه محیط کشت جهت ریز ازدیادی گیاه سویا بازده بالاتری نسبت به کاربرد ژلرایت به عنوان ماده ژله‌ای کننده محیط کشت دارد.

ســپاســگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از آقای دکتر وحید مهری زاده به خاطر مطالعه متن مقاله حاضـــر و ارائه نظرهای ارزشمند سپاسگزاری نمایند.

References

Abbasi Z, Hooshyar S, Bagherieh-Najjar MB (2016) Improvement of callus production and shoot regeneration using various organs of soybean (*Glycine max* L. Merr) by response surface methodology. *In Vitro* Cel Dev Biol Plant 52, 537-545.

Abdolinasab M (2018) Optimization of Callogenesis and Regeneration of Cucumber (Cucumis Sativus L.) UtilizingCotyledon, Hypocotyl and Leaf Explants. Agric Biotechnol J 10, 75-92 (In Persian).

Arun M, Chinnathambi A, Subramanyam K et al. (2016) Involvement of exogenous polyamines enhances regeneration and agrobacterium-mediated genetic transformation in half-seeds of soybean. Biotechnol J 6, 148- 160.

Asghari M (2017) New (non-classical) plant growth hormones and regulators: the key to plant growth management and sustainable production of a healthy crop in agriculture. Urmia: Urmia University Press, first edition, 346 pages (In Persian).

Delcheh KS, Kashefi B, Mohammadhassan R (2014) A review optimization of tissue culture medium medicinal plant: Thyme Int J Farm Alli Sci 3, 1015-1019.

Farza L, Siddique MF, Galani S and Mehdi F (2019) Assessing the effect of phytohormone on growth and germination of soybean (*Glycin max* L.) from cotyledonary node. Pak J Bot 51, 103-107.

Godfray HCJ, Beddington RJ, Crute IR, Haddad Let al. (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. Science 327, 812-818.

Hazell P. and Wood S (2008).Drivers of change in global agriculture. Philosophical transactions of the Royal Soc Biol Sci 363, 495–515.

Li S, Cong Y, Liu Y et al. (2017) Optimization of agrobacterium-mediated transformation in soybean. Plant Sci 8, 246-261.

Mangena P, Mokwala PW and Nikolova RV (2015) In vitro multiple shoot induction in soybean. Int J Agric Biol 17, 838-842.

Mello-Farias PC and Chaves ALS (2008) Advances in agrobacterium-mediated plant transformation with enphasys on soybean. Sci Agric 65, 95-106.

Mohammadhassan R, Kashefi B, Delcheh KS (2014) *Agrobacterium*-based vectors: a review. Intl J Farm Alli Sci 3, 1002-1008.

Nejati Sarvi N, Babaian Jelodar N, Bagheri NA, Pakdin Parizi A (2019) Investigation of the effect of explants and different levels of NAA and 2-4-D hormones for callus induction in soybean *Glycine Max* L. 6th National Conference on Medicinal Plants Traditional medicine and organic agriculture, Hamedan (In Persian).

Ozel, CA, Khawar KM and Arslan O (2008) A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on in vitro shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Sci Hortic 117, 174-181.

Phat P, Rehman SU, Jung HI and Ju J (2015) Optimization of soybean (*Glycine max* L.) regeneration for korean cultivars. Pak J Bot 47, 2379-2385.

Raza G, Singh MB, Bhalla PL (2017) In Vitro plant regeneration from commercial cultivars of soybean. BioMed Res Int 1, 1-9.

Sharifi A, Bagheri A and Vesal S (2004) effect of explants and varoous levels of auxin and cytokinin on soybean regeneration. Agri Sci Indus J 18, 117-125 (In Persian).

Soto N, Ferreira A, Abad CD and Enriquez, GA (2013) Regeneration *in vitro* de plantas de soya de la variedad cubana Incasoy-36. Biotecnol Apl 30, 29-33.

Sukweenadhi J, Choi JY, Kim YJ et al. (2019) June. Callus induction and in vitro mass culture of adventitious roots from leaf segment explants of *Dendropanax morbifera* Lev. In IOP Conf Ser Earth Environ Sci 293, 012-24).

VargasVML, Avalos RMG, De la Pena C and Figueroa FRQ (2008) Plant tissue culture. Biol Plant 19, 875-904.

Verma K, Saini R, Rani A (2014) Recent advances in the regeneration and genetic transformation of soybean. Innov Biol 1, 15-26.

Zhang F, Chen C, Ge H (2014) Efficient soybean regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation using a whole cotyledonary node as an explant. Biotechnol Appl Biochem 61, 620-625.