مجله علوم كشاورزي ايران
جلد ۱-۳۷، شماره ۱، سال ۱۳۸۵ (٦٧-٥٩)

تلاقي بين گونه‌اي و بررسي نجات جنين و قابليت باززايي در تعدادي از گونه‌هاي پنبه

عمران عاليشاه[۱]، پريچهره احمديان تهراني[۲] ، محمدرضا بي‌همتا[۳]، منصور اميدي[٤] و محمود مصباح[٥]
۱، عضو هيات علمي و استاديار مؤسسه تحقيقات پنبه كشور (گرگان) ۲، ۳، ٤، استاد و دانشياران پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران ٥، عضو هيات علمي مؤسسه تحقيقات بذر چغندر قند كرج
تاريخ پذيرش مقاله ۸٤/۲/۷

خلاصه

جنس گوسيپيوم شامل ٥۰ گونه زراعي و وحشي است كه در دو گروه سيتولوژيكي ديپلوئيد و تتراپلوئيد گروه‌بندي مي‌شوند. گونه‌هاي ديپلوئيد و تتراپلوئيد پنبه از نظر تلاقي پذيري ناسازگار هستند از اين روي كشت و نجات جنين براي فائق آمدن بر ناسازگاري موجود و توليد هيبريدهاي بين گونه‌اي امري ضروري است. به منظور بهينه‌سازي روش كشت و نجات جنين در تلاقي‌هاي بين گونه‌اي پنبه و تعيين عكس‌العمل جنين‌هاي پنبه در محيط‌هاي كشت مختلف، دو گونه تتراپلوئيد **G.hirsutum (2n=4x=52)** و **G.barbadense** و دو گونه ديپلوئيد پنبه **G.herbaceum (2n=2x=26)** و **G.arboreum**) در مزرعه تحقيقاتي دانشكده كشاورزي كرج كشت و در زمان گلدهي تلاقي‌هاي لازم بين گونه‌هاي تتراپلوئيد و ديپلوئيد انجام گرفت. ابتدا مناسب‌ترين زمان انتخاب و انتقال جنين به شرايط اين ويترو تعيين شد و سپس تخمك‌هاي حاوي جنين ۹ ژنوتيپ (پنج هيبريد بين گونه‌اي و ٤ گونه والديني) در سطح چهار محيط غذايي مختلف كشت و مورد مطالعه قرار گرفت و داده‌هاي حاصل بصورت آزمايش فاكتوريل و در قالب طرح بلوك‌هاي كامل تصادفي تجزيه آماري گرديد. نتايج نشان داد كه اثر ژنوتيپ، محيط كشت و اثر متقابل ژنوتيپ × محيط كشت روي اندازه كالوس، درصد كالوس و درصد جوانه‌زني جنين‌هاي درون تخمك در سطح آماري ۱% معني‌دار است. گونه‌هاي **G.herbaceum**، **G.arboreum** و **G.hirsutum** از نظر كالوس‌زايي و گونه **G.barbadense** و هيبريدهاي آن از نظر درصد جوانه‌زني و قابليت باززايي از امتياز بالاتري برخوردار بودند. با توجه به عكس‌العمل تخمك‌هاي حاوي جنين در سطح محيط‌هاي كشت، محيط كشت **MS3** بعنوان يك محيط مناسب و با قابليت استفاده آسان و گونه **G.barbadense** بعنوان يك گونه بخشنده بمنظور بالا بردن راندمان نجات جنين در تلاقي‌هاي بين گونه‌اي پنبه شناسايي گرديد.

واژه‌هاي كليدي: تلاقي بين گونه‌اي، پنبه، نجات جنين، درون شيشه، كشت جنين درون تخمك

مقدمه

پنبه بعنوان يك گياه صنعتي و استراتژيك از اهميت بسيار بالايي در تامين مايحتاج اوليه بشري، مواد اوليه صنايع، اشتغال زايي، اقتصاد و ارز آوري برخوردار است. جنس پنبه(گوسيپيوم)[۱] شامل ٤٥ گونه ديپلوئيد (2n=2x=26) و ٥ گونه تتراپلوئيد (2n=4x=52) مي‌باشد كه بر اساس تشابهات كروموزومي در ۸

1. *Gossypium*

مكاتبه كننده: عمران عاليشاه

گروه ژنومي ديپلوئيد (A تا K) و يك گروه ژنومي تتراپلوئيد گروه‌بندي مي‌شوند (١، ٢٠). تلاقي بين گونه‌اي يكي از مهمترين ابزارهاي اصلاح نباتاتي جهت معرفي تنوع وحشي، انتقال صفات مطلوب از گونه‌هاي وحشي به گونه‌هاي زراعي، مطالعه ساختار ژنوم‌ها، روابط فيلوژنتيكي[1]، انتقال ژن و توليد گياهان جديد محسوب مي‌شود (٣). گونه‌هاي وحشي به لحاظ داشتن صفات مطلوبي چون مقاومت به آفات و امراض، تحمل به خشكي، كيفيت الياف مناسب و نرعقيمي سيتوپلاسمي از اهميت ويژه‌اي در اصلاح نباتات برخوردار هستند (١، ١٠). انتقال ژن‌ها و صفات مطلوب از گونه‌هاي وحشي به ارقام زراعي پنبه از طريق روش‌هاي سنتي و يا كلاسيك اصلاح نباتاتي بخاطر اختلافات مربوط به ساختار اجزاي گل, مشكلات جوانه‌زني دانه گرده در سطح كلاله گل‌هاي مادري و همچنين از بين رفتن جنين و آندوسپرم در مراحل مختلف تكاملي بسيار مشكل و در بسياري موارد ناممكن است لذا در برخي موارد با كنترل مصنوعي روند باروري، انتخاب والدين مناسب، دستورزي والدين، تغيير روشهاي اخته كردن و گرده افشاني، تيمارهاي شيميايي و نجات جنين امكان توليد گياهان هيبريد فراهم مي‌گردد (١٧، ١٩، ٢١).

تلاقي بين گونه‌هاي ديپلوئيد و تتراپلوئيد پنبه بمنظور انتقال صفات كيفي و آگرونوميكي مطلوب به ارقام تتراپلوئيد تجارتي حائز اهميت است و ايجاد تركيبات ژنتيكي هيبريد بين دو گونه مذكور از طريق انجام تلاقي در شرايط طبيعي[2] و بدنبال آن كشت جنين[3] در شرايط درون شيشه[4] تسهيل مي‌گردد (٤). مطالعات انجام شده در خصوص باروري و جنين شناسي تلاقي‌هاي A2 × 1(AD) و تلاقي‌هاي معكوس آنها نشان داد كه عامل ناهنجاري و از بين رفتن جنين در تلاقي‌هاي مستقيم و معكوس متفاوت است (٨).

كشت تخمك‌هاي گونه*G.hirsutum* با ژنوم (AD1) توسط استوارت و هسو[5] گزارش شد و آنها اعلام داشتند كه ناسازگاري‌هاي دخيل در رشد جنين پنبه، از طريق بكارگيري روش كشت جنين درون تخمك[6] كه مبتني بر كشت تخمك‌هاي حاوي جنين است قابل رفع است (١٤). تلاقي بين گونه‌هاي واجد ژنوم C3,E1, E4 , A1,A2,D1,D3-d با گونه *G.hirsutum* و تلاقي گونه‌هاي واجد ژنومA1, C3 , E2 , E4 با گونه *G.barbadense* نيز نشان داد كه در شرايط رشد طبيعي, قوزه‌ها فاقد بذر يا بعضاً شامل بذور ناقص بدون قابليت جوانه‌زني هستند (١١). در گزارش ديگري آمده است كه نسبت جنين هيبريد تشكيل شده در تلاقي‌هاي بين گونه‌اي پنبه بر حسب نوع گونه والديني، جهت تلاقي و ژنوتيپ ارقام والديني داخل يك گونه اختلاف معني‌دار نشان مي‌دهد از اين روي انتخاب ژنوتيپ مناسب به منظور بهبود روند كشت و نجات جنين پنبه تاكيد شده است (١٣).

از كشت تخمك پنبه علاوه بر نجات جنين دز تلاقي‌هاي بين گونه‌اي، بمنظور مطالعه تكامل الياف پنبه، اثرات متقابل قارچ ـ گياه، مدل سازي واكنش به تنش‌هاي حرارتي، توضيح و تفسير مسيرهاي دخيل در تشكيل پيگمان‌هاي طبيعي در پنبه‌هاي الياف رنگي، مطالعه تشكيلات ديواره سلولي، بررسي عوامل تنظيم كننده رشد و تكامل جنين، تظاهر ژنهاي كنترل كنندهٔ جنين‌زايي و مطالعه تظاهر زودگذر[7] در ساختارهاي ژني استفاده مي‌شود (١٥). اين تحقيق با هدف شناسايي و معرفي شرايط بهينه بمنظور نجات جنين‌هاي هيبريد حاصل از تلاقي گونه‌هاي ديپلوئيد و تتراپلوئيد و ارائه راهكارهاي مناسب براي پيشبرد پروژه‌هاي توليد هيبريدهاي بين گونه‌اي پنبه مورد بررسي قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

چهارگونه زراعي پنبه به نامهاي ١- گونه آپلند (*Gossypium hirsutum* var. sahel) ٢- گونه الياف بلند (*G.barbadense* var. barbadense1518) ٣- گونه پنبه بومي ايران (*G.herbaceum* var. Hashemabad landrace) ٤- گونه پنبه بومي هند و پاكستان (*G.arboreum*) در سال

1. Phylogenetic
2. *in situ*
3. embryo culture
4. *in vitro*
5. Stewart and Hsu (1977)
6. in- ovulo embryo culture
7. transient

۱۳۸۱ در مزرعه تحقيقاتي دانشكده كشاورزي كرج با همديگر تلاقي داده شدند كه در اين تلاقي‌ها گونه‌هاي تتراپلوئيد بعنوان والد مادري و گونه‌هاي ديپلوئيد بعنوان والدين گرده دهنده در نظر گرفته شدند و تلاقي‌هاي انجام شده عبارتند از:

1. *G.hirsutum*×*G.herbaceum*
2. *G.hirsutum*×*G.arboreum*
3. *G.barbadense*×*G.herbaceum*
4. *G.barbadense*×*G.arboretum*
5. *G.herbaceum*×*G.arboreum*

به منظور تعيين زمان مناسب انتخاب تخمك‌هاي حاوي جنين از نظر سهولت استخراج و ميزان رشد الياف، تعدادي از گل‌هاي دورگ شده در روزهاي اول تا پنجم پس از گرده افشاني انتخاب و در آزمايشگاه با استفاده از ميكروسكوپ و بينوكولار مورد بررسي قرار گرفتند. سپس تخمك‌هاي حاوي جنين ۹ ژنوتيپ (۵ هيبريد بين گونه‌اي و ٤ گونه والديني) در زمان مناسب و در شرايط استريل جداسازي و در سطح چهار محيط غذايي زير كشت شدند.

a- محيط كشت مايع BT[1] حاوي :

BT+ IAA(2mg l^{-1})+ Kin(0.5mg l^{-1})+ CH(250 mg l^{-1})+ NH4Cl2(860 mg l^{-1})+ Sucrose(%4)

b- محيط كشت جامد MS1[2] :

MS+IAA(1.5 mg l^{-1})+ Kin(0.5 mg l^{-1}) +CH(250mgl^{-1})+ Sucrose (%3)

c- محيط كشت جامد MS2 :

MS+IAA(1.5 mg l^{-1})+ Kin(0.2 mg l^{-1}) +CH(250mgl^{-1})+ Sucrose (%3)

d- محيط كشت جامد MS3 :

MS+IAA(2 mgl^{-1})+ Kin(0.5 mg l^{-1}) + CH(250 mg l^{-1})+ Sucrose (%3)

پس از شروع جوانه زني، جنين‌هاي جوانه زده درون تخمك‌هاي كشت شده به محيط كشت متعادل SH[3] (١٤) منتقل و در دماي ۲±۲۸ و با ١٦ ساعت روشنايي و ۸ ساعت تاريكي قرار گرفتند. در طي رشد تخمك‌هاي حاوي جنين، قابليت كالوس‌زايي ژنوتيپ‌هاي مختلف، زمان شروع جوانه زني، درصد جوانه زني، درصد توليد گياهچه يادداشت برداري گرديد. درصد و اندازه كالوس بر اساس روش استاندارد هوكر و ني برز (۹) تعيين و ثبت گرديد. داده‌هاي مربوط به درصد كالوس، اندازه كالوس و درصد جوانه‌زني بصورت آزمايش فاكتوريل و در قالب طرح آماري بلوك‌هاي كامل تصادفي (بدليل قرار گرفتن كشت‌هاي مختلف در طبقات مختلف دو يا چند اطاقك‌هاي رشد) تجزيه واريانس گرديد و مقايسه ميانگين ژنوتيپ‌ها به روش آزمون چند دامنه‌اي دانكن انجام پذيرفت.

بمنظور تائيد صحت تلاقي از روش شمارش كروموزومي استفاده گرديد. براي اين منظور، تعدادي جوانه بصورت تصادفي انتخاب گرديد. عمل پيش تيمار در محلول ۰/۰۰۲ مولار ۸-هيدروكسي كينولئين بمدت ۵ ساعت و عمل تثبيت با استفاده از تثبيت كننده فارمر (١اسيد استيك مطلق : ۳ اتانول) به مدت ٢٤ ساعت و عمل هيدروليز نمونه‌ها در اسيدكلريدريك نرمال در دماي ٦٠ درجه سانتي‌گراد و بمدت ١٥ دقيقه صورت پذيرفت. نمونه‌هاي ميكروسكوپي با روش اسكواش[4] تهيه و با استفاده از رنگ استواورسئين ۲% رنگ آميزي شدند.

نتايج و بحث

بررسي انجام شده نشان داد كه حساسيت گونه‌هاي مختلف پنبه در مقابل اخته كردن و گرده‌دهي متفاوت است. در بين گونه‌هاي والديني، گونه‌هاي *G.arboreum* و *G.barbadense* به ترتيب بيشترين و كمترين حساسيت را نسبت به اخته كردن يا گرده‌دهي نشان دادند. گونه *G.herbaceum* در مقايسه با *G.arboreum* از قدرت گلدهي و حفظ گل بيشتري برخوردار بود(جدول ١). در تلاقي *G.herbaceum* × *G.arboreum*، بيش از ۹۰ درصد گل‌هاي دورگ قبل از روز سوم ريزش كردند. ريزش گل در تلاقي گونه *G.hirsutum* با هر يك از گونه‌هاي ديپلوئيد از روز سوم آغاز و حداكثر تا روز نهم خاتمه يافت. در حالي كه در گونه *G.barbadense* اين پديده از روز چهارم يا پنجم آغاز و تا روز دوازدهم بعد از گرده افشاني ادامه داشت. گل‌هاي تلقيح نشده در مقايسه با گل‌هاي تلقيح شده زودتر

1. Baseley and Ting
2. Moorashig and Skoog
3. Stewart and Hsu
4. squash method

ريزش كردند. جيالواليس و سيگول (٢٠٠١) علت اين پديده را تحريك رشد تخمدان و حركت مواد غذايي به سمت آن در اثر گرده‌دهي اعلام داشتند.

با توجه به دوام گل‌هاي هيبريد در سطح گياه والدي و رشد الياف پنبه در طي تكامل تخمك‌ها، مناسب‌ترين زمان انتخاب قوزه‌هاي جوان در تلاقي‌هاي ديپلوئيد× تتراپلوئيد, روز سوم بعد از گرده افشاني و در تلاقي‌هاي ديپلوئيد× ديپلوئيد روز دوم بعد از گرده افشاني تعيين شد و تاخير در اين زمان مشكلات ريزش گل‌هاي دورگ شده، چسبندگي تخمك‌ها و مشكلات جداسازي و كشت تخمك‌ها را در پي خواهد داشت. ميرزا و شيخ (١٩٩٣) و ژانگ و استوارت (١٩٩٧) زمان انتخاب و كشت جنين پنبه را ٥-٣ روز پس از گرده افشاني گزارش كردند. فنگ و براون (٢٠٠٠) نيز به رشد و چسبندگي الياف در گونه‌هاي پنبه اشاره كردند.

تخمك‌هاي بارور شده و حاوي جنين گونه‌هاي مختلف پنبه در سطح محيط‌هاي كشت مايع و جامد، رشد متفاوتي نشان دادند برخي توليد كال نموده و برخي ديگر بدون كال زايي و مشابه جنين‌هاي حقيقي رشد نمودند (جدول ٢). در بين گونه‌هاي والديني, گونه‌هاي ديپلوئيد (*G.herbaceum* و *G.arboreum*) در تمام محيط‌هاي كشت اعم از جامد و يا مايع توليد كالوس نمودند. در حاليكه گونه‌هاي تتراپلوئيد عكس‌العمل‌هاي متفاوتي نشان دادند بطوري كه گونه *G.hirsutum* در تمام محيط‌ها تمايل به كالوس‌دهي (كامل تا نسبي)، ولي گونه *G.barbadense* تقريباً در تمام محيط‌ها تمايل به رشد مستقيم (بدون كالوس‌دهي) داشتند. هيبريد*G.barbadense*×*G.herbaceum* تمايل به رشد مستقيم، هيبريدهاي *G.hirsutum* × *G.herbaceum* و *G.barbadense* × *G.arboreum* تمايل به كالوس‌دهي نسبي و هيبريدهاي *G.hirsutum*×*G.arboreum* و *G.herbaceum* × *G.arboreum* تمايل به كالوس‌دهي كامل نشان دادند. اين نتايج تاثير ژنوتيپ بر نحوه رشد جنين‌هاي هيبريد پنبه را تائيد مي‌نمايد. عزيزخودژوف و اوماروف (١٩٨٨)، ميرزا و شيخ (١٩٩٣) و بورولي و همكاران (٢٠٠٠) ضمن تائيد نقش و تاثير ژنوتيپ در موفقيت نجات جنين، نتايج تقريباً مشابهي را در خصوص نحوه رشد تخمك در پنبه‌هاي آپلند و گونه *G.arboreum* گزارش كردند.

نتايج تجزيه واريانس اندازه و درصد كالوس‌هاي تشكيل شده در سطح تخمك‌ها و همچنين درصد جوانه‌زني جنين‌هاي پنبه در جدول ٣ ارائه شده است. بر اساس نتايج حاصله، اثر ژنوتيپ، محيط كشت و اثرات متقابل آنها روي اندازه و درصد كالوس در سطح آماري ١%، اثر ژنوتيپ و محيط كشت روي درصد جوانه زني در سطح آماري ١% و اثر متقابل (ژنوتيپ × محيط كشت) در سطح آماري 0% معني‌دار شده است.

جدول ١ - نتايج حاصل از بررسي ميزان ريزش گل‌هاي دورگ شده درگونه‌ها و هيبريدهاي مختلف پنبه

ژنوتيپ	حداكثر زمان ابقاي گل اخته شده در والد مادري (روز)	شروع ريزش پس از گرده افشاني(روز)	درصد ريزش (%)	تعداد گل ريزش يافته ٤ روز بعد از گرده افشاني	تعداد گل مورد بررسي
G.herbaceum	٣	٢	٩٠	٩	١٠
G.arboreum	٢	٢	١٠٠	٥	٥
G.hirsutum	٥	٣	٧٠	٧	١٠
G.barbadense	٧	٤	٥٠	٥	١٠
G.hirsutum× *G.herbaceum*	٩	٣	٢٦	٤	١٥
G.barbadense× *G.herbaceum*	١٢	٤	١٠	١	١٠
G.hirsutum× *G.arboreum*	٧	٣	٤١	٥	١٢
G.barbadense× *G.arboreum*	١٠	٥	٨	١	١٢
G.herbaceum×*G.arboreum*	٣	٢	١٠٠	١٠	١٠

جدول ٢- توليد كالوس تخمك هاي حاوي جنين هاي نارس پنبه در سطح محيط‌هاي مختلف كشت

ژنوتيپ		MS3	MS2	MS1	BT
G.herbaceum		كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد
G.arboreum		كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد
G.hirsutum		كالوس دهي نسبي	كالوس دهي زياد	كالوس دهي نسبي	كالوس دهي نسبي
G.barbadense		عدم كالوس	عدم كالوس	كالوس دهي نسبي	عدم كالوس
G.hirsutum× *G.herbaceum*		كالوس دهي نسبي	كالوس دهي نسبي	كالوس دهي نسبي	كالوس دهي نسبي
G.barbadense× *G.herbaceum*		عدم كالوس	عدم كالوس	كالوس دهي نسبي	عدم كالوس
G.hirsutum× *G.arboreum*		كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد	كالوس دهي نسبي	كالوس دهي نسبي
G.barbadense× *G.arboreum*		كالوس دهي نسبي	كالوس دهي نسبي	كالوس دهي نسبي	عدم كالوس
G.herbaceum× *G.arboreum*		كالوس دهي نسبي	كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد	كالوس دهي زياد

جدول ٣ - نتايج تجزيه واريانس مشخصات كالوس‌دهي و درصد جوانه زني در هيبريدهاي بين گونه‌اي پنبه

منابع تغييرات	درجه آزادي	ميانگين مربعات(MS)		
		اندازه كالوس ($\sqrt{x}$)	درصد كالوس دهي ($\sqrt{x}$)	درصد جوانه زني ($\sqrt{x}$)
تكرار	١٧	٦/٥١٦ ns	٠/٩١١ ns	٠/٥٤ ns
ژنوتيپ	٨	٢٤٦/٨٧ **	١٧/٥٣٤ **	١٠/٢٤٦ **
محيط كشت	٣	٥٠/٢٢٦ **	٦/٦٧١ **	٤/١٢١ **
ژنوتيپ × محيط كشت	٢٤	١٨/٢٦٦ **	٣/٤٥١ **	١/٩٠٨ *
اشتباه	٣١٩	٦/٧٦١	١/٢٥٥	٠/٩٨٧

n.s : غير معني دار در سطح ٥% * : معني دار در سطح ٥% ** : معني دار در سطح ١%

نتايج حاصله نشان مي‌دهد كه بين گونه‌هاي مختلف پنبه از لحاظ قابليت كالوس‌دهي و جوانه‌زني اختلاف معني‌داري وجود دارد و اين امر ضرورت شناسايي و انتخاب گونه‌هاي والديني مناسب براي شركت در تلاقي‌هاي بين گونه‌اي جهت دستيابي به اهداف خاص اصلاحي و همچنين انتخاب يك محيط كشت مناسب جهت افزايش راندمان كشت و نجات جنين‌هاي هيبريد پنبه را تائيد مي‌نمايد. در برخي از گياهان نظير گندم و صيفي‌جات به وجود چنين اختلافي در سطح ارقام داخل هر گونه نيز اشاره شده است (١٩) و احتمال مي‌رود چنين اختلافي در سطح ارقام هر يك از گونه‌هاي پنبه نيز ديده شود كه مستلزم بررسي بيشتر در طي تحقيقات آتي مي‌باشد.

مقايسه ميانگين درصد و اندازه كالوس در والدين و هيبريدهاي بين گونه‌اي پنبه در جدول ٤ ارائه شده است. از لحاظ درصد كالوس‌دهي ژنوتيپ‌هاي *G.herbaceum* × *G.arboreum* ، *G.herbaceum* و *G.arboreum* به ترتيب با ٩٥/٠٧، ٨٦/٥١ و٨٥/٦٤ درصد بيشترين درصد كالوس‌دهي و ژنوتيپ‌هاي *G.barbadense* و *G.herbaceum** *G.barbadense* به ترتيب با ١٤/٣٨ و ٢٢/٤٧ درصد كمترين درصد كالوس‌دهي را نشان دادند. از لحاظ اندازه كالوس نيز در بين گونه‌هاي والديني، گونه *G.hirsutum* در كلاس اول و گونه *G.barbadense* در آخرين كلاس قرار گرفتند. صرفنظر از اختلاف گونه‌ها و ژنوتيپ‌هاي مختلف از نظر كالوس‌دهي، پديده كالوس‌دهي اثر منفي روي درصد جوانه‌زني و باززايي جنين‌هاي

درون تخمك‌هاي كشت شده داشته است بطوري كه با مقايسه درصد كالوس‌دهي (جدول ٤) و درصد جوانه‌زني در ژنوتيپ‌هاي مختلف (جدول ٥) چنين نتيجه شد كه ژنوتيپ‌هايي با درصد كالوس دهي كمتر معمولاً از درصد جوانه زني بالاتري برخوردار بوده‌اند (مانند *G.barbadense* با١٤/٣٨ درصد كالوس دهي و ٣١/١١ درصد تخمك جوانه زده). از اين روي احتمالاً استفاده از اين گونه در تلاقي‌هاي بين گونه‌اي موجب بهبود راندمان كشت و نجات جنين هاي هيبريد پنبه خواهد شد.

شروع جوانه زني

در گونه‌هاي ديپلوئيد، تخمك‌ها تقريباً ٦٠ روز پس از كشت جوانه زني خود را آغاز كردند در حالي كه اين پديده در گونه‌هاي تتراپلوئيد حدوداً ٣-٢ هفته ديرتر آغاز شد(جدول٥). بعلاوه در داخل گونه هاي ديپلوئيد يا تتراپلوئيد نيز از نظر شروع جوانه زني اختلاف ديده شد. در بين گونه هاي تتراپلوئيد، گونه *G.barbadense* در مقايسه با گونه *G.hirsutum* زودتر جوانه زده و از فراواني جوانه زني بالاتري برخوردار بوده است. در بين دورگ ها نيز، دورگ هاي *G.herbaceum* × *G.hirsutum* و *G.arboreum* × *G.hirsutum* نه تنها از فراواني جوانه زني پائين تري برخودار بودند بلكه زمان شروع جوانه زني آنها نيز نسبتاً ديرتر بود.

درصد جوانه زني

درصد جوانه‌زني ژنوتيپ‌هاي مختلف پنبه در سطح آماري١% اختلاف معني دار نشان داد (جدول ٣). بر اساس نتايج حاصل، گونه‌تتراپلوئيد*G.barbadense* وگونه‌ديپلوئيد *G.herbaceum* به ترتيب با ٣١/١١ و٢٢/١٤ درصد بيشترين درصد جوانه زني را نشان دادند اين خصيصه در نتاج هيبريد آنها نيز ديده شده است بطوري كه هيبريد *G.barbadense* × *G.herbaceum* با ٢٠/١٦ درصد بالاترين ميزان جوانه‌زني را در بين هيبريدهاي بين گونه اي نشان دادند(جدول ٥).

جدول ٤- مقايسه ميانگين اندازه كالوس و درصد كالوس‌دهي در والدين و دورگ هاي بين گونه‌اي پنبه بروش آزمون دانكن

ژنوتيپ	تعداد نمونه	درصد كالوس دهي	اندازه كالوس
G.herbaceum	٤٨	٨٦/٥١±٣/٨٤^{a}	١١/١٢±٠/٥٤^{b}
G.arboreum	٣١	٨٥/٦٤±٤/٩٠^{a}	١١/١٥±٠/٦٨^{b}
G.hirsutum	٥٥	٥٥/٢٩±٣/٦٨^{b}	١٥/٠٥±٠/٥١^{a}
G.barbadense	٤٨	١٤/٣٨±٣/٩٤^{d}	٥/٢٧±٠/٥٤^{d}
G.hirsutum×G.herbaceum	٥٠	٤٣/٧٢±٣/٨٦^{bc}	١١/٠٥±٠/٥٣^{b}
G.barbadense×G.herbaceum	٤٨	٢٢/٤٧±٣/٩٤^{d}	٧/٩٨±٠/٥٤^{c}
G.hirsutum×G.arboreum	٤٣	٣٧/٦١±٤/١٦^{c}	٩/٦٤±٠/٥٧^{bc}
G.barbadense×G.arboreum	٢٧	٤١/٧٥±٦/٦٢^{c}	١٠/٦٢±٠/٧٣^{b}
G.herbaceum×G.arboreum	٢٢	٩٥/٠٧±٥/٨٢^{a}	٨/٧٨±٠/٨١^{bc}
LSD		١٢/٣٨	١/٧٢

جدول ٥- درصد جوانه زني و باززايي حاصل از نجات جنين در گونه هاي والديني و هيبريدهاي مختلف پنبه

ژنوتيپ	تعداد تخمك كشت شده	شروع جوانه زني پس از كشت (روز)	تخمك جوانه زده		گياهچه باززايي شده		گياه كامل ريشه دارشده	
			درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
G.herbaceum	٥٧٨	٦٩-٥٦	٢٢/١٤)^{b}	١٢٨	٦/٥٧)	٣٨	٣/٢٨)	١٩
G.arboreum	٣١٣	٦٤-٥٨	٧/٣٤)^{cd}	٢٣	٢/٨٧)	٩	٠/٦٣)	٢
G.hirsutum	٥٩٩	٩٠-٧٥	١٠/٠١)^{cd}	٦٠	٤/٠٠)	٢٤	١/٦٦)	١٠
G.barbadense	٥٤٦	٧٥-٧٠	٣١/١١)^{a}	١٧٠	١٥/٠)	٨٢	٩/٣٤)	٥١
G.hirsutum× G.herbaceum	٥٥٤	٨٥-٦٧	١٣/١٧)^{c}	٧٣	٣/٢٤)	١٨	٠/٥٤)	٣
G.barbadense× G.herbaceum	٦١٠	٧٠-٦٠	٢٠/١٦)^{b}	١٢٣	٦/٧٢)	٤١	٢/٦٢)	١٦
G.hirsutum× G.arboreum	٤٨٨	٧٤-٦٨	٦/٧٦)^{d}	٣٣	١/٢٢)	٦		٠

G.barbadense× G.arboreum	٢٦٩	٥٥-٦٧	٣٦ (١٣/٣٨)^{c}	١٤ (٥/٢٠)	٢ (٠/٧٤)
G.herbaceum× G.arboreum	٢١٢	٥٥-٦٣	١٩ (٨/٩٦)^{cd}	٤ (١/٨٨)	٠

اثر نوع و ترکیب محیط کشت نیز بر درصد جوانه زني معني‌دار است (جدول ٣) و در بين محيط‌هاي كشت مورد مطالعه، محيط‌هاي MS3 و BT به ترتيب با ٢٣/٦٨ و ١٥/١٦ درصد جوانه‌زني در مقام‌هاي نخست اهميت قرار گرفتند (جدول ٦). گرچه در بسياري از منابع علمي براي كشت تخمك بمنظور نجات جنين پنبه استفاده از محيط كشت مايع BT شده است (١١، ١٦) ولي استفاده از محيط كشت MS3 ضمن برخورداري از كارآيي بيشتر، مشكل غرق شدن تخمك‌هاي حاوي جنين در محيط كشت مايع را نيز منتفي مي نمايد.

باززايي ژنوتيپ‌ها

باززايي ژنوتيپ‌هاي مختلف درسطح محيط كشت SH (١٤) متفاوت بود بطوري كه برخي از آنها از مرحله اژدري جلوتر نرفتند و برخي فقط توليد اندام‌هاي هوايي نمودند و برخي ديگر علاوه بر اندام‌هاي هوايي توليد ريشه نيز نموده‌اند. در بين گونه‌هاي‌والديني، گونه *G.barbadense* با ٩/٣٤ درصد بالاترين درصد باززايي و گونه *G.arboreum* با ٠/٦٣ درصد كمترين درصد باززايي را نشان داده است همچنين در بين هيبريدها نيز هيبريد *G.barbadense* × *G.herbaceum* با ٢/٦٢ درصد بالاترين درصد باززايي را نشان دادند. اين در حالي است كه از هيبريدهاي*G.hirsutum*×*G.arboreum*و *G. herbaceum* × *G. arboreum* هيچ گياهچه‌اي حاصل نشده است (جدول ٥). اين نتايج موضوع وابسته بودن پديده باززايي به ژنوتيپ[1] را كه ژانگ و همكاران (١٩٩٧) گزارش كرده بودند تائيد مي‌نمايد. برخي از محققين علت اين اختلافات را به روابط سيتوژنتيكي گونه‌ها، توان كال‌زايي گونه‌ها، سرعت و قابليت جوانه‌زني جنين نسبت داده‌اند (١١، ٢١). در اين تحقيق به تبعيت از منابع علمي از يك محيط كشت براي باززايي استفاده شده است و در اين حالت تنها ٣٠-٠ درصد از تخمك يا جنين‌هاي جوانه‌دار شده در ژنوتيپ‌هاي مورد آزمايش موفق به باززايي در سطح محيط كشت SH شدند و بيش از ٧٠ درصد جنين‌هاي جوانه زده باززايي نشده و يا از بين رفتند. از اين روي احتمال مي‌رود نوع و تركيب محيط كشت باززايي نيز در اين مسئله مؤثر باشد و شايد بتوان با تغيير يا شناسايي انواع جديدي از محيط كشت، راندمان باززايي را افزايش داد كه اميد مي‌رود در سال‌هاي آتي اين موضوع نيز مورد توجه دانشجويان و محققان قرار گيرد.

نتايج حاصل از بررسي كروموزومي گونه‌هاي والديني و هيبريدها نشان داد (جدول ٧) سلولهاي ديپلوئيد، تتراپلوئيد و هيبريدهاي تريپلوئيد بترتيب داراي 2n=26، 2n=52 و 2n=39 كروموزوم‌بودند.اين‌نتايج‌صحت‌عمليات دورگ‌گيري بين گونه‌هاي ديپلوئيد و تتراپلوئيد پنبه را تائيد نموده است (شكل ١و٢).

٦ - مقايسه ميانگين درصد جوانه زني در سطح محيط هاي مختلف كشت به روش دانكن

محيط كشت	$^{**}N_c$	N_g	G%
BT	١٠٦٨	١٦٢	١٥/١٦^{bc}
MS1	١٢٣٥	١٧٢	١٣/٩٢^{bc}
MS2	١١٠٦	١٥١	١٣/٦٥^{c}
MS3	٧٦٠	١٨٠	٢٣/٦٨^{a}

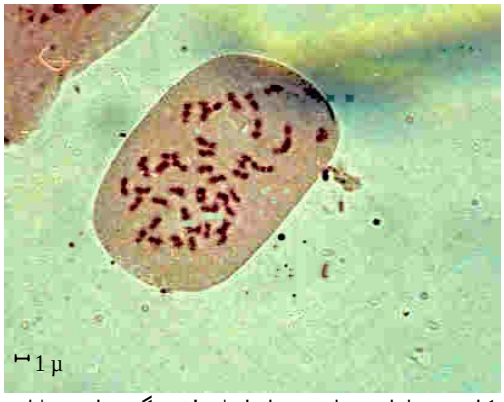
LSD = ٢/٢٧

** N_c : تعداد تخمك حاوي جنين كشت شده N_g : تعداد تخمك حاوي جنين جوانه زده G% : درصد جوانه زني

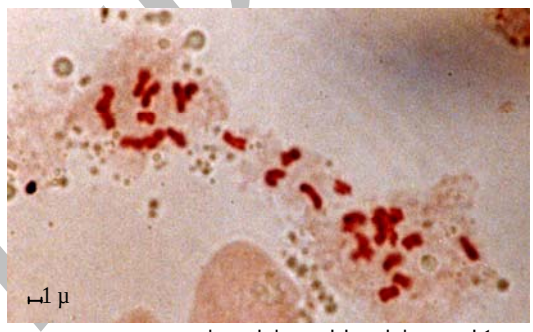
جدول ٧ - نتايج حاصل از شمارش كروموزومي در هيبريدهاي بين گونه اي پنبه

ژنوتيپ	تعداد كروموزوم	سطح پلوئيدي	تعداد نمونه
G.herbaceum	٢٦	ديپلوئيد	١٥
G.arboreum	٢٦	ديپلوئيد	١٠
G.hirsutum	٥٢	تتراپلوئيد	٢٠
G.barbadense	٥٢	تتراپلوئيد	١٨
G.hirsutum× G.herbaceum	٣٩	تريپلوئيد	١٠
G.barbadense× G.herbaceum	٣٩	تريپلوئيد	١١
G.hirsutum× G.arboreum	٣٩	تريپلوئيد	٥
G.barbadense× G.arboreum	٣٩	تريپلوئيد	٦
G.herbaceum× G.arboreum	٢٦	ديپلوئيد	٣

1 -genotype-dependent regeneration



شكل ١- سلول تريپلوئيد حاصل از تلاقي گونه‌هاي تتراپلوئيد و ديپلوئيد پنبه (3X=39)



شكل ٢- سلول متافازي سلول ديپلوئيد پنبه (2n=2x=26)

بحث

هيبريداسيون بين گونه‌اي يكي از روش‌هاي كارآمد و مناسب براي انتقال ژن و ايجاد تنوعات ژنتيكي جديد در اصلاح نباتات محسوب مي‌شود كه در مقايسه با ساير روش هاي نوين تكنولوژي زيستي (بيوتكنولوژي) نيازمند صرف هزينه و امكانات كمتري جهت انتقال ژن‌هاي جديد مي‌باشد ضمن آنكه در تمامي گونه‌هاي گياهي نيز قابل استفاده است. تلاقي پذيري گونه‌هاي مختلف بسته به روابط خويشاوندي آنها متفاوت است بعلاوه كشت و نجات جنين‌هاي هيبريد تحت تاثير ژنوتيپ، محيط كشت و اثرات متقابل آنها قرار مي‌گيرد و شناسايي ژنوتيپ و محيط كشت مناسب در بالابردن راندمان نجات جنين بسيار حائز اهميت است. يكي از مشكلات عمده انجام تلاقي بين گونه‌هاي ناسازگار پنبه، ريزش گل و ميوه در طي مراحل دورگ گيري است. كوچك بودن اندازه گل و طول دمگل در گونه هاي ديپلوئيد انجام عمليات عقيم سازي و دورگ گيري را با مشكل مواجه مي‌سازد بطوري كه درصد زيادي از گلهاي دورگ شده ريزش مي‌كنند از اين روي زمان تلقيح و انتقال تخمك به شرايط درون شيشه بايد ترجيحاً در دو روز اول پس از گرده افشاني انجام پذيرد. در تلاقي بين گونه‌هاي ديپلوئيد و تتراپلوئيد بهتر است از گونه‌هاي ديپلوئيد بعنوان والد گرده استفاده گردد تا بدين وسيله قسمتي از مشكلات مربوط به ريزش گل و ميوه حل گردد. از طرفي گونه‌هاي تتراپلوئيد پنبه در مقايسه با گونه‌هاي ديپلوئيد ريزش كمتري نشان دادند (جدول ١) بطوري كه گونه *G.barbadense* در مقايسه با سه گونه والديني ديگر علاوه بر دوام بيشتر گل‌هاي عقيم شده، كمترين ريزش گل و ميوه را نشان داد و اين موضوع امكان استفاده از حداكثر زمان ممكن براي دورگ‌گيري و همچنين فرصت بيشتر براي رشد تخمك و جنين در شرايط مزرعه (*in* situ) را فراهم مي‌سازد. همچنين در شرايط درون شيشه نيز تخمك‌هاي حاوي جنين اين گونه از لحاظ عكس العمل رشد، ميزان جوانه زني و توليد گياهچه نيز نسبت به ساير گونه‌هاي والديني برتري نشان داد و هيبريدهاي حاصل از اين گونه نيز بطور نسبي يا كامل از چنين ويژگي‌هايي برخوردار بودند لذا بنظر مي‌رسد استفاده از اين گونه در برنامه‌هاي تلاقي بين گونه‌اي ضمن انتقال خصوصيات كيفي الياف به ساير گونه‌ها، در بالابردن كارآيي كشت و نجات جنين پنبه نيز بسيار حائز اهميت خواهد بود.

در بسياري از منابع براي كشت و نجات جنين پنبه استفاده از محيط كشت مايع BT توصيه شده است اين در حالي است كه احتمال غرق شدن تخمك‌هاي حاوي جنين در محيط‌هاي كشت مايع وجود دارد و همچنين وجود مواد آلكالوئيدي و گوسيپولي در پنبه سبب سياه شدن محيط كشت مي‌گردد كه در چنين حالتي تعويض محيط و يا عمليات واكشت براي برخي ژنوتيپ‌ها با درصد گوسيپول بالاتر (نظير *G.barbadense*) ضرورت پيدا مي‌كند ولي براي ژنوتيپ‌هايي با مواد آلكالوئيدي و گوسيپول كمتر (مانند گونه *G.herbaceum*) ممكن است چندان ضرورت پيدا نكند. با توجه به نتايج اين تحقيق، محيط كشت جامد MS3 نيز بدليل بالا بودن راندمان نجات جنين بعنوان يك محيط كشت عمومي جهت كشت و نجات تخمك‌هاي حاوي جنين پنبه قابل توصيه است ضمن آنكه در چنين محيطي مشكل غرق شدن تخمك‌ها نيز منتفي مي‌گردد.

بررسي سيتولوژيكي هيبريدها نشان داد كه از تلاقي گونه‌هاي تتراپلوئيد و ديپلوئيد هيبريدهاي تريپلوئيد حاصل مي‌گردد كه داراي ٣٩ = 3n كروموزوم هستند و استفاده از اين هيبريدها در برنامه‌هاي اصلاحي يا زراعت، مستلزم برنامه‌هاي تحقيقاتي ديگري در جهت رفع عقيمي يا بازگشت باروري است كه اين امر از دو مسير ١- مسير هگزاپلوئيدي و سپس تلاقي برگشتي هگزاپلوئيدها با گونه‌هاي تتراپلوئيد زراعي طي ٤-٣ سال. ٢- تلاقي برگشتي مستقيم تريپلوئيدها با گونه‌هاي تتراپلوئيد زراعي به مدت ٤-٣ سال و طي يك برنامه تحقيقاتي ٥-٤ ساله قابل تحقق خواهد بود.

REFERENCES

1. Abdullaev, A. A., V.P.Klyat, S.M.Rizaeva, Z.A.Ernazarovaa, Z.B.Kuryazov & D.M.Arslanov. 2002. Genetic potentiality of genus *Gossypium* L. and its scientific and practical value. International Cotton Advisory Committee P. 94-102, Tashkent.
2. Azizkhodzhaev, A. & Z.M.Umarov. 1988. Effect of growth regulators and vitamins on growth of immature hybrid embryos of cotton *in vitro*. Uzbekiston – Biologija-Zurnali (2): 17-19.
3. Bhuyar, S.A.,S.B.Sakhare, D.B.Dhumale & P.D.Peshattiwar. 2000. Interspecific hybridization in the genus *Gossypium* through embryo culture.J..of Soils and Crops.10(1):90-93.
4. Borole, V.K., D.B.Dhumale & J.P.Rajput. 2000. Embryo culture studies in interspecific crosses between *G.arboreum* and *G.hirsutum* cottons. Indian J..of Genetic and Plant Breeding 60(1):105-110.
5. Brar, S.S. & B.S.Sandhu. 1984. *In vitro* ovule and embryo culture of *Gossypium*. Current Sci. 53(21) : 1164-1166.
6. Feng, R., R.M. & J.R.Brown. 2000. A novel cotton ovule culture; Induction,growth and characterization of submerged cotton fibers(*G.hirsutum* L.) in vitro culture & Dev. Bio.- Plant. 36(4): 293-299.
7. Gialvalis, S. & R. W. Seagull. 2001. Plant hormones alter fiber initiation in un fertilized cultured ovules of *Gossypium hirsutum*. J.of cotton Sci. (5): 252-258.
8. Gill, M.S. & Y.P.S. Bajaj. 1987. Hybridization between diploid (*G.arboreum*) and Tetraploid (*G.hirsutum*) cotton throuth ovule culture. Euphytica, 36(2):625- 630 .
9. Hockers, J. S. & N. S. M. Neabers 1984. Distant hybridization in cotton through embryo culture. Annuals of Biology Ludhiana. 15:2, 185-188.
10. Khadi, B.M., V.N.Kulkarni, M.Manjula, & I.S.Katageri. 2002. Utilization of exotic genetic resources in genetic improvment of diploid cultivated cotton and delineation of gene pool concept. Proceeding of 2th Meeting of the Asian Cotton Research and Development Network.88-102.
11. Mirza, M.A., A.L.Sheikh, & Z.I.Anjum. 1993. In-ovulo embryo culture of interspecific hybrids between some diploid Asian and Australian wild species of *Gossypium*. Pakphyton. (5): 109-117.
12. Murashige, T. & F.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassys with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. (80): 662-668.
13. Niu, Y.Z., J. Y. Yang C.Q.Guan Y. G. Zhang & X.R.Zhzng. 1985. Relationship between rate of embryo formation in the F0 of upland cotton × Asiatic cotton and the photosynthetic characteristics of the maternal parent , upland cotton. Scientia-Agric.-Sinica. (4): 62-66.
14. Stewart, J.M. & C.L.Hsu.1977. In-ovulo embryo culture and seedling development of cotton(*Gossypium* hirsutum L.). Planta 137(2): 113-117
15. Triplett, B.A. 2000. Cotton ovule culture ;a tool for basic biology, biotechnology and cotton improvement . *in vitro* cellular and Dev. Biol. Plant . 36(2): 93-101.
16. Vijayalakshmi, B. & T.S.Raveendran. 2000. In-ovulo embryo culture of wild diploids of *Gossypium*, Research on crops.1 (2):263-265.
17. Vijayalakshmi, B. & T.S.Raveendran. 2000. Postfertilization barrier in crosses between *Gossypium* triphyllum and *G.hirsutum*. Phytomorphlogy 50(3/4):287-289.

18. Vlachostergios, D.N., D.G.Roupakias & A.G.Mavromatis. 1998. Response to *in vitro* regeneration of immature zygotic embryos in cotton (G. Spp.).Proc. of WCRC.-2 Athens,Greece,Pp.326-329.
19. Von Tuyl, J.M. & M.J.De Jev. 1997. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge Univ. Press. Pp:273-292.
20. Wendel, J.F. & R.C.Cronn. 2002. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. Advances in Agronomy. (87):139-186.
21. Zhang, J. & J.MC.D. Stewart. 1997. Hybridization of new Australian Gossypium species (section Grandicalyx) with cultivated tetraploid cotton. Proc. of the Beltwide cotton Conf. Pp.487-490.