بررسی اثر ریزنمونه و سطوح مختلف اکسین و سیتوکینین بر ریخت زایی سویا

احمد شریفی- عبدالرضا باقری- سعیدرضا وصال[1]

تاریخ دریافت ۸۲/۹/۲۶

چکیده

به منظور انتخاب بهترین ریزنمونه و محیط کشت مناسب جهت ریخت زایی در سویا, آزمایشهای جداگانه ای شامل ۱) اثر ریزنمونه (محور زیر لپه, محور بالای لپه, گره لپه, گره لپه همراه با برگچه اولیه, برگچه, برگ, محور جنینی نابالغ, جنین نابالغ و محور جنینی بالغ) و نوع ترکیب هورمونی محیط کشت باززایی (محیط کشتMS حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IAA یا ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیترNAA, ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار) و ۲) اثر مقادیر مختلف دو هورمون BA (۰/۵, ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) و IAA (۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) بر ریخت زایی و القای کالوس انجام شد. نتایج نشان داد که ریزنمونه‌های مختلف عکس العمل‌های متفاوتی نسبت به دو محیط کشت باززایی نشان می‌دهند و بین دو محیط کشت نیز اختلاف معنی داری وجود دارد بطوری که ریزنمونه گره لپه و پس از آن گره لپه همراه با برگچه اولیه در محیط کشت حاوی BA و IAA بیشترین درصد شاخه‌زایی (به ترتیب ۷۷ و ۷۰ درصد) و تعداد شاخه تولید شده (۲/۸ و ۲/۵ عدد) را در بر داشت. با این حال از نظر حجم کالوس تولیدی اختلاف معنی داری بین دو محیط کشت وجود نداشت. از سوی دیگر بین ریزنمونه‌های مختلف از نظر پاسخ به محیط کشت اختلاف معنی داری وجود داشت و ریزنمونه گره لپه همراه با برگچه اولیه بیشترین حجم کالوس را تولید کرد. براساس نتایج آزمایش دوم مقادیر یک تا دو میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ تا یک میلی گرم در لیتر IAA بعنوان بهترین سطوح این دو هورمون معین شد ند.

واژه‌های کلیدی: ریخت زایی، کالوس، BA ، IAA ، سویا.

مقدمه

سویا از مهمترین منابع تامین کننده پروتئین و روغن نباتی جهان بوده و مطالعات نسبتا زیادی در شرایط این ویترو بر روی این گیاه صورت گرفته است. برای باززایی سویا تحت شرایط این ویترو از دو روش جنین زایی سوماتیکی و ریخت زایی استفاده شده است(۶ و ۷). شاخه زایی در سویا برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ توسط رایت و همکاران(۱۱) از ریزنمونه گره لپه و بارویل و همکاران(۱) از ریزنمونه جنین نارس گزارش شد. غالبا از دو محیط کشت پایه B5 یا MS برای اندام زایی در سویا استفاده شده است. رایت وهمکاران (۱۲) در مطالعه اندام‌زایی در سویا اثر جایگزینی سیتوکینین هایی مانند زآتین, دی هیدروزآتین, زآتین ریبوزید, ۲ ایزوپنتنیل آدنین (2ip), بنزیل آدنین ریبوزاید و کینتین را به جای هورمون بنزیل آدنین بررسی و نتیجه گرفتند که در مقایسه با بنزیل آدنین فقط جایگزینی بنزیل آدنین ریبوزید و کینتین در سطوح بالا می‌تواند موجب شاخه زایی شود. در آزمایش دیگری که توسط کیم و همکاران (۷) انجام شد اثر چندین ریزنمونه(لپه, محور زیر لپه, گره لپه و برگچه اولیه) و

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد سابق، استاد و عضو هیأت علمی پژوهشکده علوم گیاهی

چند نوع سیتوکینین (کینتین، زآتین، AP، 2iP، BAP و TDZ) بر اندام زایی مورد بررسی قرار گرفت و بهترین ریزنمونه، ریزنمونه برگچه اولیه و بهترین سیتوکینین، زآتین (یک میلی گرم در لیتر) و پس از آن بنزیل آدنین معرفی شد که بیشترین اندام زایی را در ریزنمونه‌ها القاء می‌کند. گزارش‌های متعددی بر این نکته تاکید دارند که شاخه زایی در سویا بشدت تحت تاثیر واریته و نوع ریزنمونه قرار می‌گیرد (۷ و ۱۱) بطوری که جهت شاخه زایی در سویا از ریزنمونه‌های گره لپه (۱۱)، جنین نارس (۱ و ۲)، برگچه اولیه (۷)، لپه و گره اولین برگ (۱، ۲، ۸ و ۱۲) استفاده شده است. در اکثر آزمایشها استفاده از BA در محیط کشت برای تحریک شاخه زایی مورد تاکید قرار گرفته است (۱، ۲، ۱۰ و ۱۳). همچنین در آزمایشهای توم و همکاران(۱۰) و کیم و همکاران(۷) قید شده است که با حضور اکسین در محیط کشت، شاخه زایی تحریک می‌شود. از آنجائیکه مطالعات مختلف حاکی از آنست که شاخه زایی در سویا بشدت تحت تاثیر نوع ریزنمونه، رقم و ترکیبات هورمونی محیط کشت قرار می‌گیرد. لذا به نظر می‌رسد قبل از هر گونه تلاشی در کشور به منظور استفاده از این تکنیک در بهبود سویا لازم است آزمایشی با هدف بررسی عکس العمل ریزنمونه‌های مختلف نسبت به دو محیط کشت باززایی حاویBA و دو نوع اکسین متفاوت (IAA وNAA) و در نهایت معرفی محیط کشت مناسب شاخه زایی انجام گیرد.

مواد و روشها

در این مطالعه ابتدا انواع ریزنمونه‌ها و مقادیر مختلف هورمونی BA و دو نوع اکسین IAA و NAA در شاخه‌زایی سویا مورد بررسی قرار گرفت. نخست برای مشخص کردن بهترین ریزنمونه و ترکیب هورمونی، آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور، ریزنمونه و ترکیب هورمونی در ده تکرار و نه ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. در مرحله بعد برای ارزیابی اثر سطوح مختلف هورمونهای BA و دو نوع اکسین IAA و NAA در شاخه‌زایی، آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور مقادیر هورمون‌های BA و دو نوع اکسین IAA و NAA در ده تکرار و نه ریزنمونه در هر تکرار به شرح زیر انجام شد. بذور سویای استفاده شده در این آزمایش رقم ویلیامز بود که از مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان تهیه شد. منابع تامین کننده ریزنمونه‌ها عبارتند از:

گیاهچه استریل: به منظور تهیه ریزنمونه‌های مناسب جهت کشت از گیاهچه‌های استریل، بذور سالم و یکنواخت سویا انتخاب و پس از شستشو با آب مقطر، جهت ضد عفونی سطحی، ۲۰۰ میلی لیتر محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به بذور اضافه و ۱۵ دقیقه بهم زده شدند. با حذف مایع ضد عفونی کننده در محفظه هود استریل، بذور با آب مقطر استریل، سه الی چهار مرتبه شستشو شدند. با اتمام ضد عفونی فوق تعداد چهار عدد بذر سالم به هر یک از ویالهای ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت آب و آگار با حفظ شرایط استریل انتقال یافت و در اتاقک رشد تحت شرایط دمایی ۲ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و فتوپریودی ۱۶: ۸ (روشنایی:تاریکی) با شدت نور ۵۰ میکرو مول بر متر مربع در ثانیه جهت تولید گیاهچه استریل نگهداری شدند. ریزنمونه‌های محور زیر لپه ،گره لپه ، برگچه اولیه همراه با گره لپه از گیاهچه‌های استریل ۵ روزه و ریزنمونه‌های محور روی لپه و برگ از گیاهچه‌های استریل ۹ روزه تهیه شدند.

بذور نارس: بذور رقم ویلیامز، در گلدانهایی به قطر ۳۰ سانتی متر کشت و در گلخانه تحت شرایط دمایی ۲۸ تا ۳۲ درجه سانتی گراد و فتوپریود۱۴:۱۰ (روشنایی:تاریکی) نگهداری شدند. چهارده روز پس از گلدهی غلافهای نارس حاوی جنین‌های ۴ تا ۵ میلی متری برداشت شده و ابتدا با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، و پس از حذف الکل، بلافاصله با افزودن ۲۰۰ میلی لیتر محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به غلافها به مدت ۱۵ دقیقه بهم زده شدند تا عمل ضدعفونی انجام شود. سپس مایع ضد عفونی کننده در محفظه هود استریل حذف و غلافها با آب مقطر استریل چهار مرتبه شستشو شدند. در نهایت، بذور نارس را از غلافها خارج کرده و ریزنمونه‌های جنین نابالغ (با حذف پوسته بذر) و محور جنینی (با حذف پوسته و لپه‌ها) از آنها تهیه شد.

بذور بالغ استریل : مراحل آماده سازی بذور استریل جهت تهیه ریزنمونه محور جنینی بالغ مانند مراحل تهیه

گیاهچه استریل بود. با این تفاوت که بعد از حذف هیپوکلریت سدیم یک درصد و شستشوی بذور با آب مقطر استریل در محفظه هود استریل، تعداد ۲۰ عدد بذر در هر پتری دیش استریل قرار گرفته و در حدود ۵ تا ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد. سپس جهت جلوگیری از آلودگی، درب هر یک از پتری دیش‌ها بوسیله پارافیلم کاملا مسدود گردیده و در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. با گذشت یک شب و جذب آب کافی توسط بذور، با حذف پوسته و لپه‌ها محور جنینی بالغ تهیه شد.

انتخاب ریزنمونه و شرایط کشت: ریزنمونه‌های محور زیر لپه (به طول ۲ تا ۳ میلی متر)، برگچه اولیه (به طول ۲ تا ۳ میلی متر)، نصف برگچه اولیه همراه با گره لپه (به طول ۳ تا ۴ میلی متر) از گیاهچه‌های استریل ۵ روزه و ریزنمونه‌های برگ (۳×۳ میلی متر)، محور بالای لپه (به طول ۲ تا ۳ میلی متر) از گیاهچه‌های استریل ۹ روزه تهیه شدند و سایر ریزنمونه‌های مورد استفاده شامل جنین نابالغ (به طول ۴ تا ۵ میلی متر) ، محور جنینی نابالغ (به طول ۲ تا ۳ میلی متر)و محور جنینی بالغ (به طول ۴ تا ۵ میلیمتر) بودند. ریزنمونه‌های مذکور در محیط کشت MS (pH= ۵/۸) حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IAA (محیط کشت BI) یا ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA (محیط کشت BN)، ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار کشت و در اتاقک رشد در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و فتوپریود۸:۱۶ (روشنایی:تاریکی) با شدت نور ۵۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه که بوسیله لامپهای فلورسنت سفید تامین می‌شد نگهداری شدند. چهار هفته بعد از واکشت اول، درصد کالوس هایی که شاخه زایی کرده بودند (۱۰۰×تعداد کل کالوسها / تعداد کالوسهای تولیدکننده شاخه) و تعداد شاخه‌های باززایی شده در هر یک از ریزنمونه مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد بهترین ریزنمونه انتخاب شده از مرحله قبل (گره لپه) و اثر سطوح مختلف هورمونهای BA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) و IAA (۰/۵و۱میلی گرم در لیتر) بر درصد باززایی و تعداد شاخه باززایی شده مطالعه شد. کشت‌ها مورد نظر در اتاقک رشد تحت شرایطی که در بالا ذکر شد نگهداری شدند و ارزیابی مشابه آزمایش قبل انجام شد. به علت درصدی بودن داده‌ها و فقدان توزیع نرمال آنها تبدیل داده‌ها از طریق فرمول Arcsin صورت گرفت و سپس تجزیه و تحلیل آماری روی داده‌های تبدیل شده انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD (۵٪) انجام شد.

محیط کشت ریشه زایی: به منظور تسریع ریشه زایی در شاخه‌های باززایی شده، از محیط کشت MS حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA، ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار استفاده شد و شاخه‌های بزرگتر از ۱/۵ سانتی متر به این محیط کشت انتقال داده شد.

نتایج و بحث

عکس العمل ریزنمونه‌های مختلف به دو محیط کشت باززایی: با توجه به نقش اساسی تنظیم کننده‌های رشد در القاء و رشد کالوس و تعیین میزان و نحوه باززایی، تاثیر هر یک از محیط‌های کشت بصورت جداگانه در رابطه با تولید کالوس و باززایی ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه اکثر ریزنمونه‌های کشت شده در دو محیط کشت BN و BI کالوس زایی کرده و تعداد کمتری شاخه زایی کردند. در بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌های درصد کالوس دهی ریزنمونه‌ها در پاسخ به دو محیط کشت مورد استفاده مشخص شد که ریزنمونه‌ها عکس العمل یکسانی نسبت به دو محیط کشت نشان دادند و بین آنها اختلاف معنی داری وجود ندارد این در حالی است که بین نوع ریزنمونه‌ها از نظر درصد کالوس زایی اختلاف معنی داری وجود دارد بطوری که ریزنمونه‌های برگ و محور جنینی بالغ به ترتیب با ۲۰ و ۸۰ و بقیه ریزنمونه‌ها ۱۰۰ درصد کالوس زایی کردند (جدول ۱).

بررسی نتایج درصد شاخه زایی و تعداد شاخه‌های باززایی شده ریزنمونه‌ها در دو محیط کشت باززایی (جدول ۲) مشخص شد که بین ریزنمونه‌ها اختلاف معنی داری وجود دارد بطوری که ریزنمونه گره لپه، برگچه اولیه همراه با گره لپه به ترتیب با متوسط تعداد شاخه باززایی شده۲/۶ و۲/۲ و

جدول۱ -منابع تغییر، درجه‌های آزادی و میانگین مجذورات بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از درصد کالوس دهی، درصد شاخه زایی و تعداد شاخه باززایی شده توسط ریزنمونه‌های مختلف سویا در دو محیط کشت باززایی BN و BI.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مجذورات		
		درصد کالوس دهی	درصد شاخه زایی	تعداد شاخه باززایی شده
ریزنمونه	۸	۶۴۷/۸**	۸۳۴/۹**	۱/۱۳*
نوع محیط کشت	۱	۰/۰۰۶ns	۴/۸۴**	۰/۰۲۳*
ریزنمونه×محیط کشت	۸	۰/۰۰۸ns	۰/۰۱۱ns	۰/۰۱۲ns
خطا	۱۴۲	۸/۵	۲/۳	۰/۰۱۸
کل	۱۵۹			

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

Ns : غیر معنی دار ، حداقل در سطح ۰/۰۵ و کمتر

متوسط ۷۱و۶۵ درصد شاخه زایی، بیشترین باززایی و ریزنمونه‌های جنین نارس، محور جنینی نارس، محور روی لپه و برگ کمترین باززایی را داشتند(هیچ شاخه ای تولید نکردند) و دیگر ریزنمونه‌ها بطور متوسط ۱/۵ تا ۲ شاخه در هر ریزنمونه با متوسط درصد شاخه زایی۳۲ تا ۴۰ درصد تولید کردند. همچنین اثر متقابل بین ریزنمونه‌ها و محیط کشت‌های مورد بررسی، معنی دار نبود و محیط کشت حاوی IAA بیشترین درصد و تعداد شاخه باززایی شده را شامل می‌شد. لازم به ذکر است که ریزنمونه محور جنینی نابالغ در محیط کشت حاوی IAA هیچ گونه باززایی انجام نداده و فقط کالوس زایی کرد ولی در محیط کشت حاوی NAA علاوه بر تولید کالوس، جنین‌های سوماتیکی نیز در آن القا شد (کمتر از ده درصد) . باروال و همکاران (۱و۲) نیز جهت تولید جنین‌های سوماتیکی در سویا از محیط کشت MS تغییر یافته همراه با ۱/۵ میلی گرم در لیتر BA ، ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۱۲ میلی مول پرولین استفاده کردند.

در بیشتر آزمایش‌های انجام شده جهت اندام زایی در سویا از ریزنمونه گره لپه استفاده شده است (۴، ۵، ۸ و ۹) با این حال مانته (۸) از ریزنمونه لپه، کیم و همکاران (۶) از ریزنمونه گره اولین برگ، دان و همکاران (۳) از ریزنمونه محور زیر لپه ، و کیم و همکاران (۷) از ریزنمونه برگچه اولیه جهت اندام زایی استفاده کردند.

جدول۲ - مقایسه درصد کالوس دهی، درصد شاخه زایی و تعداد شاخه باززایی شده ریز نمونه‌های مختلف در دو محیط کشت باززایی BN و BI .

ریزنمونه ها	درصد کالوس دهی		درصد شاخه زایی		تعداد شاخه باززایی شده	
	BI	BN	BI	BN	BI	BN
برگچه همراه با گره لپه	۱۰۰a	۱۰۰a	۷۰b	۶۰d	۲/۵b	۲/۰ c
گره لپه	۱۰۰a	۱۰۰a	۷۷a	۶۵c	۲/۸a	۲/۴ b
محور روی لپه	۱۰۰a	۱۰۰a	۰h	۰h	۰f	۰f
محور زیر لپه	۱۰۰a	۱۰۰a	۳g	۰h	۱/۰e	۰f
برگچه	۱۰۰a	۱۰۰a	۴۱e	۴۰e	۱/۴d	۱/۲d
برگ	۲۰c	۲۳c	۰h	۰h	۰f	۰f
محور جنینی بالغ	۸۰b	۷۸b	۳۳f	۳۱f	۱/۸c	۲/۰c
جنین نابالغ	۱۰۰a	۱۰۰a	۰h	۰h	۰f	۰f
محور جنینی نابالغ	۱۰۰a	۱۰۰a	۰h	۰h	۰f	۰f

اختلاف میانگین هایی که دارای حروف مشابه هستند براساس آزمون LSD معنی دار نیست ($P<0.05$). حروف بکار رفته برای اثرات متقابل و هر یک از اثرات اصلی از یکدیگر مستقل می‌باشند.

مقدار زیاد سیتوکنین و اکسین درون زا نقش بسیار مهمی در شاخه زایی ریزنمونه‌های سویا دارند و ریزنمونه‌های گره لپه و برگچه اولیه بیشترین مقدار این دو هورمون را نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها دارند(۷). لذا این احتمال وجود دارد که هورمونهای اکسین و سیتوکنین ساخته شده توسط سویا بیشتر در ریزنمونه گره لپه و برگچه‌های اولیه تجمع یابد و باعث شاخه زایی بیشتر ریزنمونه‌های مذکور شود.

بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌های درصد و تعداد شاخه باززایی شده(جدول۱) ریزنمونه‌ها در پاسخ به دو محیط کشت باززایی مورد استفاده نشان داد که بین دو محیط کشت باززایی اختلاف معنی داری وجود دارد بطوری که محیط کشت حاوی IAA بیشترین درصد و تعداد شاخه باززایی شده را تولید کرد. نتایج آزمایش حاکی است که اثر افزایشی هورمون BA و IAA در ریخت زایی سویا بیشتر از اثر افزایشی BA و NAA بوده و باعث تحریک و تولید شاخه بیشتر می‌شود. کیم و همکاران (۷) نیز در آزمایش‌های خود به اثرات افزایشی هورمون IAA روی BA و Zea در شاخه‌زایی سویا اشاره کرده اند بطوری که حضور BA یا Zea به تنهایی شاخه زایی کمتری نسبت به زمانی که IAA نیز به محیط کشت اضافه شد تولید کرد. تاکنون مکانیسم عمل این دو هورمون در باززایی و دلیل وجود اثرات افزایشی آنها مشخص نشده است ولی می‌توان گفت که سیتوکنین و اکسین بطور هماهنگ شاخه زایی را در سویا کنترل می کنند.

کیم و همکاران(۷) در آزمایشات خود Zea و IAA را مناسب ترین هورمونها جهت شاخه زایی گزارش کردند. در آزمایش دیگری که توسط بارویل و همکاران (۱و۲) انجام شد اثر شش سیتوکنین روی شاخه زایی سویا مورد بررسی قرار گرفت و BA مناسب ترین هورمون برای شاخه زایی معرفی شد. این نتایج نشان می‌دهند که نه تنها توانایی شاخه زایی ریزنمونه‌ها بستگی به مقدار داخلی سیتوکنین واکسین درون زا دارد بلکه اختلافات ساختاری و مکانیکی ریز نمونه‌ها نیز باعث بروز یکسری اختلافات در باززایی می‌شود.

اثر سطوح مختلف هورمونهای BA و IAA در ریخت زایی ریزنمونه گره لپه: در بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌های درصد شاخه زایی، ریزنمونه گره لپه در پاسخ به سطوح مختلف هورمونهای BA و IAA (جدول۳) مشخص شد که بین سطوح مختلف این دو هورمون اختلاف معنی داری وجود دارد ولی اثر متقابل بین آنها معنی دار نیست. بطوری که با افزایش مقدار BA از ۰/۵ به ۱ میلی گرم در لیتر درصد شاخه زایی افزایش می‌یابد و در ادامه افزایش آن به دو میلی گرم در لیتر درصد شاخه زایی، تغییری نمی کند در حالی که بین سطوح هورمونی IAA چنین اختلافی دیده نمی شود و درصد شاخه زایی تولید شده در این دو سطح (۰/۵ و ۱میلی گرم در لیتر) یکسان است و این ممکن است بدلیل نزدیکی دو سطح انتخابی این هورمون باشد(شکل۱ و۳- الف). بطور کلی می‌توان گفت که ریزنمونه گره لپه در محیط کشت حاوی۱ تا ۲ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۵ تا ۱ میلی گرم در لیتر IAA بیشترین درصد را تولید می کند. همچنین درصد کالوس زایی چندان تحت تاثیر نسبت‌های این دو هورمون قرار نگرفت و عامل مهم مقدار سیتوکنین موجود در محیط کشت بود و این شاید بدین علت است که مقادیر انتخابی دو هورمون IAA و BA در محدوده نسبت‌های مناسب جهت کالوس دهی سویا باشد.

در بررسی تعداد شاخه باززایی شده ریزنمونه گره لپه در سطوح دو هورمون BA و IAA نتایجی متفاوتی بدست آمد(شکل۲) بطوری که در اینجا هورمونهای BA و IAA اثر مستقلی نداشته بلکه نسبت‌های بین این دو هورمون اهمیت پیدا می کند و بیشترین تعدادشاخه در نسبت‌های ۱: ۰/۵ و سپس در ۱:۲ و ۲:۵/. (سیتوکنین:اکسین) و کمترین تعداد شاخه در نسبتهای ۰/۵ : ۱ و ۰/۵ : ۰/۵ بدست آمد.

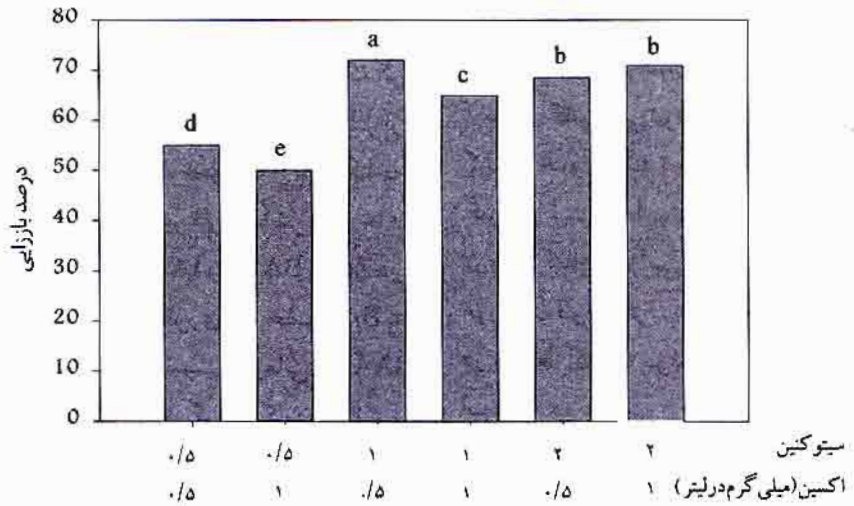
مطالعات فوق نشان می‌دهد که نسبت هورمونی سیتوکنین به اکسین نقش بسیار مهمی در باززایی سویا داشته و عامل اصلی تشکیل شاخه‌ها تعادل هورمونی بین این دو تنظیم کننده رشد می‌باشد. در آزمایشی که توسط کیم و همکاران (۷) انجام شد بیشترین شاخه زایی در نسبت‌های هورمونی ۱:۱ (IAA : Zea) و ۱:۲ (IAA : BA) بدست

جدول۳- منابع تغییر، درجه‌های آزادی و میانگین مجذورات بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر سطوح مختلف هورمونهای IAA و BA بر درصد کالوس دهی، درصد شاخه زایی و تعداد شاخه باززایی شده از ریزنمونه گره لپه.

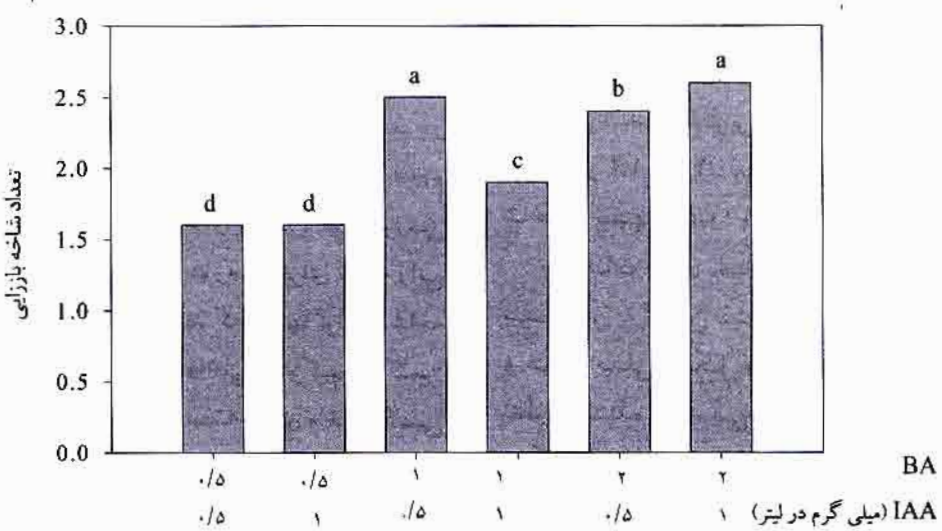
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مجذورات		
		درصد کالوس دهی	درصد شاخه زایی	تعداد شاخه باززایی شده
سطوح مختلف IAA	۱	۰/۰۰۸ ns	۶/۷۲**	۰/۰۲ ns
سطوح مختلف BA	۲	۰/۰۱۲ns	۸۶/۳**	۰/۰۷۴ ns
BA×IAA	۲	۰/۰۰۹۴ns	۰/۰۸۳ns	۰/۲**
خطا	۱۵۴	۱/۱۳	۲/۵	۰/۰۸
کل	۱۵۹			

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

ns : غیر معنی دار ، حداقل در سطح ۰/۰۵ و کمتر



شکل۱- اثر ترکیبات مختلف اکسین IAA و سیتوکنین BA بر روی شاخه زایی ریزنمونه گره لپه



شکل۲- اثر ترکیبات مختلف IAA و BA بر تعداد شاخه باززایی شده ریزنمونه گره لپه.

آمد. با توجه به نتایج فوق می‌توان گفت که نسبت بهینه سیتوکینین به اکسین به نوع سیتوکینین و اکسین مورد استفاده در آزمایش نیز بستگی دارد و برای سیتوکینین‌ها و اکسین‌های مختلف این تعادل هورمونی در شاخه زایی متفاوت است.

ریشه زایی: اگر چه در این آزمایش با گذشت زمان ریشه هایی بصورت اتفاقی در شاخه‌های باززایی شده (در حالی که هنوز روی کالوس هستند) بوجود آمد ولی به منظور تحریک و تسریع ریشه دهی، شاخه‌های باززایی شده بزرگتر از ۱/۵ سانتی متر قطع گردید و به محیط کشت ریشه زایی حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA انتقال یافت. پس از یک ماه گیاهچه هایی با سیستم ریشه ای توسعه یافته بدست آمدند (۷۰ درصد شاخه‌های باززایی شده ریشه تولید کردند) (شکل ۳-ب).

بطور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بهترین ریزنمونه جهت ریخت زایی در سویا ریزنمونه گره لپه و بهترین نسبت هورمونی BA به IAA نسبت ۲:۵/. و ۱:۲ می‌باشد.

(ب) (الف)

شکل ۳: الف شاخه زایی ریزنمونه گره لپه در محیط کشت حاوی BA و IAA و ب ریشه زایی شاخه‌های باززایی شده در محیط کشت حاوی IBA.

منابع

1. Barwail, U.B., H.R. Kerns and J.M. Widholm. (1986a). Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta 167: 473- 481.
2. Barwail, U.B., M.M. Meyer and J.M. Widholm. (1986b). Screening of *Glycine max* and *Glycine soja* genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node. Theor. Appl. Genet. 72: 423- 428.
3. Dan, Y. and N.A. Reichert, (1998). Organogenic regeneration of soybean from hypocotyl explants. *In Vitro* Cell Dev. Biol- Plant 34: 14-21.
4. Graybosch, R.A., M.E. Edge and X. Delannay. (1987). Somaclonal variation in soybean plants regenerated from the cotyledonary node tissue culture system. Crop Sci. 27: 803-806.
5. Gulati, A. and P.K. Yaiwal. (1994). Plant regeneration from cotyledonary node explants of mung bean (*Vigna radiata*). Plant Cell Rep. 13: 523- 527.
6. Kim, J.H., G.E. LaMotte and E. Hack. (1990). Plant regeneration *in vitro* from primary leaf nodes of soybean (*Glycine max*) seedlings. Plant Physiol. 136: 664- 669.

7. Kim, K.H., H.K. Park, M.S. Park and U.D. Yeo. (2001). Effects of auxins and cytokinins on organogenesis of soybean (*Glycine max*). J. Plant Biotechnol. 3: 95- 100.

8. Mante, S., R. Scorza and J. Cordts. (1989). A simple, rapid protocol for adventitious shoot development from mature cotyledons of *Glycine max* cv. Bragg. *In Vitro* Cell Dev. Biol- plant. 25: 385- 388.

9. Rao, B.G. and V.L. Chopra. (1987). The influence of media on callusing and organogenesis in chickpea. Int. Chickpea Newslett. 17: 97-100

10. -Tome, G.CH., E.R. Santarem and A.G. Ferreire. (1996). Adventitious bud induction and plant regeneration from soybean cotyledonary nodes. Phyton. 27: 127- 135.

11. Wright, M.S., D.V. Ward and M.A. Hinchee. (1986). Regeneration of soybean (*Glycine max*. (L.)Merrill) from cultured primary leaf tissue. Plant Cell Rep. 6:83-89.

12. Wright, M.S., *et al*. (1988). Plant regeneration from tissue cultures of soybean by organogenesis. In "Effect of genotype, medium and explant on callus initiation and plant regeneration of canola and soybean" (A. Taei, Ed.). M.Sc. thesis, Tehran University.

13. Yang, Y.S., K. Wade and Y. Futsugara. (1990). Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants. Plant Sci. 72: 101- 108.

Effect of explant and various levels of auxin and cytokinine on soybean regeneration.

A. Sharifi-A.R. Bagheri -S.R. Vessal[1]

Abestract

In order to select the best explant and suitable medium for organogenesis in soybean, two seperate experiments were performed 1) effect of explant (epicotyl, hypocotyl, cotyledonary node, first leaf including cotyledonary node, leaflet, leaf, immature embryogenic axis, immature embryo and mature embryognic axis) and regeneration medium (MS medium with 1.5 mg/l BA and 0.5 mg/l IAA or 1.5 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA, 3% sucrose and 0.8% agar) and 2) effect of different rates of BA (0.5, 1 and 2 mg/l) and IAA (0.5 and 1 mg/l) on organogenesis and mass callus production. Results of first experiment indicated that the response of explants to regeneration medium was very different and two regeneration media had significant differences in regeneration. However, cotyledonary node and the first leaf including cotyledonary node on medium with BA and IAA had the highest shoot formation rate (77 and 70%) and shoot number (2.8 and 2.4), respectively.There were no significant differences between these two media in mass callus production, whereas there were significant differences among explants and cotyledonary node with leaflet had the highest mass callus production. On the basis of the second experiment, the best amount of BA and IAA were 1-2 mg/l and 0.5-1 mg/l respectively.

Keywords: Organogenesis, callus, BA, IAA, soybean.

1-Contribution from College Agricultural, Ferdowsi University of Mashhad.