



اثر تنظیم کننده رشد گیاهی، رقم و ریزنمونه در اندام‌زایی درون (*Glycine max* L.) شیشه‌ای سویا

Effects of Plant Growth Regulators, Genotype and Explant on *in vitro* Organogenesis of Soybean (*Glycine max* L.)

وحید مهری زاده^۱ و ابراهیم دورانی^{۲*}

Vahid Mehrizadeh¹, Ebrahim Dorani^{2*}

۱- دکترای بیوتکنولوژی گیاهی، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران.

۲- استاد گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

1- Ph.D. Student of Agricultural Biotechnology, 2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Dorani@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۱۲ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۶/۲۳)

Received: 2025/02/27 | Accepted: 2025/09/03 | Published: 2025/09/14

چکیده

Abstract

Soybean is one of the most important crops and nutrient source of oil and protein in the world. Soybean breeding through biotechnology is one of the current manners to overcome cultivation and qualitative problems of soybean production. In this study effect of genotype (Williams, Sari and DPX), explant (hypocotyl, cotyledon and first leaf) and plant growth regulators such as BAP (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/L) and IBA (0.0, 0.1 and 0.5 mg/L) on *in vitro* organogenesis of soybean investigated. This experiment was performed as a factorial in a completely randomized design (CRD) with four replications. Analysis of variance for organogenesis parameters showed that there was significant difference between genotypes, explants and PGR combinations at one percent significance level. Highest organogenesis obtained from cotyledon explants in MS medium supplemented with 1.5 and 2.0 mg/L BAP plus 0.1 mg/L IBA in Williams. The highest shoot per explant have been recorded in medium supplemented with 1.5 mg/L BAP plus 0.1 mg/L IBA in Williams using cotyledon explants. Finally, the regenerated shoots transferred to 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L IBA for root induction and rooted plants adapted in greenhouse. The optimal results obtained in this study can provide the basis for future research, especially gene transfer studies to these soybean genotypes.

Keywords: Genotype, Organogenesis, Plant Growth Regulators, Soybean.

رفرنس دهی این مقاله Citation

Mehrizadeh V, Dorani E. (2025). Effects of plant growth regulators, genotype and explant on *in vitro* organogenesis of soybean (*Glycine max* L.). *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 13 (2): 235-245. Doi: [10.61882/gebsj.13.2.8](https://doi.org/10.61882/gebsj.13.2.8)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-511-en.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 13, Number 2, 2025

خلاصه

سویا (*Glycine max L.*) یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی و منبعی غنی از روغن و پروتئین محسوب می‌شود. امروزه اصلاح سویا از طریق بیوتکنولوژی گیاهی یکی از روش‌های کارآمد در غلبه بر مشکلات زراعی و کیفی این گیاه می‌باشد. دستیابی به یک سیستم باززایی کارآمد و تکرارپذیر، پیش‌نیاز برنامه‌های بهبود ژنتیکی گیاهان است. در پژوهش حاضر، اثر رقم (ویلیامز، ساری و DPX)، ریزنمونه (هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگچه اولیه) و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی BAP (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر) و IBA (۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر) در اندام‌زایی سویا مورد مطالعه قرار گرفتند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برای صفات اندام‌زایی بین ارقام، ریزنمونه‌ها و سطوح مختلف ترکیبات هورمونی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. بیشترین درصد اندام‌زایی از ریزنمونه کوتیلدون رقم ویلیامز کشت شده در محیط‌های MS حاوی ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA حاصل شد. همچنین بیشترین تعداد شاخساره تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه، از ریزنمونه کوتیلدون رقم ویلیامز در محیط حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA مشاهده شد. در نهایت شاخه‌های باززا شده جهت القاء و تشکیل ریشه به محیط MS ۱/۲ حاوی یک میلی گرم در لیتر هورمون IBA منتقل و سپس گیاهچه‌های رشد یافته به محیط آزاد سازگار و در گلدان‌ها کشت شدند. نتایج بهینه بدست آمده در این مطالعه می‌تواند زمینه را برای تحقیقات آینده و بخصوص مطالعات انتقال ژن به این ارقام سویا فراهم سازد.

کلمات کلیدی: اندام‌زایی، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، رقم، سویا.

مقدمه

Introduction

سویا (*Glycine max L.*) یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی دنیا است که نه تنها به دلیل ظرفیتش در تولید روغن بلکه به دلیل نقش آن در تغذیه انسان و دام از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. سویا از نظر ذخایر روغنی و پروتئینی حائز اهمیت فراوان می‌باشد. از میان گیاهان روغنی، سویا ویژگی‌های منحصر به فردی دارد و کاربرد این گیاه دارای طیف بسیار گسترده‌ای است (Babaei et al., 2021; Schaole and Mangena, 2024).

افزایش جمعیت جهان و افزایش تقاضا برای محصولات پروتئینی، باعث شده گیاه سویا در همه نواحی آب و هوایی جهان به عنوان یکی از ارزش‌ترین محصولات کشاورزی و منبعی غنی جهت تولید روغن و پروتئین کشت شود. اما حساسیت بالا به تنش‌های محیطی به ویژه شوری و خشکی، آفات و بیماری‌ها و پایین بودن شاخص برداشت از محدودیت‌های اصلی بهره‌وری سویا محسوب می‌شوند (Wang et al., 2022). افزایش میزان روغن، بهبود کیفیت تغذیه‌ای آن، مقاومت به آفات و بیماری‌ها از اهداف اصلی برنامه‌های اصلاحی سویا می‌باشند. در گذشته تلاش‌های زیادی در جهت افزایش مقاومت آن در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی با استفاده از روش‌های اصلاح نباتات کلاسیک صورت گرفته است. اما خودبارور بودن این گیاه و تنوع ژنتیکی کم واریته‌های آن، اصلاح سویا با روش‌های کلاسیک را با محدودیت روبرو کرده است (Vargas-Almendra et al., 2024).

استفاده از بیوتکنولوژی گیاهی در کنار روش‌های کلاسیک، امید دانشمندان برای غلبه بر مشکلات زراعی و کیفی گیاهان را افزایش داده است. امروزه فناوری کشت بافت مبتنی بر توانایی باززایی به طور گسترده در زمینه‌های مختلف از جمله تحقیقات پایه، ریزازدیادی و اصلاح ژنتیکی استفاده می‌شود. اصلاح سویا با استفاده از روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای و انتقال ژن، به عنوان یکی از روش‌های کارآمد در کنار روش‌های

كلاسيك، مي تواند پتانسيل خوبي را در زمينه اصلاح نباتات و غلبه بر مشكلات اين گياه فراهم كند (Raza et al., 2019; Begum et al., 2019).

استفاده از مزايای كشت بافت درون شیشه‌ای از جمله تغيير ژنتيكي گياهان در بسياري از گونه‌ها به خاطر مشكلات باززايي گياهان با محدوديت مواجه شده است. امروزه دست‌يابي به يك روش كشت بافت تكرر پذير، مهمترين عامل موفقيت در دستورزي ژنتيكي گياهان به حساب مي‌آيد (Long et al., 2022). انتخاب ژنوتيب‌های پاسخ دهنده به كشت بافت اولين قدم در يك برنامه مهندسي ژنتيك يك گياه مي‌باشد. كارايي موفقيت در اين رابطه به عوامل متعددي از جمله گونه و ژنوتيب گياهي، نوع ريزنمونه، نوع و غلظت تنظيم كننده‌های رشد گياهي و غيره بستگي دارد (Mehrizadeh et al., 2021; Tiwari et al., 2023).

گزارش‌های متعدد بر اين نکته تاكيد دارند از ميان عوامل مختلف مؤثر بر باززايي، اثر ژنوتيب به عنوان يك عامل محدود كننده اصلي در كشت بافت سويا مطرح است. چون علي‌رغم دولپه‌ای بودن همچنان با محدوديت درصد باززايي پايين نسبت به ساير دو لپه‌ای‌ها مواجه است. باززايي در سويا به شدت وابسته به ژنوتيب است. حتى نوع، كيفيت و منبع ريزنمونه نيز در باززايي سويا مؤثر مي‌باشند (Zhong et al., 2024; Walne et al., 2020). هرچند هر سلول زنده پتانسيل تبديل شدن به يك گياه كامل را دارد، ولي در اكثر مطالعات از سلول‌ها يا بافت‌هایی با رشد فعال و متابوليسم فزيولوژيكي بالا به عنوان ريزنمونه استفاده مي‌كنند (Long et al., 2022). براي شاخه‌زايي در سويا از ريزنمونه‌های مختلف از جمله هيپوكوتيل (Raza et al., 2017)، مريستم ساقه (Liu et al., 2004)، جنين (Rao and Hildebrand, 2009)، کوتيلدون (Zhong et al., 2024) و نيمه بذر (Sojkova et al., 2016) استفاده شده است.

تنظيم كننده‌های رشد گياهي از ديگر عوامل مؤثر در كشت بافت گياهان مي‌باشند. سيتوكينين‌ها و اكسين‌ها از مهمترين تنظيم كننده‌های رشد گياهي هستند كه در رشد، تمايز و تقسيم سلولي نقش دارند (Mangena, 2021). معمولاً تغيير نسبت سيتوكينين به اكسين بيروني مي‌تواند به نفع يك الگوی رشد مثل ریشه‌زايي، كالوس‌زايي و يا شاخه‌زايي باشد (Lee et al., 2020; Muzika et al., 2024). مطالعات نشان داده BAP به عنوان يكي از سيتوكينين‌های شناخته شده به تنهایی و يا در تركيب با ساير تنظيم كننده‌های رشدی، در القای شاخه‌زايي و شروع جنين‌زايي سوماتيكي در برخي از گياهان از جمله حبوبات تأثير گذار بوده است (Schaole and Mangena, 2024). به منظور باززايي شاخه در برخي از ارقام سويا از تنظيم كننده‌های رشدی مختلفی از جمله BAP، كيتين و تيديازول به تنهایی يا در تركيب با يك اكسين استفاده شده است ((Tiwari et al., 2022)). گزارش شده تأثير تركيب تيديازول و BAP در شاخه‌زايي سويا مؤثرتر از اثر جداگانه آنها مي‌باشد. در حالی‌كه برتری BAP نسبت به كيتين و تيديازول در باززايي برخي از ارقام سويا نيز گزارش شده است (Arun et al., 2016).

اين پژوهش با هدف ارزيابي توانايي اندام‌زايي برخي از ارقام تجاري سويا انجام شد. بدین منظور برخي از عوامل مؤثر در اندام‌زايي سويا از قبيل رقم، ريزنمونه و تنظيم كننده‌های رشد گياهي مورد مطالعه قرار گرفتند.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

مواد گياهي: در مطالعه حاضر بذور سه رقم رايج سويا در کشور (ويليامز، ساري و DPX) از موسسه تحقيقات اصلاح و تهيه نهال و بذر دريافت شد.

آماده‌سازي مواد گياهي: جهت ضد عفوني سطحی، ابتدا بذور به مدت يك دقيقه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفت و بعد از يك بار شستشو با آب مقطر استريل، با هيپوكلریت سدیم دو و نيم درصد به مدت ۱۵ دقيقه تیمار شدند. سپس بذور سه مرتبه با آب مقطر استريل شستشو داده شدند. بذور ضد عفوني شده در شرايط استريل در محيط كشت جوانه‌زني شامل محيط كشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962)

تكميل شده با ۳٪ ساكارز و ۰/۸٪ آگار منتقل و در اتاق رشد با دوره نوري ۱۶ ساعت روشنايي و ۸ ساعت تاريكي در دماي ۲۵ درجه سانتی-گراد نگهداري شدند. پس از جوانه زني بذور، ريزنمونه هاي هيپوكوتيل و كوتيلدون از گياهچه هاي ۸ روزه و ريزنمونه برگچه اوليه از گياهچه-هاي ۱۰ روزه تهيه شدند. ريزنمونه ها در محيط كشت MS حاوي تركيبی از غلظت هاي مختلف BAP (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ميلي گرم در ليتر) و IBA (۰، ۰/۱ و ۰/۵ ميلي گرم در ليتر) به همراه محيط فاقد تنظيم كننده رشدی، تكميل شده با ۳ درصد ساكارز و ۰/۸٪ آگار كشت و در اتاقك رشد در دماي ۲۵ درجه سانتی-گراد و دوره نوري (۱۶/۸) با شدت نور ۵۰۰۰ لوکس نگهداري شدند. اين آزمايش در قالب فاكوريل سه عاملی بر پايه طرح كاملا تصادفی با چهار تكرر و هر تكرر شامل شش ريزنمونه اجرا گرديد. ريزنمونه ها هر دو هفته يك بار به محيط كشت جديد منتقل شدند. صفات درصد اندام زايي و تعداد شاخساره به ازاي هر ريزنمونه پس از شش هفته يادداشت برداري شدند.

شاخساره هاي باززا شده براي ريشه زايي به محيط كشت MS ۱/۲ حاوي يك ميلي گرم در ليتر تنظيم كننده رشدی IBA، دو درصد ساكارز و ۰/۸٪ آگار منتقل شدند. براي سازگاري گياهان به شرايط محيطی آزاد نيز گياهچه هاي ريشه دار شده به گلدان هاي كوچك حاوي بستر استريل متشكل از پرليت و ورمی كولييت (۱:۱) انتقال يافت و به مدت يك هفته با محلول هوگلند آبياري شدند. در اين مرحله گلدان ها درون پوشش پلاستيکی قرار گرفتند و با گذشت زمان به حذف تدريجي پوشش پلاستيکی اقدام شد. پس از استقرار كامل گياه، انتقال به بستر طبيعي (شن و ماسه با خاك زراعی) صورت گرفت (شكل ۵- H و I).

براي تجزيه آماری داده ها، ابتدا مفروضات تجزيه واريانس مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نرمال نبودن توزيع انحرافات، از تبديل به زاويه داده ها استفاده گرديد. همچنين با توجه به مشابه بودن نتايج، از داده هاي اصلي در تجزيه ها و رسم نمودارها استفاده گرديد. تجزيه آماری در قالب فاكوريل سه عاملی بر پايه طرح كاملا تصادفی صورت گرفت. مقايسه ميانگين ها توسط آزمون دانكن در سطح احتمال ۱٪ انجام شدند. براي تجزيه و تحليل داده ها در اين پژوهش از نرم افزار MSTATC و براي رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گرديد. همچنين براي محاسبه صفات مورد مطالعه از رابطه هاي زير استفاده شد:

$$\text{درصد اندام زايي} = (\text{تعداد كل ريز نمونه ها} / \text{تعداد ريزنمونه هاي باززا شده}) \times 100$$

$$\text{تعداد شاخساره باززا شده به ازاي هر ريزنمونه} = (\text{تعداد كل ريزنمونه ها} / \text{تعداد كل شاخساره هاي باززا شده})$$

Results and Discussion

نتايج و بحث

بذور سويا (ويليامز، ساری و DPX) چهار روز پس از كشت در محيط MS، جوانه زده و شروع به رشد كردند. ريزنمونه ها (هيپوكوتيل و كوتيلدون و برگچه اوليه) از جوانه هاي استريل جدا شده و در محيط كشت MS حاوي تنظيم كننده هاي رشد گياهي مختلف كشت شدند (شكل ۵- C).

تجزيه واريانس داده ها براي صفات اندام زايي در محيط كشت MS داراي غلظت هاي مختلف هورموني نشان داد كه برهم كنش رقم، ريزنمونه و تركيب مواد تنظيم كننده رشدی و همه اثرات متقابل دو جانبه و سه جانبه در سطح احتمال يك درصد براي همه صفات مورد مطالعه داراي اختلاف معنی دار بودند (جدول ۱).

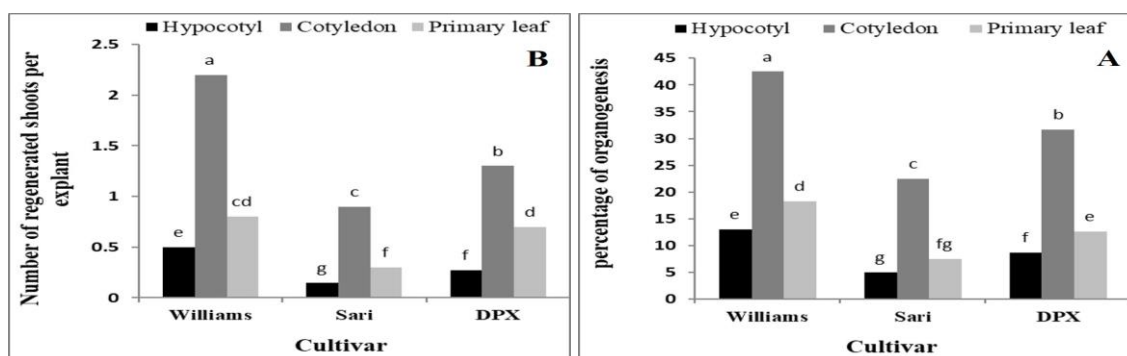
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در اندام‌زایی درون شیشه‌ای سویا.

Table 1. Analysis of variance of the studied traits in in vitro organogenesis of soybean

MS		df	S.O.V
Number of shoot per explant	Percentage of organogenesis		
30.48**	557.43**	2	Cultivar
37.67**	903.7**	2	Explant
48.28**	368.53**	12	Hormonal treatment
13.61**	148.6**	4	Cultivar× Explant
11.52**	42.06**	24	Cultivar× Hormonal treatment
8.08**	34.76**	24	Explant× Hormonal treatment
3.73**	9.06**	48	Cultivar× Explant× Hormonal treatment
0.94	2.13	351	Error
13.5	18.1		(%) CV

** Significant at 0.01 probability levels. در سطح احتمال ۱ درصد. ** معنی داری در سطوح احتمال ۱ درصد.

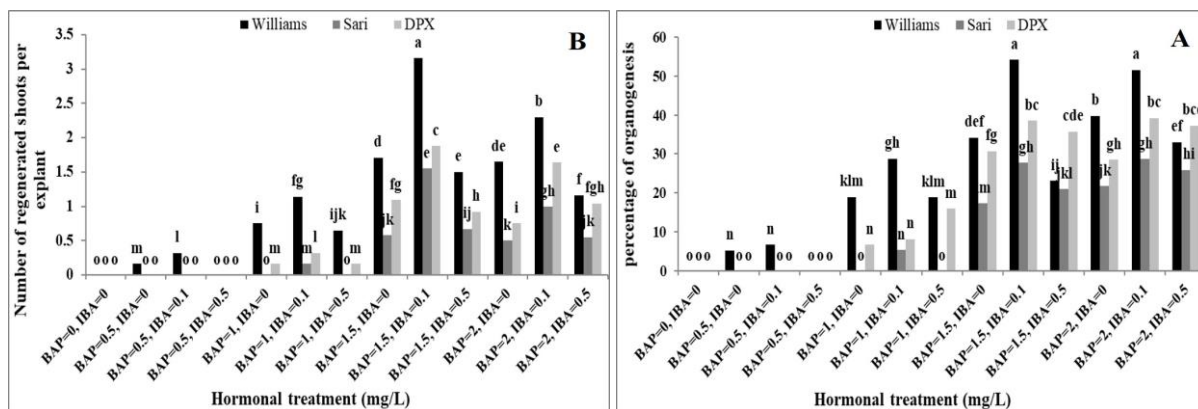
به منظور برآورد اثرات عوامل مورد مطالعه، مقایسه میانگین داده‌ها با روش دانکن برای صفات مذکور انجام شد. با توجه به معنی‌داری اثرات متقابل دو جانبه و سه جانبه، مقایسه میانگین اثرات اصلی کنار گذاشته شدند. مقایسه میانگین اثرات متقابل دو جانبه نشان داد، همه اثرات متقابل دو جانبه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. بررسی مقایسه میانگین اثر متقابل رقم با ریزنمونه نشان داد که بیشترین درصد اندام‌زایی (۴۱ درصد) و تعداد شاخساره به ازای هر ریزنمونه (۲/۲) مربوط به ریزنمونه کوتیلدون رقم ویلیامز بود و کمترین درصد اندام‌زایی (۵ درصد) و تعداد شاخساره به ازای هر ریزنمونه در ریزنمونه هیپوکوتیل رقم ساری مشاهده شد (شکل ۱). مقایسه میانگین اثر متقابل رقم با ترکیب هورمونی نشان داد که بیشترین درصد اندام‌زایی (۵۳ درصد) در رقم ویلیامز و در محیط‌های حاوی ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل شد. همچنین بیشترین تعداد شاخه تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه (۳/۱) در رقم ویلیامز و در محیط حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بدست آمد (شکل ۲). بررسی اثر متقابل ریزنمونه با ترکیب هورمونی نیز نشان داد بیشترین درصد اندام‌زایی (۷۶ درصد) و تعداد شاخساره باززا شده به ازای هر ریزنمونه (۳/۹) مربوط به ریزنمونه کوتیلدون در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بود (شکل ۳).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و ریزنمونه بر درصد اندام‌زایی (A) و تعداد شاخساره تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه (B).

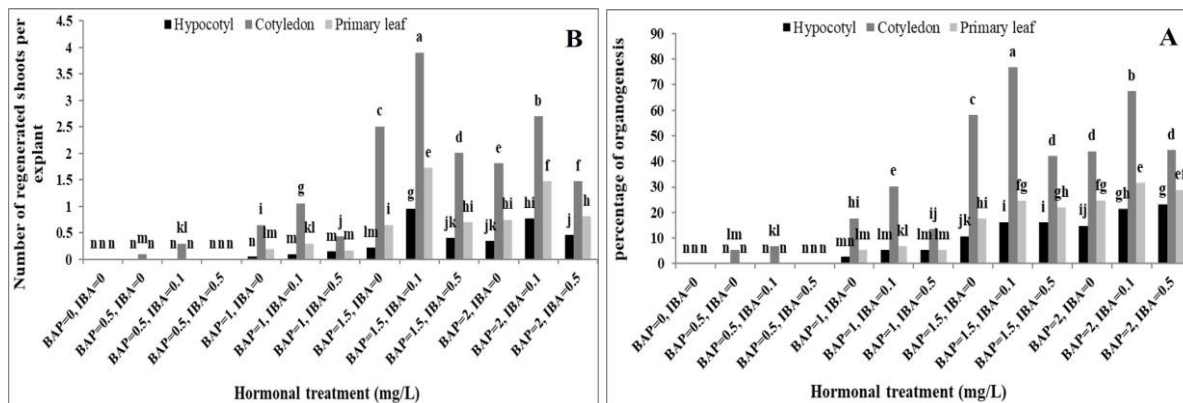
Fig 1. Mean comparisons of the percentage of organogenesis (A) and number of regenerated shoots per explant (B) of the interaction between cultivar and explant

*حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی بر درصد اندام‌زایی (A) و تعداد شاخساره تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه (B).
Fig 2. Mean comparisons of the percentage of organogenesis (A) and number of regenerated shoots per explant (B) of the interaction between cultivar and hormonal treatment

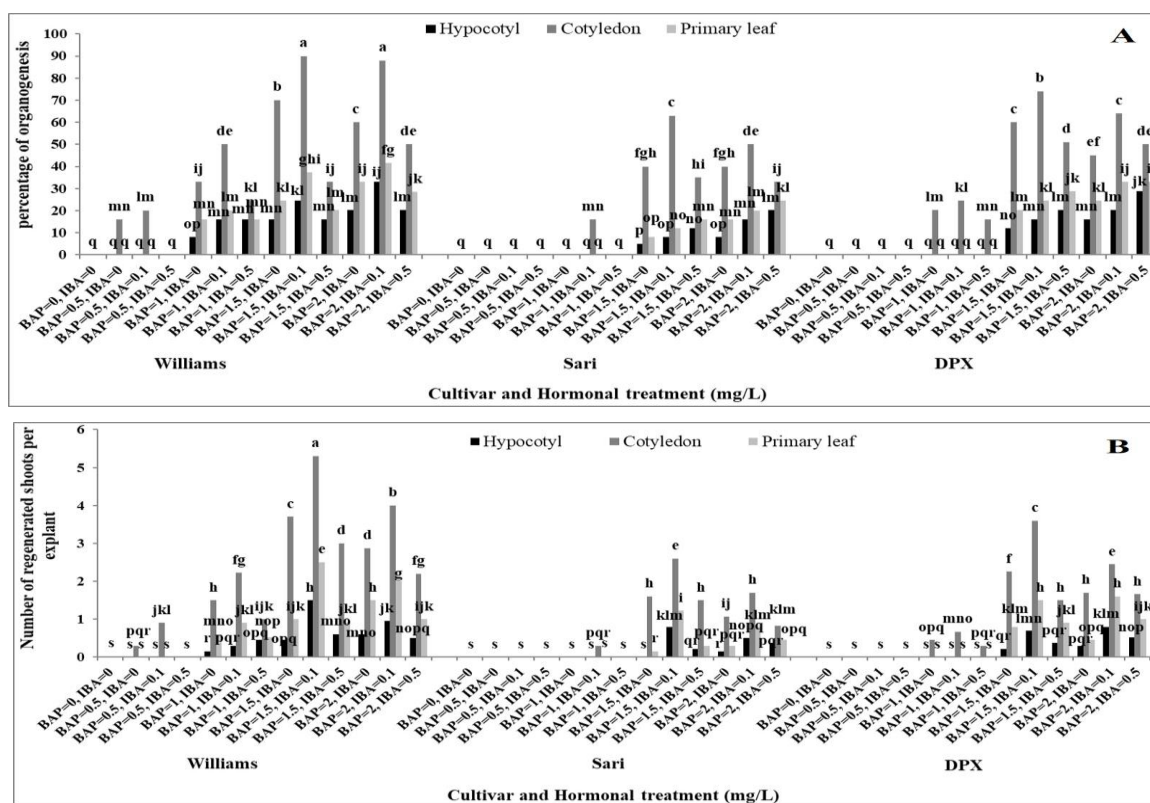
*حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می باشد



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی بر درصد اندام‌زایی (A) و تعداد شاخساره تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه (B).
Fig 3. Mean comparisons of the percentage of organogenesis (A) and number of regenerated shoots per explant (B) of the interaction between explant and hormonal treatment

*حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می باشد

مقایسه میانگین اثر متقابل سه جانبه رقم، ریزنمونه و تیمار هورمونی نشان داد، افزایش غلظت تنظیم کننده رشدی سیتوکینین BAP تاثیر مثبتی بر روی اندام‌زایی ریزنمونه‌های مختلف ارقام سویا داشت ولی افزایش غلظت IBA تاثیر منفی روی اندام‌زایی به همراه داشت. بهترین ترکیب هورمونی برای شاخه‌زایی در سویا در ارقام مورد مطالعه ترکیب غلظت بالای BAP با غلظت حداقلی اکسین IBA بود. به طوریکه بیشترین درصد اندام‌زایی (۹۰ درصد) مربوط به ریزنمونه کوتیلدون رقم ویلیامز کشت شده در محیط‌های حاوی ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA بدست آمد (شکل ۴- A). همچنین بیشترین تعداد شاخساره تشکیل شده (۵/۳) برای ریزنمونه کوتیلدون رقم ویلیامز در محیط MS حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA بود (شکل ۴- B).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم، ریزنمونه و تیمار تنظیم کننده رشد گیاهی بر درصد اندام‌زایی (A) و تعداد شاخساره تشکیل شده به ازای هر ریزنمونه (B).

Fig 4. Mean comparisons of the percentage of organogenesis (A) and the number of regenerated shoots per explant (B) of the threefold interaction of cultivar, explant and hormonal treatment

*حروف مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می باشد.

در این مطالعه ظرفیت شاخه‌زایی سه رقم سویای تجاری در ایران با استفاده از سه ریزنمونه مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. هرچند برخی گزارشات جوانه زنی بذور سویا در محیط حاوی سیتوکینین را توصیه می‌کنند (Raza *et al.*, 2017) ولی در این مطالعه بذور سویا در محیط کشت بدون سیتوکینین جوانه‌زنی خوبی را به همراه کیفیت مناسب ریزنمونه‌های مورد نیاز داشتند (شکل ۵- A و B). همه ریزنمونه‌ها در عرض یک هفته پس از کشت در محیط‌های کشت اندام‌زایی شروع به انبساط و تورم کردند. متعاقباً با گذشت زمان القای جوانه شاخه یا کالوس در ریزنمونه‌ها شروع شدند. پس از دو مرحله واکنش، ریزنمونه‌های دارای کالوس که شاخساره ایجاد نکرده بودند به رنگ قهوه‌ای تیره درآمده و حذف شدند.

قابلیت اندام‌زایی ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌ها در محیط‌های مختلف متفاوت بود. بیشترین اندام‌زایی در رقم ویلیامز با استفاده از ریزنمونه کوتیلدون در حضور غلظت بالای سیتوکینین و مقدار حداقلی اکسین مشاهده شد. این افزایش در رقم ویلیامز بیشتر از دو رقم DPX و ساری بود. همچنین ریزنمونه‌های کوتیلدون در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها در این زمینه بازدهی بیشتری داشته و تعداد شاخه‌های باززا شده در ریزنمونه‌های کوتیلدون به صورت قابل توجهی بیشتر از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگچه اولیه بودند. کمترین میزان شاخه‌زایی در ریزنمونه هیپوکوتیل مشاهده شد (شکل ۵- D, E و F).

تفاوت میزان اندام‌زایی بین ارقام مختلف ممکن است به دلیل وجود سطوح مختلف هورمون‌های درون‌زا و مواد غذایی در بخش‌های مختلف ریزنمونه‌ها باشد، که واکنش ارقام مختلف به شاخه‌زایی را تحت تأثیر قرار داده باشند (Khai *et al.*, 2021; Saeedpour *et al.*, 2021). همچنین همه سلول‌ها از توانایی یکسانی برای تبدیل شدن به گیاه کامل برخوردار نیستند و در اکثر مطالعات از سلول‌ها یا بافت‌هایی با سرعت رشد و تقسیم بالا به عنوان ریزنمونه استفاده می‌کنند. ماهیت و منشا ریزنمونه نقش عمده‌ای در موفقیت کشت درون‌شیشه‌ای گیاهان

ايفا مي كنند (Martini *et al.*, 2022). صرف نظر از نوع ريزنمونه، معمولاً تقسيم سلولي اوليه از بخش هاي جوان و نزديك كامبيوم و دستجات آوندي شروع مي شود (Lee *et al.*, 2020). همچنين بخش اصلي ساختار گياهان جوان، بافت هاي پارانشيمي است و سلول ها در اين بافت ها، كم و بيش وضعيت مريستمي دارند كه معمولاً انعطاف پذيري بيشتري در شرايط درون شيشه اي از خود نشان مي دهند (Yang *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2022).

باززايي گياهان تحت تاثير عوامل مختلفي از جمله ژنوتيب گياهي، نوع ريزنمونه، محيط كشت، تنظيم كننده هاي رشد گياهي و غيره قرار دارند (Raza *et al.*, 2019). در اين ميان، ژنوتيب نقش اساسي را در باززايي ايفا مي كند كه براي هر گونه بايد شرايط كشت بافت، جهت باززايي بهينه شود (Sehaole and Mangena, 2024). گزارشات متعدد بر اين نكته تأكيد دارند كه باززايي در سويا به شدت وابسته به ژنوتيب است، حتي نوع و سن ريزنمونه نيز در باززايي سويا مؤثر مي باشند (Vargas-Almendra *et al.*, 2024). پژوهشگران از قسمت هاي مختلف سويا از جمله هيپوكوتيل، كوتيلدون، جنين و غيره به عنوان ريزنمونه براي باززايي سويا استفاده کرده اند (Xu *et al.*, 2022). فرانكلين و همكاران (Franklin *et al.*, 2004) گزارش کرده اند كه ميزان باززايي هيپوكوتيل به مراتب بيشتري از ريزنمونه كوتيلدون است. همچنين ليو و همكاران (Liu *et al.*, 2004) براي باززايي و تراريختي برخي ارقام چيني سويا، از ريزنمونه مريستم ساقه استفاده کرده اند. در حاليكه تيواري و همكاران (Tiwari *et al.*, 2023) ريزنمونه كوتيلدون را مناسب براي باززايي و تراريختي سويا گزارش کرده اند.

رازا و همكاران (Raza *et al.*, 2017) تاثير ژنوتيب و ريزنمونه بر القاي باززايي، با استفاده از ريزنمونه هاي مختلف 9 رقم سوياي استراليايي را مورد بررسي قرار دادند. نتايج نشان دهنده نقش مهم ژنوتيب و ريزنمونه در فرآيند باززايي سويا بودند. به طوريكه بيشتري ميزان باززايي را در رقم Bunya با استفاده از ريزنمونه هيپوكوتيل و رقم PNR791 با ريزنمونه كوتيلدون گزارش کرده اند. همچنين در برخي گزارشات، ريزنمونه كوتيلدون بيشتري كاري را در باززايي و انتقال ژن به سويا داشته است (Xu *et al.*, 2022). نتايج مطالعه ما در سه ژنوتيب مورد نظر، مطابق با نتايج بدست آمده از اين دو گروه بودند و رقم ويليامز با استفاده از ريزنمونه كوتيلدون با اختلاف زيادي بهترين ژنوتيب و ريزنمونه از نظر ميزان اندام زايي بودند.

در اين پژوهش اندام زايي در سويا تحت تاثير غلظت و نوع تنظيم كننده هاي رشد گياهي قرار داشت. به طوريكه با افزايش غلظت BAP شاهد افزايش شاخه زايي و با افزايش غلظت IBA شاهد کاهش شاخه زايي در ريزنمونه هاي مختلف ارقام مورد مطالعه بوديم. تنظيم كننده هاي رشد گياهي از ديگر عوامل مؤثر در باززايي گياهان بشمار مي آيند. وجود غلظت متعادلي از سيتوكينين ها و اكسين ها نقش بسزايي در تمايز سلولي و باززايي گياهان دارند. سيتوكينين ها به ويژه BAP معمولاً موجب تحريك سلول ها شده و نقش بسيار مهمي در شاخه زايي بسياري از گونه هاي گياهي ايفا مي كنند (Muzika *et al.*, 2024). منگنا و همكاران (Mangena *et al.*, 2015) گزارش کرده اند كه در سويا علاوه بر ژنوتيب و ريزنمونه، تنظيم كننده هاي رشد گياهي نيز در باززايي مؤثر مي باشند و استفاده از BAP در مقايسه با تركيب آن با KIN در القاي شاخه زايي مؤثرتر بوده است.

پات و همكاران (Phat *et al.*, 2015) بيشتري ميزان شاخه زايي دو رقم كره اي سويا را در ريزنمونه كوتيلدون و در غلظت يك ميلي گرم در ليتر BAP گزارش کرده اند. بگوم و همكاران (Begum *et al.*, 2019) از بين تنظيم كننده هاي مختلف رشدی، بيشتري ميزان باززايي رقم BARI-5 سويا را در ريزنمونه كوتيلدون و غلظت 1/5 ميلي گرم در ليتر BAP مشاهده کرده اند. كه با نتايج ما مطابقت دارد. همچنين منگنا (Mangena, 2021) از غلظت 8/87 ميكرومولار BAP براي شاخه زايي سويا استفاده کرده اند. در حالي كه ما و وو (Ma and Wu, 2008) بيشتري ميزان القاي شاخه سويا را در غلظت 0/4 ميلي گرم در ليتر BAP اعلام کرده اند. شان و همكاران (Shan *et al.*, 2005) بيشتري ميزان القاي شاخه را در غلظت يك ميلي گرم در ليتر TDZ گزارش کرده اند. رازا و همكاران (Raza *et al.*, 2017) استفاده از تركيب يك ميلي گرم در ليتر زآتين به همراه 0/1 ميلي گرم در ليتر IAA را براي باززايي سويا توصيه کرده اند. همچنين خان و همكاران (Khan *et al.*, 2024) تركيب

۱/۳ میلی گرم در لیتر BAP با ۰/۳ میلی گرم در لیتر KIN و ۰/۳ میلی گرم در لیتر جیبرلیک اسید را برای باززایی ریزنمونه کوتیلدون سویا استفاده کرده‌اند.

در این مطالعه بهترین ترکیب هورمونی برای شاخه‌زایی سویا در ارقام مورد مطالعه، ترکیب غلظت بالای BAP با حداقل غلظت اکسین IBA بود. هرچند بیشترین میزان اندام‌زایی در ترکیب BAP و IBA حاصل شد، ولی محیط بدون اکسین با سطوح بالای BAP نیز شاخه‌زایی خوبی را نشان داد و در جایگاه دوم اندام‌زایی قرار داشت. البته نتایج این پژوهش در مقایسه با مطالعات دیگری که منحصراً از BAP استفاده کرده بودند، هم از نظر تعداد شاخه باززا شده و هم کیفیت شاخه‌های تولیدی به مراتب بهتر بود. اکسین‌ها یکی از مهمترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی هستند که در جنین‌زایی بسیاری از گونه‌ها در کشت بافت نقش تعیین‌کننده‌ای دارند. اگرچه جنین‌زایی سوماتیکی توسط اکسین بیرونی آغاز می‌شود، ولی وقوع بیشتر آن نیازی به اکسین ندارد. می‌توان چنین استدلال کرد، احتمالاً اکسین بیرونی سنتز اکسین درونی را تقویت می‌کند و در نتیجه افزایش اکسین درونی باعث جنین‌زایی و باززایی می‌شوند (Long et al., 2022).



شکل ۵- مراحل مختلف کشت بافت سویا. (A) جوانه‌زنی بذور سویا در شرایط درون‌شیشه‌ای، (B) نهال‌های جوانه‌زده سویا، (C) کشت ریزنمونه‌های مختلف سویا، (D) باززایی شاخساره از ریزنمونه کوتیلدون رقم ویلیامز، (E) باززایی شاخساره از ریزنمونه هیپوکوتیل رقم ویلیامز، (F) باززایی شاخساره از ریزنمونه برگچه اولیه رقم ویلیامز، (G) ریشه‌زایی شاخساره‌های تشکیل شده، (H) سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار، (I) انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک.

Fig 5. Different stages of soybean tissue culture. A) Germination of soybean seeds in in vitro, B) Seedlings of germinated soybean, C) Cultivation of different soybean explants, D) Shoot regeneration from cotyledon explant of Williams cultivar, E) Shoot regeneration from hypocotyl explant of Williams cultivar, F) Shoot regeneration from primary leaf explant of Williams cultivar, G) Rooting of formed shoots, H) Acclimation of rooted plantlets, I) Transfer of rooted plantlets to soil.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت تولید سویا در کشور و با در نظر گرفتن این مطلب که فراوانی اندام‌زایی در حبوبات تحت تأثیر ژنوتیپ است و از طرفی فقدان اطلاعات مورد نیاز در مورد ارقام تجاری کشت شده در ایران، بهینه‌سازی شاخه‌زایی درون‌شیشه‌ای ارقام مختلف سویا امری ضروری به نظر می‌رسد. نتایج این مطالعه نشان داد که هرچند رقم ویلیامز به خاطر میزان اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای بالایی که دارد یک رقم مناسب برای انتقال ژن به سویا می‌باشد، ولی ارقام DPX و ساری نیز به عنوان ارقام پر محصول از قابلیت اندام‌زایی نسبتاً مناسبی برخوردار هستند و می‌توانند در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی سویا مورد استفاده قرار گیرند. ریزنمونه کوتیلدون به خاطر درصد بالای شاخه‌زایی و تعداد شاخه باززا شده بیشتر به ازای ریزنمونه، بهترین ریزنمونه در کشت بافت سویا می‌باشد. همچنین استفاده از ترکیبات مختلف اکسین و سیتوکینین نشان داد که استفاده از یک اکسین ضعیف با غلظت بسیار پایین در کنار سیتوکینین، قدرت اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای سویا را به صورت معنی‌داری بهبود بخشید.

تقدیر و تشکر: از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تامین هزینه این مطالعه از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

References

- Arun, M., Chinnathambi, A., Subramanyam, K., Karthik, S., Sivanandhan, G., Thebora, J., Alharbi, S. A., Kim, C. K., & Ganapathi, A. (2016). Involvement of exogenous polyamines enhances regeneration and Agrobacterium-mediated genetic transformation in half-seeds of soybean. *Biotechnology Journal*, 6(2), 1-12. doi:10.1007/s13205-016-0448-0
- Babaei, S., Ebrahimie, E., Niazi, A., & Nezamivand Chegini, M. (2021). Identification of soybean circular RNAs in response to low nitrogen and phosphorus stresses. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 9(2), 105-115. doi:20.1001.1.25885073.1399.9.2.3.8 [In Persian]
- Begum, N., Zenat, E. A., Sarkar, M. K. I., Roy, C. K., Munshi, J. L., & Jahan, M. A. A. (2019). In vitro micro propagation of soybean (*Glycine max*) BARI-5 variety. *Open Microbiology Journal*, 13, 177-187. doi:10.2174/1874285801913010177
- Franklin, G., Carpenter, L., & Davis, E. (2004). Factors influencing regeneration of soybean from mature and immature cotyledons. *Plant Growth Regulation*, 43, 73-79. doi:10.1023/B: GROW. 0000038359. 86756. 18
- Khai, H. D., Bien, L. T., Vinh, N. Q., Dung, D. M., Nghiep, N. D., Mai, N. T. N., Tung, H. T., Luan, V. Q., Cuong, D. M., & Nhut, D. T. (2021). Alterations in endogenous hormone levels and energy metabolism promoted the induction, differentiation and maturation of Begonia somatic embryos under clinorotation. *Plant Science*, 312, 1-10. doi:10.1016/j.plantsci.2021.111045
- Khan, M. W., Shaheen, A., Zhang, X., Zhang, J., Dewir, Y. H., & Magyar-Tabori, K. (2024). Generation and assessment of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) hybrids for high-efficiency Agrobacterium-mediated transformation. *Life*, 14(12), 1-13. doi:10.3390/life14121649
- Lee, M. H., Lee, J., Jie, E. Y., Choi, S. H., Jiang, L., Ahn, W. S., Kim, C. Y., & Kim, S. W. (2020). Temporal and spatial expression analysis of shoot-regeneration regulatory genes during the adventitious shoot formation in hypocotyl and cotyledon explants of tomato (Cv. Micro-Tom). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1-17. doi:10.3390/ijms21155309
- Liu, H. K., Yang, C., & Wie, Z. M. (2004). Efficient Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta*, 219(6), 1042-1049. doi:10.1007/s00425-004-1310-x
- Long, Y., Yang, Y., Pan, G. and Shen, Y. (2022). New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-15. doi:10.3389/fpls.2022.926752
- Ma, X. H., & Wu, T.L. (2008). Rapid and efficient regeneration in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] from whole cotyledonary node explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 209-216. doi:10.1007/s11738-007-0109-3
- Mangena, P. (2021). Analysis of correlation between seed vigour, germination and multiple shoot induction in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Heliyon*, 7(9), 1-9. doi:10.1016/j.heli yon.2021.e07913
- Mangena, P., Mokwala, P. W., & Nikolova, R. V. (2015). In vitro multiple shoot induction in soybean. *International Journal of Agriculture and Biology*, 17, 838-842. doi:10.17957/IJAB/ 14.0006.
- Martini, A. N., Vlachou, G., & Papafotiou, M. (2022). Effect of explant origin and medium plant growth regulators on in vitro shoot proliferation and rooting of *Salvia tomentosa*, a native sage of the northeastern Mediterranean basin. *Agronomy*, 12(8), 1-17. doi:10.3390/agronomy12 081889
- Mehrizadeh, V., Dorani, E., Mohammadi, A., & Ghareyazi, B. (2021). Study on the factors affecting Agrobacterium-mediated transformation of soybean. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 9(2), 225-236. doi: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.13.8 [In Persian]
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Plant Physiology*, 15(3), 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Muzika, N. S., Kamai, T., Williams, L. E., & Kleiman, M. (2024). Characterization of gelling agents in callus inducing media: Physical properties and their effect on callus growth. *Physiologia Plantarum*, 176(2), 1-13. doi:10.1111/ppl.14312
- Phat, P., Rehman, S. U., Jung, H. I., & Ju, j. (2015). Optimization of soybean (*Glycine max* L.) regeneration for korean cultivars. *Pakistan Journal of Botany*, 47(6), 2379-2385.

- Rao, S. S., & Hildebrand, D. (2009). Changes in oil content of transgenic soybeans expressing the yeast SLC1 gene. *Lipids*, 44(10), 945-951. doi:10.1007/s11745-009-3337-z
- Raza, G., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2017). In Vitro plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *BioMed Research International*, 1, 1-9. doi:10.1155/2017/7379693
- Raza, G., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2019). Somatic embryogenesis and plant regeneration from commercial soybean cultivars. *Plants*, 9(1), 1-10. doi:10.3390/plants9010038
- Saeedpour, A., Jahanbakhsh-Godehkahriz, S., Lohrasebi, T., Esfahani, K., Salmanian, A. H., & Razavi, K. (2021). The effect of endogenous hormones, total antioxidant and total phenol changes on regeneration of barley cultivars. *Iranian Journal of Biotechnology*, 19(1), 30-39. doi:10.30498/IJB.2021.2838
- Sehaole, E. M. K., & Mangena, P. (2024). N6-benzyladenine (BAP)-based seed preconditioning enhances the shoot regeneration of seedling-derived explants for subsequent indirect gene transfer in soybeans (*Glycine max* [L.] Merrill.). *International Journal of Plant Biology*, 15(2), 254-266. doi:10.3390/ijpb15020022
- Shan, Z., Raemakers, K., Tzitzikas, E. N., Ma, Z., & Visser, R. G. F. (2005). Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Plant Cell Reports*, 24(9), 507-512. doi:10.1007/s00299-005-0971-7
- Sojkova, J., Zur, I., Gregorova, Z., Zimova, M., Matusikova, I., Mihalik, D., Kraic, J., & Moravcikova, J. (2016). In vitro regeneration potential of seven commercial soybean cultivars (*Glycine max* L.) for use in biotechnology. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15(1), 1-11. doi:10.1515/nbec-2016-0001
- Tiwari, R., Singh, A. K., & Rajam M. V. (2023). Improved and reliable plant regeneration and *Agrobacterium-mediated* genetic transformation in soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 26(3), 1-10. doi:10.1007/s12892-022-00179-9
- Vargas-Almendra, A., Ruiz-Medrano, R., Nunez-Munoz, L. A., Ramirez-Pool, J. A., Calderon- Perez, B., & Xoconostle-Cazares, B. (2024). Advances in soybean genetic improvement. *Plants*, 13(21), 1-25. doi:10.3390/plants13213073
- Walne, C. H., Alsajri, F. A., Gajanayake, B., Lokhande, S., Seepaul, R., Wijewardana, C., & Reddy, K. R. (2020). In vitro seed germination response of corn, cotton, and soybean to temperature. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences*, 65(3), 374-384
- Wang, Y., Li, Z., Chen, X., Gu, Y., Zhang, L., & Qiu, L. (2022). An efficient soybean transformation protocol for use with elite lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151, 457-466. doi:10.1007/s11240-022-02312-6
- Xu, H., Guo, Y., Qiu, L., & Ran, Y. (2022). Progress in soybean genetic transformation over the last decade. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1-33. doi:10.3389/fpls.2022.900318
- Yang, C., Zhao, T., Yu, D., & Gai, J. (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration in Chinese soybean (*Glycine max* L.) impacts of mannitol, abscisic acid, and explants age. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45(2), 180-188. doi:10.1007/s11627-009-9205-y
- Zhong, H., Li, C., Yu, W., Zhou, H. P., Lieber, T., Su, X., Wang, W., Bumann, E., Lunny-Castro, R.M., Jiang, Y., Gu, W., Liu, Q., Barco, B., Zhang, C., Shi, L., & Que, Q. (2024). A fast and genotype-independent in planta *Agrobacterium-mediated* transformation method for soybean. *Plant Communications*, 5(12), 1-13. doi:10.1016/j.xplc.2024.101063