بررسی تأثیر برخی عوامل مؤثر بر جنین‌زایی و بلوغ جنین‌های رویشی در سویا (*Glycine max*)

مرتضی ابراهیمی[۱*]، سید مجتبی خیام نکویی[۲] و سعید کدخدایی[۱]

(تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۱)

چکیده

پدیده جنین‌زایی رویشی تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار دارد. در این بررسی تأثیر تیمارهای اندازه ریز نمونه، زخم زنی ریز نمونه‌ها و تیمار آبگیری بر تولید جنین رویشی و درصد تبدیل آنها به گیاه در سه ژنوتیپ سویا تعیین گردید. بدین منظور ریزنمونه‌هایی از جنین نارس سویا با سه اندازهٔ ۳، ۵ و۷ میلی‌متر با اعمال خراش در پشت برخی از ریز نمونه‌ها تهیه و در محیط کشت جنین‌زایی کشت گردید. پس از تولید جنین، به منظور تعیین درصد تبدیل جنین به گیاه نیز جنین‌های حاصل تحت تأثیر تیمار آبگیری(۲، ۴ و ۶ روز) قرار گرفتند. سپس با اندازه گیری شاخص های میانگین نسبت افزایش وزن پینه، درصد پینه‌های جنین‌زا، میانگین تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه‌و درصد تبدیل جنین به گیاه، تأثیر تیمارهای فوق مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده وجود تأثیر بسیار معنی‌دار($P<0/01$) بین تیمار های فوق بر قابلیت تولید پینه، جنین رویشی و درصد تبدیل جنین به گیاه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. بیشترین درصد جنین‌زایی مربوط به ژنوتیپ BP (۲۴/۱۹٪) و بهترین اندازهٔ ریزنمونه از نظر جنین‌زایی رویشی، لپهٔ جنین نارس با اندازهٔ ۳ میلی متر بود. تیمار زخم‌زنی ریز نمونه، سبب افزایش میزان تولید پینه و افزایش نسبت تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه(۲۰/۲۸) شد ولی در افزایش درصد پینه‌های جنین‌زا تأثیری نداشت. در این آزمایش تیمار ۶ روزه آبگیری بیشترین درصد تبدیل جنین‌های رویشی به گیاه را به دنبال داشت (۷۴/۷٪). گیاهان حاصل از تبدیل و جوانه زنی جنین‌های رویشی به گلدان‌های حاوی پیت ماس انتقال یافتند. جنین‌زایی رویشی روشی کارآمد برای باززایی گیاه و کاربرد در تکنیک‌های انتقال ژن می‌باشد، اما با این حال درصد تبدیل و جوانه‌زنی جنین‌های رویشی به دلیل فرآیندهای بلوغ و نیز غیر طبیعی بودن مرفولوژی جنین‌های بالغ بسیار پایین است. لذا این تحقیق به منظور بررسی راه حلی جهت رفع برخی مشکلات موجود در جنین‌زایی رویشی گیاه سویا به اجرا در آمده است.

واژه‌های کلیدی: ریز نمونه، جنین‌زایی رویشی، خراش‌دهی، آبگیری، سویا

مقدمه

سویا به خاطر میزان زیاد روغن و پروتئین موجود در دانه خود، یکی از محصولات زراعی مهم جهان می‌باشد. از این رو تحقیقات ژنومیکس سویا بیشتر روی صفات بذر متمرکز شده و از سوی دیگر استفاده از جنین رویشی به جای جنین زیگوتی در این گونه مطالعات مورد توجه قرار گرفته است. اما در این رابطه محدودیت‌هایی وجود دارد که باید رفع گردند. از مهم‌ترین محدودیت‌ها این است که جنین رویشی

۱. به ترتیب کارشناسان ارشد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان
۲. استادیار پژوهشی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: o_m_abrahimi@yahoo.com

همیشه از نظر رشد و نموی همگام با جنین زیگوتی نمی‌باشد. یکی از جنبه‌های اساسی در نمو جنین زیگوتی که به صورت طبیعی در خلال نمو جنین رویشی صورت نمی‌گیرد پدیدهٔ آبگیری (Desiccation) است، که منجر به خواب جنین می‌شود (۱۸ و ۲۰). گزارش‌های بسیاری از جنین‌زایی رویشی در گیاه سویا وجود دارد که در آنها به بررسی تأثیر تیمارهای مختلف مؤثر در این پدیده پرداخته شده است (۵، ۶، ۱۱ و ۱۲). عوامل مختلفی بر جنین‌زایی رویشی سویا تأثیرگذار هستند، از جمله این عوامل. می‌توان به ژنوتیپ (۶، ۱۱ و ۱۳)، نوع ریزنمونه (۳، ۱۵ و ۱۷)، نوع و غلظت هورمون (۱۱، ۱۷ و ۱۹)، نوع محیط کشت (۱۱ و ۱۷)، pH (۱۵ و ۲۱)، نور (۱۵)، جهت قرار گرفتن ریزنمونه(۱۳، ۱۵ و ۲۱)، اندازهٔ ریزنمونه(۱۱ و ۱۶) و تیمار آبگیری (۸ و ۱۲)، اشاره نمود. یکی از بهترین ریز نمونه‌هایی که در سویا بیشترین پاسخ را به تیمارهای جنین‌زایی نشان داده است، لپهٔ جنین نارس می‌باشد. در بررسی‌های صورت گرفته گزارش شده که لپهٔ جنین نارس با اندازهٔ حدود ۵ میلی‌متر مناسب ترین ریزنمونه می‌باشد (۵، ۶ و ۱۲)، ولی این اندازه می‌تواند بر حسب ژنوتیپ و شرایط فیزیولوژیکی گیاه متفاوت باشد که تعیین آن برای هر ژنوتیپ ضروری است. فرآیند تولید بذر در طبیعت، مرحله‌ای از آبگیری را طی می‌نماید که در ارتباط با تولید هورمون ABA می‌باشد. فرآیند مزبور در جنین زیگوتی و جنین رویشی مشابه بوده و در اواخر مرحلهٔ بلوغ، جنین‌ها بایستی در معرض شرایط خشک شدن قرار گیرند (۵). عقیده بر این است که تیمار آبگیری برای انتقال درست جنین از مرحلهٔ بلوغ به یک مرحلهٔ رویش ضروری می‌باشد. بنابراین برخی از مشکلات مرتبط با ادامهٔ نمو جنین رویشی پس از بلوغ می تواند در نتیجهٔ فقدان یک مرحلهٔ برنامه‌ریزی شده آبگیری باشد. اعمال یک تیمار آبگیری حتی به صورت جزئی بر جنین‌های رویشی باعث جوانه‌زنی و رشد بعدی آنها شده و رشد متوازن ریشه و ساقه را موجب می‌گردد.

تحمل به خشک شدن در جنین‌های رویشی می‌تواند با به کارگیری ABA، تنش حرارتی و یا مواد اسموتیکومی (Osmoticum) همانند پرولین، پلی اتیلن گلیکول، مانیتول و سوربیتول القا شود (۵ و ۱۱). بلوغ جنین با پتانسیل اسمزی پایین در بافت‌ها و یا محیطی که جنین را احاطه کرده است مرتبط می‌باشد (۲۳). اما در هر حال در تیمار مستقیم جنین‌ها با ABA و یا القای غیر مستقیم آن با تیمارهای مختلف، این هورمون ABA است که وظایف مختلفی را در فرآیند بقای بذر به عهده دارد. از جمله این وظایف می‌توان به جلوگیری از رویش زود هنگام، کنترل برخی برنامه های ژنتیکی (که تغییرات بیوشیمیایی و فیزیکی مرتبط با تحمل به آبگیری را سبب می‌شوند) و تخریب کلرفیل (که منجر به کاهش شدید تولید اکسیژن فعال در بافت‌های خشکی که در معرض نور قرار گرفته‌اند می‌شود) (۵)، اشاره نمود. این تیمار نیز وابستگی شدیدی به شرایط آزمایش، وضعیت جنین‌ها از نظر میزان آب، ژنوتیپ، مرحلهٔ نموی جنینی که تحت تأثیر تیمار قرار می‌گیرد و نسبت آبگیری جنین، طول دوره تیمار و پروتکل جنین‌زایی مورد استفاده داشته و بایستی بهینه‌سازی گردد (۸، ۱۸ و ۲۰). سابقهٔ کشت بافت سویا در ایران چندان طولانی نبوده و در این زمینه تحقیقات اندکی صورت گرفته است (۲ و ۴). لذا در این بررسی تأثیر اندازهٔ ریز نمونه، زخم‌زنی و تیمار آبگیری بر جنین‌زایی رویشی و درصد تبدیل جنین به گیاه در سویا (*Glycine max* L.) مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذر سه ژنوتیپ سویا به نام‌های BP، L17 و KW506 پس از جمع‌آوری، به منظور تهیهٔ ریزنمونه در گلخانه کاشته شده و سپس از لپهٔ جنین نارس با اندازه‌های ۳، ۵ و ۷ میلی‌متر به منظور کشت در شرایط درون شیشه‌ای استفاده گردید. جهت القای پینه ریز نمونه‌های حاصل از لپهٔ جنین نارس با اندازه‌های فوق از سطح پشتی خود بر روی محیط کشت MSD40 (۶) (جدول ۱) قرار داده شدند (شکل ۳A). به منظور بررسی تأثیر خراش‌دهی ریز نمونه‌ها بر تولید پینه و جنین‌زایی، نیمی از ریز نمونه‌ها پس از خراش‌دهی، روی محیط کشت قرار داده

جدول ۱. ترکیب محیط‌های کشت مورد استفاده در جنین‌زایی رویشی سویا

نام محیط	ترکیبات
القاء(MSD40)	MS Salts+B5 Vitamins+3%Sucrose+40mg/l 2,4-D+pH=7+0.2%Gelrite
تکثیر(MSD20)	MS Salts+B5 Vitamins+3%Sucrose+20mg/l 2,4-D+pH=5.8+0.2%Gelrite
تمایز اندام(MSM6AC)	MS Salts+B5 Vitamins+6%Maltose+pH=5.8+0.5% Activated Charcoal+0.2%Gelrite
بلوغ(MSM6)	MS Salts+B5 Vitamins+6%Maltose+pH=5.8+0.2%Gelrite
جوانه زنی و تبدیل(MS0)	MS Salts+B5 Vitamins+3%Sucrose+pH=5.8+0.2%Gelrite

شدند. با استفاده از تیغ جراحی در سطح پشتی هر لپه ۴-۳ خراش ایجاد گردید. برای هر یک از تیمار ها ۵ تکرار در نظر گرفته شد و در هر تکرار نیز ۱۰ ریزنمونه کشت شد. نمونه‌ها پس از کشت به منظور تولید پینه به اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور حدود ۱۰ µE m-2 s-1 انتقال داده شده و به مدت یک ماه در این محیط قرار گرفتند (شکل ۳B) و سپس جهت تکثیر به محیط MSD20 (۲۴) (جدول ۱) منتقل شدند. جنین‌های حاصل به منظور تمایز اندام و بلوغ در محیط MSM6AC (۶) (جدول ۱) کشت گردیدند. در این مرحله دمای انکوباسیون ۲۶ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۱۰ µE m-2 s-1 در نظر گرفته شد. جنین‌ها پس از یک ماه نگهداری در این محیط، به منظور بلوغ به محیط MSM6 (۶) (جدول ۱) منتقل شدند. شرایط نگهداری در این مرحله نیز همانند مرحلهٔ قبل بود. جنین‌های بالغ که رنگ آنها تقریباً زرد بود انتخاب و جهت تبدیل به گیاه، تحت تأثیر تیمار آبگیری قرار گرفتند. در این مرحله در داخل هر پتری ۱۵×۱۰۰ میلی متری تعداد ۲۵ جنین قرار داده شد (شکل ۳F). درب پتری‌ها بدون بسته شدن با پارافیلم روی کفه زیری قرار داده شد و به مدت ۲، ۴ و ۶ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از خشک شدن سریع جنین‌ها حدود ۱ میلی‌لیتر از محیط MSM6 نیز در گوشهٔ پتری ریخته شد.

سپس جهت تبدیل جنین‌ها به گیاه کامل و بررسی تأثیر تیمار آبگیری بر درصد جوانه زنی و تبدیل، پس از سپری شدن تعداد روزهای مورد نظر، جنین‌های تیمار شده به محیط MS0 (۱۷) (جدول ۱) منتقل شدند. جنین‌ها در این مرحله در دمای ۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد و شدت نور ۶۰-۸۰ µE m-2 s-1 نگهداری گردیدند. پس از ۴ هفته تعداد جنین‌های رویش کرده در هر تیمار شمارش گردید. جنین‌های جوانه زده به گلدان‌های کوچک حاوی پیت ماس انتقال یافتند (شکل ۳G). این آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایهٔ کاملاً تصادفی و ۵ تکرار برای هر تیمار و هر آزمایش به صورت مجزا به اجرا در آمد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و نیز رسم گراف‌ها به کمک نرم افزارهای SASو Excel انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

ریز نمونه‌های کشت شده پس از یک هفته متورم شده و اولین نشانه‌های تولید پینه در آنها نمایان شد. تیمار خراش دهی ریز نمونه‌ها، تأثیر معنی‌داری بر میانگین نسبت افزایش وزن پینه و تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه داشت (۲۰/۲۸)، اما درصد پینه‌های جنین‌زا را افزایش نداد (جدول ۲). ظاهراً افزایش میانگین تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه‌با اعمال تیمار خراش‌دهی ریز نمونه‌ها بیشتر با افزایش میزان تولید پینه و تحریک پینه دهی مرتبط می‌باشد. اصولاً زخم در گیاه منجر به تولید هورمون‌های اتیلن، جاسمونیک اسید و سالسیلیک اسید می گردد. این هورمون‌ها واکنش‌های فیزیولوژیکی بسیاری را تحریک نموده و به عنوان فاکتورهای مسئول القای ژن‌های درگیر در واکنش به زخم می‌باشند. این واکنش‌ها اثرات زیادی در سلول‌های گیاهی داشته که می‌توان به تحریک رشد سلول، پینه‌زایی و تحریک جنین‌زایی اشاره نمود (۱ و ۱۹). اتیلن و

جدول۲. تأثیر تیمار زخم زنی ریزنمونه‌بر میانگین نسبت افزایش وزن پینه، درصد پینه‌های جنین زا و تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه

نام تیمار	میانگین		
	نسبت افزایش وزن پینه	درصد پینه‌های جنین زا	تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه
با خراش دهی	۰/۵۴۰۸۸^{A}	۱۶/۹۷^{A}	۲۰/۲۸^{A}
بدون خراش دهی	۰/۴۹۲۰۷^{B}	۱۴/۹۶^{A}	۱۶/۱۲^{B}

میانگین‌های دارای حرف لاتین مشترک تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ ندارند (آزمون دانکن).

جاسمویک اسید از این نظر اهمیت بیشتری دارند. جاسمونیک اسید تولید اتیلن را نیز افزایش می‌دهد (۱). بنابراین افزایش وزن پینه در ریز نمونه‌های خراش داده می‌تواند با تحریک تولید این هورمون ها مرتبط باشد.

بررسی نتایج میانگین نسبت افزایش وزن پینه، درصد پینه‌های جنین‌زا و تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد که بین آنها تفاوت معنی‌داری در رابطه با این صفات اندازه‌گیری شده وجود داشت (جدول ۳). ژنوتیپ BP از نظر میانگین نسبت افزایش وزن پینه و درصد پینه‌های جنین‌زا (۲۴/۱۹۰٪) نسبت به دو ژنوتیپ دیگر عملکرد بهتری نشان داد. در این ژنوتیپ تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه نیز از دو ژنوتیپ دیگر بیشتر بود (۲۳/۲). هر چند ژنوتیپ KW506 نسبت به L.17 میانگین نسبت افزایش وزن پینه و درصد پینه‌های جنین‌زای کمتری داشت اما تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه در آن از L.17 بیشتر بود. تأثیر ژنوتیپ و تفاوت پاسخ آنها به تیمارهای مختلف جنین‌زایی قبلاً توسط محققین دیگر به اثبات رسیده است (۵، ۶، ۱۱ و ۱۳). این آزمایش نیز به مطالعه برخی ژنوتیپ‌های داخلی پرداخته است.

اندازهٔ ریزنمونه هیچ‌گونه تأثیری بر نسبت افزایش وزن پینه و درصد پینه‌های جنین‌زا نداشت، اما از نظر میانگین تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه معنی دار بود (جدول ۴). در این بررسی بهترین اندازه ریزنمونه‌از لحاظ تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه، ۳ میلی‌متر بود که در آن ۱۷/۵٪ از پینه‌ها جنین تولید کردند. بین ژنوتیپ و اندازهٔ ریزنمونه در شاخص میانگین نسبت افزایش وزن پینه و درصد پینه‌های جنین‌زا (شکل ۱) اثر متقابل وجود داشت. ژنوتیپ BP با ریزنمونه۵ میلی‌متری بیشترین درصد پینه‌های جنین‌زا را داشته و با ریزنمونه۳ میلی متری کمترین درصد پینه جنین‌زا را تولید کرد، اما ژنوتیپ KW506 با ریزنمونه۳ میلی‌متری بهتر از ژنوتیپ BP عمل نموده و با افزایش اندازهٔ ریزنمونه درصد پینه‌های جنین‌زا در آن کاهش یافته است. در رابطه با جنین‌زایی رویشی سویا گزارش‌های بسیاری انتشار یافته که نتایج حاصل نشان‌دهنده اهمیت اندازهٔ بذر و اثر متقابل آن با ژنوتیپ می‌باشد (۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸). این پدیده در سویا به شدت تحت تأثیر ژنوتیپ و مرحلهٔ فیزیولوژیکی ریزنمونه قرار دارد. جنین تمایز یافته اما نابالغ حاصل یک رشته تقسیمات سریع سلولی تخمک بارور شده است که پس از کاهش میزان تقسیم سلولی، حجیم شدن سلول‌ها آغاز می‌شود. با وجود این‌که تقسیم سلولی کم می‌شود ولی امکان ادامهٔ دو برابر شدن DNA همچنان وجود دارد. در سلول‌های لپهٔ برخی از حبوبات این دو برابر شدن می‌تواند تا ۶۴ برابر یک سلول هاپلوئید ادامه داشته باشد (۳). بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که لپه های جنین رسیده از نظر باززایی پاسخی به محیط کشت نشان ندهند. اندازهٔ جنین مورد استفاده می‌تواند تحت تأثیر ژنوتیپ و شرایط کشت و نگهداری گیاه تفاوت نماید. لذا ضروری است تا با معرفی شرایط استاندارد جهت پرورش گیاهان مورد استفاده بر اساس ژنوتیپ، روش جنین‌زایی رویشی بهینه‌سازی گردد.

از جمله شاخص‌های مهم در تکنیک جنین‌زایی رویشی مرحلهٔ آبگیری می‌باشد که برای جوانه‌زنی و رشد طبیعی جنین‌های رویشی حاصل ضروری است. در این بررسی بین

جدول ۳. تأثیر تیمار ژنوتیپ بر میانگین نسبت افزایش وزن پینه، درصد پینه‌های جنین زا و تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه

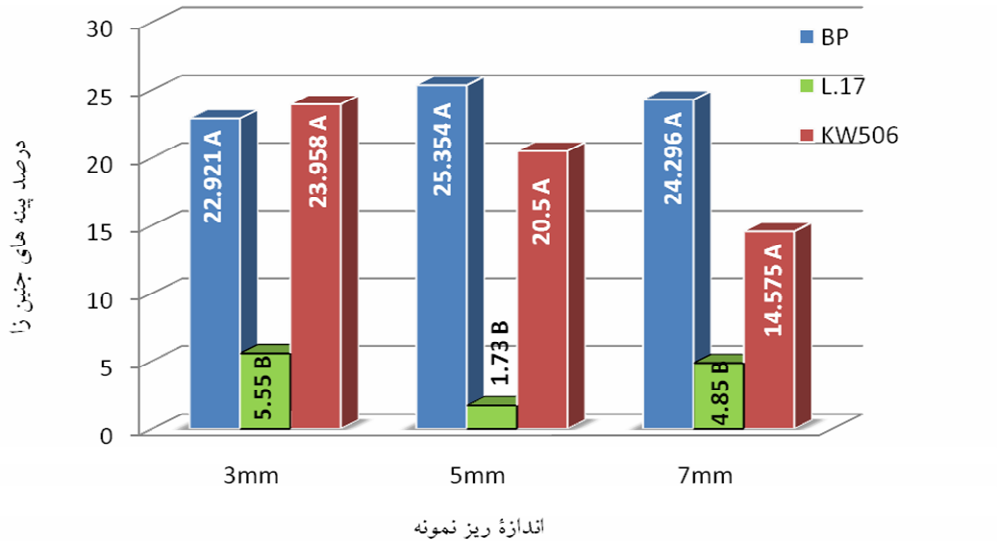
نام تیمار	میانگین		
	نسبت افزایش وزن پینه	درصد پینه‌های جنین زا	تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه
BP	۰/۶۶۰۳^{A}	۲۴/۱۹^{A}	۲۳/۱۹۴^{A}
KW506	۰/۴۱۷۴^{C}	۱۹/۶۷۸^{B}	۲۲/۸۶۱^{A}
L17	۰/۴۷۱۷^{B}	۴/۰۴۴^{C}	۸/۵۴۲^{B}

میانگین های دارای حرف لاتین مشترک تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵٪ ندارند (آزمون دانکن).

جدول ۴. تأثیر تیمار اندازه ریزنمونه بر میانگین نسبت افزایش وزن پینه، درصد پینه‌های جنین زا و تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه

نام تیمار	میانگین		
	نسبت افزایش وزن پینه	درصد پینه‌های جنین زا	تعداد جنین به ازای هر ریزنمونه
۳ میلی‌متر	۰/۵۲۴۰۵^{A}	۱۷/۴۷۶^{A}	۲۱/۰۴^{A}
۵ میلی‌متر	۰/۵۱۹۴۳^{A}	۱۵/۸۶۱^{A}	۱۶/۹۷^{B}
۷ میلی‌متر	۰/۵۰۵۹۴^{A}	۱۴/۵۷۵^{A}	۱۶/۵۸^{B}

میانگین‌های دارای حرف لاتین مشترک تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ ندارند (آزمون دانکن).



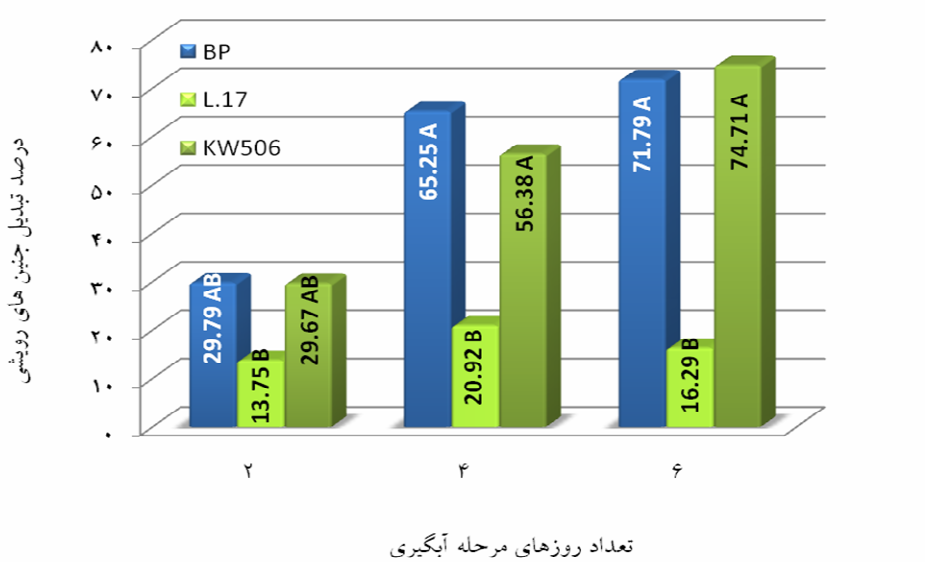
شکل ۱. اثر متقابل تیمار اندازهٔ ریزنمونه‌با ژنوتیپ بر درصد پینه‌های جنین‌زا

ژنوتیپ‌ها، تیمار آبگیری (جدول ۵) و اثر متقابل ژنوتیپ با آبگیری (شکل ۲) در رابطه با درصد تبدیل جنین‌های رویشی اختلاف معنی‌دار وجود داشت($P<0/01$). بهترین تیمار آبگیری در این آزمایش ۶ روز بود و تیمار ۲ روز کمترین تأثیر را بر درصد تبدیل داشت. بین ژنوتیپ‌ها نیز تفاوت معنی‌داری از این نظر وجود داشت (جدول ۵). ژنوتیپ BP با میانگین درصد تبدیل ۵۵/۶۱٪ بیشترین درصد تبدیل را داشت و درصد تبدیل ژنوتیپ L17 کمترین بود. در بررسی اثر متقابل ژنوتیپ با تیمار

جدول ۵. تأثیر ژنوتیپ و تیمار آبگیری (Desiccation) بر میانگین درصد تبدیل و جوانه‌زنی جنین رویشی سویا

نام ژنوتیپ	میانگین درصد تبدیل	تیمار آبگیری	میانگین درصد تبدیل
BP	۵۵/۶۱^{A}	۶ روز	۵۴/۲۶^{A}
KW506	۵۳/۵۸^{A}	۴ روز	۴۷/۵۱^{A}
L17	۱۶/۹۸^{B}	۲ روز	۲۴/۴۰^{B}

میانگین‌های دارای حرف لاتین مشترک تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵٪ ندارند (آزمون دانکن).



شکل۲. اثر متقابل تیمار آبگیری با ژنوتیپ بر درصد تبدیل جنین‌های رویشی سویا

آبگیری، ژنوتیپ KW506 با ۷۴/۷٪ بیشترین درصد تبدیل را با شش روز تیمار آبگیری نشان داد و پس از آن ژنوتیپ BP. با همین تعداد روز و ۷۱/۸٪ تبدیل قرار داشت. پایین‌ترین درصد تبدیل مربوط به تیمار ۲ روز بود و ژنوتیپ L17 با ۱۳/۷٪ کمترین درصد تبدیل را از خود نشان داد (شکل ۲).

علی‌رغم وجود تشابه بین جنین‌زایی رویشی و جنین‌زایی زیگوتی، در اواخر مراحل تشکیل جنین رویشی (مرحلهٔ بلوغ) در مقایسه با جنین زیگوتی اختلافاتی وجود دارد. فقدان مواد ذخیره ای کافی می تواند یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر بنیه بذر باشد (۲۰).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که میزان پروتئین ذخیره‌ای در جنین‌های رویشی گیاهانی همچون کتان، پنبه، یونجه، سویا و کاج سفید بسیار کمتر از جنین زیگوتی می‌باشد (تقریباً ۱۰٪ جنین زیگوتی) (۲۲).

غیر طبیعی بودن بیان پروتئین‌های ذخیره‌ای در جنین‌های رویشی بیشتر به دلیل عدم بلوغ کامل جنین‌ها می‌باشد تا مشکلات وراثتی مرتبط با جنین‌زایی رویشی (۲۲). در سویا نشان داده شده است که به کارگیری ABA در محیط کشت سبب افزایش میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای در جنین‌های رویشی می‌گردد. در شرایط طبیعی غلظت ABA در طی مرحلهٔ نمو بذر افزایش یافته و موجب شروع و تداوم خواب می‌گردد. آن‌گونه که مشخص شده افزودن این ماده به محیط کشت، مانع تشکیل جنین‌های غیر طبیعی و همچنین کاهش تعداد جنین‌های رویشی می‌گردد (۲۰ و ۲۲).

علاوه بر ABA ، استفاده از اسموتیکوم ها نیز نقش مهمی در بیان صحیح پروتئین‌های ذخیره ای در مرحلهٔ نمو جنین‌های

شکل ۳. برخی مراحل جنین‌زایی رویشی در سویا. A) ریزنمونه‌کشت شده، B) نمونه‌ای از پینه جنین زا، C) ظهور جنین کروی، D) توده‌ای از جنین، E) توده‌ای از جنین‌ها در مراحل خنجری شکل و لپه‌ای، F) جنین بالغ سویا، G) انتقال گیاهچه به گلدان.

رویشی ایفا می‌کند. استفاده از مانیتول(۲۰-۱۳٪) به تنهایی می‌تواند جایگزین ۴۰ میکرومول ABA در خلال مراحل نهایی بلوغ جنین درخت کاج باشد که سبب ممانعت از جوانه‌زنی پیش از موعد شده و اجازهٔ تجمع پروتئین‌های ذخیره‌ای را فراهم می نماید. سوربیتول نیز چنین اثری را در کتان از خود نشان داده است (۲۲).

فشار اسمزی مناسب سبب شروع تولید ABA می‌شود که موجب آغاز فرایندهای بلوغ فیزیولوژیکی همانند تجمع مواد ذخیره‌ای و تحریک تحمل به خشک شدن در جنین‌ها می‌گردد. فشار اسمزی می‌تواند نیاز به استفاده از ABA را در محیط

کشت تا حدودی مرتفع سازد(۲۰ و ۲۳). به منظور افزایش درصد تبدیل جنین رویشی به غیر از تیمار آبگیری از موادی همچون ساکاروز، مالتوز (۱۴)، پلی اتیلن گلیکول(۱۴ و ۲۳)، مانیتول، سوربیتول (۲۳) و محلول های نمکی اشباع شده (۱۰) نیز استفاده شد. واکر و پاروت به منظور بهبود درصد تبدیل و جوانه‌زنی جنین‌های رویشی سویا از پلی اتیلن گلیکول، مانیتول و سوربیتول استفاده کردند. در بررسی آنها پلی اتیلن گلیکول ۱۰٪ فراوانی جوانه زنی را تا ۸۷٪ بهبود بخشید. افزایش سوربیتول تا ۳٪ فراوانی جوانه زنی را تا ۹ برابر و درصد تبدیل را به ۵±۵۱٪ افزایش داد. اما کاربرد مانیتول با غلظت ۳٪ تأثیری بر بهبود درصد تبدیل و جوانه زنی جنین رویشی سویا نداشت (۲۳).

بوخیم و همکاران نیز در بررسی خود قابلیت تیمار آبگیری را بر درصد تبدیل جنین‌های رویشی سویا مطالعه کردند (۹). در آزمایش آنها تیمار آبگیری، با کاهش رطوبت تا ۶۰٪ تأثیر معنی‌داری بر درصد تبدیل و جوانه زنی جنین‌های رویشی داشت. بلکمن و همکاران نیز تأثیر تیمار آبگیری را بر درصد تبدیل جنین‌های زیگوتی بررسی نموده و نشان دادند که زمان اعمال تیمار آبگیری در جنین‌های زیگوتی بسیار بحرانی می‌باشد. در بررسی آنها کاهش رطوبت نسبی جنین زیگوتی تا ۱۳٪ بعد از گذشت ۴۴ روز از لقاح بیشترین درصد تبدیل را نشان داد (۷).

مشاهدات ما نشان داده است که برای کسب بنیه تبدیل در جنین‌های رویشی سویا همانند جنین‌های زیگوتی، اعمال تیمار آبگیری می‌تواند جایگزین به کارگیری روش‌های دیگر گردد. اما چگونگی اعمال این تیمار و نیز زمان آن نیاز به بررسی بیشتر و دقیق‌تری با توجه به ژنوتیپ مورد استفاده دارد. تبدیل جنین‌های رویشی به گیاه و جوانه زنی آنها درست از روز بعد از تیمار آبگیری و کشت آنها در محیط MS0 آغاز شد. شروع جوانه زنی با رشد ریشه آغاز گردید. پس از کمتر از یک هفته در جنین‌های رویشی که قابلیت تبدیل را یافته بودند، رشد اندام‌های جنین‌های زیگوتی بسیار بحرانی می‌باشد. در بررسی آنها کاهش رطوبت نسبی جنین زیگوتی تا ۱۳٪ بعد از گذشت ۴۴ روز از لقاح بیشترین درصد تبدیل را نشان داد (۷).

مشاهدات ما نشان داده است که برای کسب بنیه تبدیل در جنین‌های رویشی سویا همانند جنین‌های زیگوتی، اعمال تیمار آبگیری می‌تواند جایگزین بکار گیری روش‌های دیگر گردد. اما چگونگی اعمال این تیمار و نیز زمان آن نیاز به بررسی بیشتر و دقیق‌تری با توجه به ژنوتیپ مورد استفاده دارد. تبدیل جنین‌های رویشی به گیاه و جوانه زنی آنها درست از روز بعد از تیمار آبگیری و کشت آنها در محیط MS0 آغاز شد. شروع جوانه زنی با رشد ریشه آغاز گردید. پس از کمتر از یک هفته در جنین‌های رویشی که قابلیت تبدیل را یافته بودند، رشد اندام‌های هوایی شروع شد. جنین‌های رویشی جوانه زده به گلدان‌های کوچک حاوی پیت ماس انتقال یافتند (شکل 3G). در شکل 3E-F تنوع مرفولوژیکی موجود در جنین‌های رویشی حاصل نشان داده شده است. هر چند جنین‌های رویشی حاصل از نظر مرفولوژی در ابتدا تغییراتی داشتند و در آنها از این نظر تنوع بسیاری دیده می‌شد، اما در این بررسی هیچ گونه تأثیری بر نحوه رشد گیاهچه های حاصل از آنها نداشت و در گیاهان روئیده نیز تغییر ظاهری قابل تشخیصی دیده نشد.

منابع مورد استفاده

۱. آرتکا، آر.ان. ۱۳۷۹. *کاربرد مواد رشد گیاهی- مبانی فیزیولوژیکی (ترجمه ا. حجازی و م. کفاشی صدقی)*. چاپ اول ، انتشارات دانشگاه تهران.

۲. ابراهیمی م. ۱۳۸۱. ارزیابی تحمل به تنش شوری پینه‌های سوماتیک پرتوتابی شده در سویا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل.

۳. رحیمیان ح. و م. خسروی. ۱۳۷۵. *فیزیولوژی بذر (تالیف: جان ا. بریانت)*. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۴. شریفی ا.، ع. باقری، س.ر. وصال و ح. علیزاده. ۱۳۸۲. بهینه کردن عوامل مؤثر بر جنین‌زایی سوماتیکی در سویا. مجموعه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، ۲۰–۱۸ شهریور، دانشگاه فردوسی مشهد.

5. Bailey, M.A., H.R. Boerma and W.A. Parrott. 1993b. Genotype-specefic optimization of plant regeneration from somatic embryos of soybean. Plant Sci. 93: 117-120.
6. Bailey, M.A., W.A. Parrott and H.R. Boerma. 1993a. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro* Cellular& Developmental Biology-Plant 29:102-108.
7. Blackman, S.A., H. Scott Wettlaufer, L. Ralph Obendorf and A. Carl Leopold. 1991. Maturation Proteins Associated with Desiccation Tolerance in Soybean. Plant Physiol. 96: 868-874.
8. Bostock R.M. and R.S. Quatrano. 1992. Desiccation Stress. Plant Physiol. 93:630-638.
9. Buchheim J.A., S.M.Colburn and J.P.Ranch. 1989. Maturation of Soybean Somatic Embryos and the Transition to Plantlet Growth. Plant Physiol. 89:768-775.
10. Dumanoglu H. 2000. Dessiccation Using Saturated Salt Solutions and Improvement Germination Rate of Walnut (*Juglans regia* L.) Somatic Embryos. Turk. J. Agric. For. 24: 491–498
11. Ghazi T. D., H. V. Cheema and M. W. Nabors. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, Glycine max L. Plant Cell Rep. 5:452-456.
12. Hangsink M. and D. F. Hildebrand. 2003. Effects of proliferetion, maturation, and desiccation methods on conversion of soybean somatic embryos. *In Vitro* Cellular & Develop. Biol. - Plant 39: 6: 623-628.
13. Komatsuda,T. and S. W. Ko. 1990. Screening of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] genotypes for somatic embryo production from immature embryo. Japan J. Breed. 40:249-251.
14. Körbes, A.P. and A. Droste. 2005. Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. Pesq. agropec. bras., Brasília 40(3): 211-216.
15. Lazzeri, P, A., D. F. Hildebrand and G. B. Collins. 1987. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. Plant Mol. Biol. Rep. 10:209-220.
16. Nadolska, A. Orczyk and W. Orczyk. 1994. New aspects of soybean somatic embryogenesis. Euphytica 80:137-143.
17. Parrott, W.A., G. Dryden, S. Vogt, D.F. Hildebrand, B.G. Collins and E.G. Williams. 1988. Optimizing somatic embryogenesis and embryo germination in soybeans. *In Vitro* Cellular& Develop. Biol. Plant 24:817-820
18. Samoylov, V. M., D. M. Tucker, W. A. Parrott. 1998. Soybean[*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation. *In Vitro* Cellular& Developmental Biology-Plant 38:8-13.
19. Santarém, E. R., B. Pelissier and J. J. Finer. 1997. Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro* Cellular& Develop. Biol. Plant 33:13-19.
20. Schmidt M. A., D. M. Tucker, E. B. Cahoon and W. A. Parrott. 2005 Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. Plant Cell Rep. 24:383-391.
21. Shoemaker R. C., L. A. Amberger, R. G. Palmer, L. Oglesby and J. P. Ranch. 1991. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *In Vitro* Cellular& Develop. Biol. Plant 27P:84-88.
22. Trevor A. Thorpe. 1995. In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Pub., New York.
23. Walker D. R. and W. A. Parrott. 2001. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64:55-62.
24. Wright M. S., K. L. Launis, R. Novitzky, J. H. Duesing and T. Harms. 1991. A simple method for the recovery of multiple fertile plants from individual somatic embryos of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *In Vitro* Cellular& Develop. Biol. Plant 27:163-157.