Archive of SID

"مجله علوم زراعی ایران"
جلد نهم، شماره ٤، زمستان ١٣٨٦

جنین زایی سوماتیکی در سه رقم پنبه (*Gossypium hirsutum* L.)

Somatic embryogenesis in three cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars

شاهرخ گروسی[1]، مسعود توحیدفر[2]، کمال کاظمی تبار[3]، حشمت الله رحیمیان[4] و قربانعلی نعمت زاده[5]

چکیده

گروسی، ش.، م. توحیدفر، ک. کاظمی تبار، ح. رحیمیان. ق. نعمت زاده. ١٣٨٦. جنین زایی سوماتیکی در سه رقم پنبه (*Gossypium hirsutum* L.). مجله علوم زراعی ایران. ٩ (٤): ٣١٤-٣٠٢.

در انتقال ژن به پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) وجود سیستم کشت بافت بهینه به منظور باززایی گیاه از یک سلول تراریخت ضروری می باشد. تولید موفق پنبه های تراریخت به باززایی تعداد زیادی گیاه بستگی دارد که بدین منظور جنین زایی سوماتیکی در تعدادی از ارقام پنبه بررسی شد. ریزنمونه های محور زیر لپه ارقام ساحل، ورامین و کوکر ٣١٢ برای کالوس دهی به محیط کشت های MSB (نمک های MS و ویتامین های B_5) همراه با 2,4-D ($0/1 mgl^{-1}$)، کینتین ($0/1 mgl^{-1}$) و کلرید منیزیوم ٠/٧٥ گرم در لیتر و MS به اضافه کینتین ($0/1 mgl^{-1}$) و IBA ($0/2 mgl^{-1}$) منتقل شدند. در محیط کشت دارای 2,4-D و کینتین ریزنمونه های ارقام کوکر٣١٢ و ساحل زودتر از ورامین شروع به کالوس دهی کرده و حجم کالوس بیشتری تولید کردند. درصد کالوس دهی ساحل بیشتر از ورامین بود. کالوس های تولید شده جهت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها به محیط MSB به اضافه کلرید منیزیوم ($0/75 gl^{-1}$) و نیترات پتاسیم ($1/9 gl^{-1}$) انتقال یافتند. درصد کالوس های جنینی رقم کوکر٣١٢ بیشتر از ساحل بود. جوانه زنی جنین های سوماتیکی در محیط جوانه زنی MSB همراه با زآتین ($0/1 mgl^{-1}$) و ذغال فعال ($2 gl^{-1}$) در ارقام کوکر٣١٢ و ورامین سریعتر از ساحل بود. تعداد جنین های سوماتیکی تولید شده رقم کوکر٣١٢ بیشتر از ساحل بود. تفاوت درصد ریشه دهی جنین های سوماتیکی در بین سه رقم و ٥ محیط کشت باززایی معنی دار نبود.

واژه های کلیدی: پنبه، باززایی، جنین زایی سوماتیکی و کشت بافت.

تاریخ دریافت: ١٣٨٥/٦/١٤

١- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی (مکاتبه کننده)
٢- عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
٣- استادیار دانشگاه مازندران
٤- استاد دانشگاه مازندران
٥- دانشیار دانشگاه مازندران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) از گیاهان صنعتی و لیفی بسیار مهم می باشد و از نظر تولید روغن دومین رتبه را در بین دانه -های روغنی به خود اختصاص داده است (Mishra *et al*., 2003). محصول پنبه صنعت چند میلیارد دلاری محسوب شده و امرار معاش بیشتر از ۱۸۰ میلیون نفر در دنیا وابسته به آن می باشد (Agrawal *et al*., 1997; Mishra *et al*., 2003).

با وجود تولید ارقام مطلوب پنبه توسط اصلاح نباتات کلاسیک، اصلاح ژنتیکی آن به دلیل فقدان تنوع در ژرم پلاسم از نظر ژن های مقاوم به آفات و بیماری ها، طولانی بودن زمان اصلاح و کمی بودن صفات مقاومت به آفات و بیماریها محدود شده است. بیوتکنولوژی در پنبه قادر به افزایش تولید، حفظ تنوع زیست ژنتیکی، استفاده بهینه از نهاده های کشاورزی، افزایش پایداری تولید با کاهش صدمات سالهای خشکسالی به علت تنشهای زنده و غیر زنده و پیشرفت های اقتصادی، اجتماعی و کاهش فقر مفرط در کشورهای در حال توسعه می باشد (James, 2003; Satyavathi *et al*., 2002) .

انتقال ژن به گیاهان توسط سیستم اگروباکتریوم، بمباران ذره ای و سایر روش ها نیازمند سیستم کشت بافت بهینه برای باززایی گیاه از یک سلول تراریخت می باشد. موفقیت در انتقال ژن به باززایی تعداد زیادی گیاه تراریخت بستگی دارد (Firoozabady and DeBoer, 1993; Rajasekaran, 1996, Rajasekaran *et al*., 2000).

اولین مزیت مهم باززایی گیاه از طریق جنین زایی سوماتیکی علاوه بر مزایای دیگر، داشتن پتانسیل تولید انبوه گیاهچه می باشد و هدف مذکور در انتقال ژن را به خوبی تامین می کند. دومین مزیت مهم جنین زایی سوماتیکی، احتمال تک سلولی بودن منشا گیاهچه تولید شده و کاهش وقوع پدیده نامطلوب شیمری می باشد (Sakhanokho *et al*., 2001). هم چنین پنبه های سوماکلونال تولید شده دارای کارایی مورد انتظار برای تعدادی از صفات مهم زراعی بوده و موتانت های دارای خصوصیات مطلوب می توانند در برنامه های اصلاحی تجاری مورد استفاده قرار گیرند (Zhang *et al*., 1996a, 2001a).

اولین مشاهده جنین سوماتیکی در پنبه *Gossypium koltzchianum* توسط پرایس و اسمیت (Price and Smith, 1979) صورت گرفت، ولی گیاه باززایی شده ای گزارش نگردید. دیویدونیس و همیلتون (Davidonis and Hamilton, 1983) اولین باززایی از طریق جنین زایی سوماتیکی را از کالوس های دو ساله رقم کوکر ۳۱۰ گزارش کردند. بعد از آن پیشرفت قابل ملاحظه ای در کشت بافت پنبه گزارش شد(Zhang and Feng, 1992; Zhang, 1994b) با استفاده از راهکارهای مختلف جنین های سوماتیکی در آزمایشگاه های متعدد تولید شدند (Shoemaker *et al*., 1986; Chen *et al*., 1987; Trolinder and Goodin, 1987; Zhang and Wang, 1989; Voo *et al*., 1991; Kolganova *et al*., 1992; Zhang 1994a; Zhang *et al*., 1996a, 1999). به علاوه گیاهان باززایی شده از ریشه، لپه ها، محور زیر لپه(Zhang, 1994a)، بساک (Zhang *et al*., 1996b) تخمک و پروتوپلاست (Zhang and Li, 1992; Feng and Zhang, 1994; Zhang, 1995) بدست آمد و روش های باززایی برای اصلاح ژنتیکی توسط انتقال ژن با سیستم اگروباکتریوم و تفنگ ژنی با جداکشت های محور زیر لپه ای و لپه ها مورد استفاده قرار گرفت.

پنبه گیاهی است که باززایی بیشتر ژنوتیپ های تجاری آن از طریق جنین زایی سوماتیکی یا سوسپانسون سلولی، نسبت به سایر گیاهان مشکل و قابلیت باززایی آن توسط جنین زایی سوماتیکی به مقدار زیادی وابسته به ژنوتیپ می باشد (Ouma *et al*., 2004; Finer, 1988). بنابراین شناسایی ارقام تجاری دارای پتانسیل بالای باززایی توسط جنین زایی سوماتیکی در تولید پنبه های تراریخت مهم و ضروری خواهد بود

www.SID.ir

Archive of SID

(Kumria *et al*., 2003). پژوهشگران با بهینه سازی محیط کشت به ویژه تغییر نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد توانسته اند میزان وابستگی باززایی ریزنمونه های پنبه به ژنوتیپ را کاهش دهند.

در مقاله حاضر پتانسیل باززایی ارقام مهم پنبه کشت شده در ایران در محیط کشت های مختلف توسط جنین زایی سوماتیکی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

در این بررسی از ارقام ساحل، ورامین و کوکر ۳۱۲ که بذور آنها از موسسه تحقیقات پنبه (ایستگاه ورامین) تهیه شده بود استفاده گردید.

ضد عفونی و کشت بذور

بذور، بعد از ضدعفونی (گروسی و همکاران، ۱۳۸٦) در محیط MS پایه(Murashige and Skoog, 1962) که حاوی ۳ درصد ساکارز و ۰/۷ درصد آگار بود کشت شدند و به مدت ۷ روز در اتاقک رشد در دمای ۳۰- ۲۸ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس قرار گرفتند (Zhang *et al*., 2000).

تحریک و شروع کالوس دهی

ریز نمونه های محور زیرلپه گیاهچه -های هفت روزه پنبه (به طول تقریبی ۵ میلی متر) در دو محیط کشت کالوس دهی شامل ۱- محیط MS پایه به اضافه میواینوزیتول ($۱۰۰mgl^{-1}$)، نیکوتینیک اسید ($۱mgl^{-1}$)، پیریدوکسین ($۱mg\ l^{-1}$)، تیامین ($۱۰mg\ l^{-1}$)، 2,4-D($۰/۱mgl^{-1}$)، کینتین ($۰/۱mgl^{-1}$)، ۰/۷۵ گرم در لیتر کلرید منیزیوم، ۳۰ گرم در لیتر گلوکز و فیتاژل ($۲/۵gl^{-1}$) با pH= 5.8 همراه با استوسیرینگون (۱۰۰ µM) (Tohidfar *et al*., 2005) و ۲- محیط کشت ZSW-2 (Shengwai and Jingsan, 2000) محیط MS پایه به اضافه کینتین ($۰/۱mgl^{-1}$)، IBA ($۰/۲mgl^{-1}$)، گلوکز ۳۰ گرم در لیتر، آگار آگار ($٦/۵gl^{-1}$) با pH = 6.2 و دمای ۲۸- ۳۰ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱٦ ساعت با شدت نور ۱۵۰۰ لوکس برای محیط کشت اول و ۱۰۰۰ لوکس برای محیط کشت ZSW-2 قرار گرفتند. واکشت ها در محیط کشت اول هر ۱۵ روز یکبار و در محیط کشت دوم هر ۳۰ روز یکبار انجام گردید.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. در این بررسی سه تیمار (سه رقم پنبه) هر کدام دارای ۱٦ تکرار (پتری دیش) بودند و هر تکرار دارای ۸ ریزنمونه بود. شمارش درصد کالوس دهی ۱۲ هفته بعد از انتقال به محیط های کشت کالوس دهی انجام گرفت. اندازه گیری حجم کالوس هر دو هفته یکبار با استفاده از روش هوکر و نابورس (Morshedi, 1987) انجام شد.

تحریک جنین زایی

کالوس های۱۲ هفته ای به محیط -کشت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها (محیط پایه MS به اضافه ویتامین های گروه B_5، کلرید منیزیوم ۰/۷۵گرم در لیتر، نیترات پتاسیم ۱/۹ گرم در لیتر، گلوکز ۳ درصد، فیتاژل ۰/۲۵ درصد و pH= 5.8) (Tohidfar *et al*., 2005) منتقل شدند. واکشت ها هر ۱۵ روز یکبار انجام شد. ریزنمونه های محیط کشت دوم (ZSW-2) که کالوس های ناچیزی تولید کرده بودند حذف شدند.

یادداشت برداری شامل شمارش تعداد کالوسهای جنینی در هر پتری دیش بود. برای تبدیل داده های مربوط به تعداد جنینهای سوماتیکی از رابطه $Y_1 = \sqrt{Y_2}$ استفاد استفاده شد (یزدی صمدی و همکاران، ۱۳۷٦).

جوانه زنی جنین های سوماتیکی

کالوس های جنینی ۷ هفته بعد از جنین زایی سوماتیکی به محیط کشت جوانه زنی جنین های سوماتیکی (محیط پایه MS به اضافه ویتامین های گروه B_5، زآتین ($۰/۱mgl^{-1}$)، ذغال فعال ($۲gl^{-1}$)، ساکارز ۳ درصد، فیتاژل ۰/۲۵ درصد و pH = 5.8) منتقل شدند. واکشت ها هر ۲۱ روز یکبار انجام شد (Zahng *et al*., 2001b). برای تبدیل داده های مربوط به

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد جنین های سوماتیکی از رابطه $Y_1 = \sqrt{Y_2}$ استفاده شد (یزدی صمدی و همکاران، ١٣٧٦).

باززایی

گیاهچه ها برای ریشه زایی به محیط کشت MS پایه به اضافه ویتامین های گروه B_5، زآتین ($0/1 mgl^{-1}$)، IAA ($0/1 mgl^{-1}$) و ساکارز ٣ درصد (Zahng *et al.*, 2001b) منتقل شدند ولی به علت باززایی کم، شیشه -ای شدن بعضی جنین ها و حضور طولانی مدت در محیط کشت، از محیط های باززایی و ریشه زایی زیر نیز استفاده گردید. ١- محیط کشت پایه MS حاوی قندها و ویتامین ها (میواینوزیتول ($100 mgl^{-1}$)، نیکوتینیک اسید ($0/5 mgl^{-1}$)، پیریدوکسین ($0/5 mgl^{-1}$)، تیامین ($0/5 mgl^{-1}$)، ساکارز ٣ درصد و فیتاژل ٢/٢ گرم در لیتر (Zapata *et al.*, 1998) ٢- ١/٢MS پایه به اضافه ویتامین های گروه B_5 و ساکارز ٣ درصد ٣- MS پایه به اضافه ویتامین های گروه B_5، ساکارز ٣ درصد و ذغال فعال ٠/٢ درصد (Gould and Magallanes - Cedenedo., 1998)

برای ارزیابی درصد ریشه دهی از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی شامل ٤ تکرار و با ٥ جنین سوماتیکی در هر تکرار استفاده شده و ریشه دهی ارقام در هر محیط کشت و نیز ریشه دهی هر رقم در ٤ محیط کشت بطور مستقل (٧ آزمایش) ارزیابی شد. گاهی همه ارقام در یک زمان دارای گیاهچه باززایی شده نبودند. برای تبدیل داده های درصد ریشه دهی از رابطه $Y_2 = \log Y_1$ استفاده شد. بعد از بررسی محیط کشت ها از محیط کشت MS پایه به اضافه ویتامین های گروه B_5، ساکارز ٣ درصد و فرو بردن ته گیاهچه ها در IBA ($2 mgl^{-1}$) ودرNAA ($0/5 mgl^{-1}$) و همچنین ریزپیوندی (Micrografting) استفاده شد. گیاهچه های ریشه دار شده برای سازگار شدن به خاک استریل (تورب: ورمیکولایت: پرلایت ١:١:١) در دمای ٢٨ درجه سانتی گراد و دوره نوری ١٦ ساعته زیر پوشش شفاف جهت حفظ رطوبت منتقل شدند. آبیاری گیاهچه ها به ترتیب به صورت اسپری با آب استریل و آبیاری با محلول MS ١/٤، MS ١/٢ و MS در طی ٤ هفته اول انجام شد.

نتایج و بحث

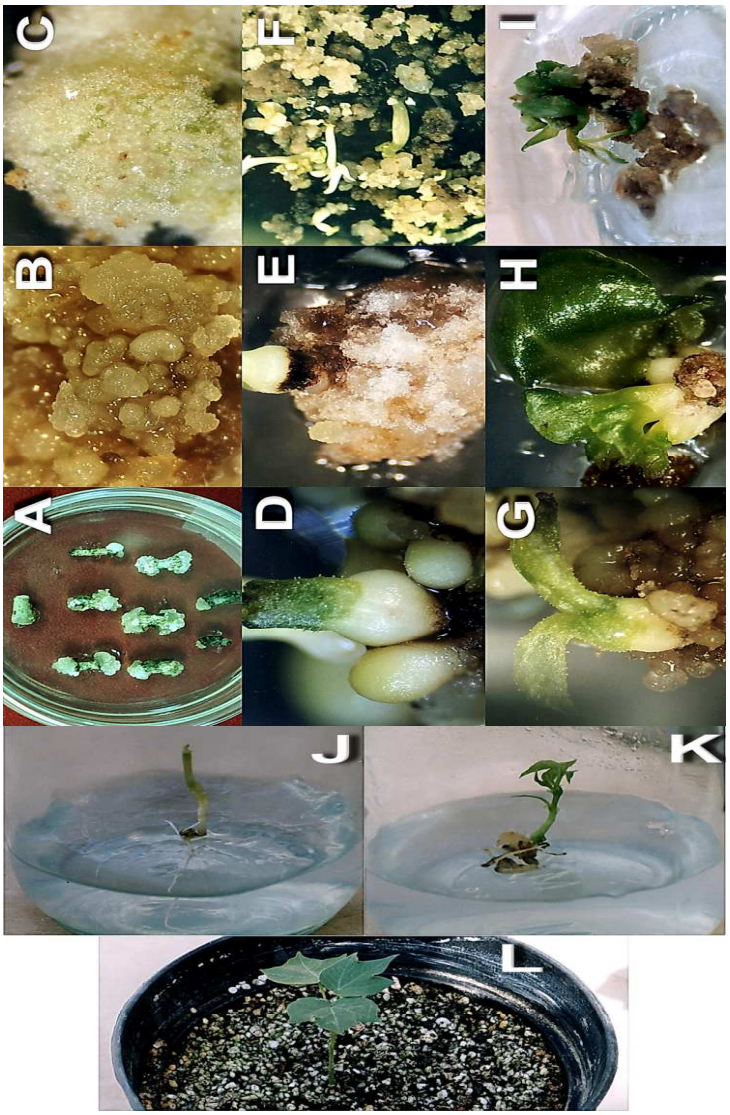
تولید کالوس های جنین زا

جداکشت های محور زیر لپه در محیط کشت کالوس دهی دوم (ZSW-2) بعد از گذشت چند ماه و چند بار واکشت، واکنش ضعیفی به کالوس دهی نشان دادند. برای حصول اطمینان آزمایش تکرار شد و با مشابه بودن نتیجه، جداکشت ها حذف شدند. ریزنمونه های محور زیر لپه محیط کشت اول بعد از گذشت ١٤-٧ روز شروع به کالوس دهی کردند. زمان شروع کالوس دهی در ارقام کوکر٣١٢ و ساحل زودتر از ورامین بود (جدول ١). در مجموع ٧٣/٧ درصد کل ریزنمونه های سه رقم کالوس دادند. درصدکالوس دهی نیز در بین ارقام مختلف، متفاوت بوده و رقم ساحل (شکل ١-A) نسبت به رقم ورامین برتری داشت. ارقام کوکر٣١٢ و ساحل حجم کالوس بیشتری نسبت به رقم ورامین تولید کردند.

کالوس ها بر اساس رنگ و کیفیت به دو گروه کالوس های جنینی و غیر جنینی تقسیم بندی شدند. کالوس های دانه دار وشل که دارای رنگ کرم خاکستری و ترد و شکننده و با رشد سریعتر بودند به کالوس های جنینی تبدیل شدند (شکل ١- B) برعکس کالوس هایی که متراکم و فشرده به رنگ سفید، سبز تیره یا قهوه ای و دارای رشد کمتری بودند کالوس جنینی تولید نکردند (شکل ١- C). در محیط کشت تحریک جنین زایی در ارقام کوکر٣١٢ و ورامین به ترتیب ٣/٧٠ و ١٣/٠٤درصد از کالوس های سفید پنبه ای متراکم (شکل ١- E) جنین زا شدند. همچنین تعدادی از کالوس های غیر جنینی (سفید و متراکم، سبز تند) شروع به ریشه دهی کردند. نتایج آزمون t (جدول ٢) نشان داد رقم کوکر ٣١٢ (با میانگین ٣٨/٩)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- مراحل باززایی ارقام پنبه از جداکشت محور زیر لپه: A- تشکیل کالوس در ریزنمونه های رقم ساحل، B- ظاهر کالوس جنین زا در رقم کوکر۳۱۲، C- ظاهر کالوس غیر جنینی در رقم ساحل، D- جنین های سوماتیکی رقم کوکر۳۱۲، E- تولید جنین از کالوس غیر جنین زا در رقم ورامین، F- تکامل جنین ها در رقم کوکر ۳۱۲، G- تشکیل برگ در جنین های سوماتیکی پنبه در رقم ورامین، H- جنین های سوماتیکی جوانه زده رقم کوکر ۳۱۲ در مرحله کوتیلدونی، I- تشکیل گیاهچه غیر نرمال رقم ساحل، J- ریشه دهی جنین سوماتیکی در رقم کوکر ۳۱۲، K- ریشه دهی و کالوس دهی توام در گیاهچه تولید شده در رقم کوکر ۳۱۲، L- گیاهچه باززا شده رقم ورامین

Figure 1. Regeneration stages of cotton cultivars hypocotyls by somatic embryogenesis: A. Callus formation among Sahel explants, B. Appearance of embryogenic callus in Coker312, C. Appearance of non embryogenic callus in Sahel, D. Somatic embryos of Coker312, E. Embryos production by non embryogenic callus in Varamin, F. Development of embryos in Coker312, G. Leaf formation from somatic embryos in Varamin, H. Germinated embryos of Coker312 at cotyledonary stage, I. Abnormal plantlet in Sahel, J. Rooting of somatic embryos in Coker312, K. Roots and callus production at the same time in Coker plantlet, L. Regenerated plantlet of Varamin.

www.SID.ir

Archive of SID

در تولید کالوس جنین زا برتر از ساحل (با میانگین ۱۵/۷) بود. رقم کوکر۳۱۲ با ورامین و ساحل با ورامین اختلاف معنی داری نداشتند.

تمایز و جنین های سوماتیکی

کالوس هایی که در محیط کشت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها قرار گرفته بودند وقتی به محیط جوانه زنی جنین های سوماتیکی انتقال یافتند شروع به جوانه زنی کردند (شکل ۱- D). شروع جوانه زنی جنین های سوماتیکی (تعداد روزهایی که کالوس های جنینی در محیط کشت جوانه زنی جنین های سوماتیکی قرار گرفتند و شروع به جوانه زنی کردند) در ارقام کوکر۳۱۲ و ورامین زودتر از ساحل بود. همچنین رقم کوکر۳۱۲ تعداد جنین های سوماتیکی بیشتری نسبت به ساحل تولید کرد (جدول۳).

در محیط جوانه زنی تعدادی از جنین های سوماتیکی بعد از چند واکشت قهوه ای شده و از بین رفتند. برای رفع این مشکل از ذغال فعال به میزان ۲ گرم در لیتر استفاده گردید و زمان واکشت ها کوتاهتر شد.

پدیده کم سابقه ای که در پتری دیش های دارای کالوس های غیرجنینی که در ابتدای آزمایش از کالوس های جنینی جدا شده بودند مشاهده شد، شاخه زایی از کالوس های سبز غیر جنینی بدون عبور از مرحله جنین زایی بود. دو کالوس از ارقام کوکر۳۱۲ و ساحل به ترتیب هر کدام ۳ و ۲ شاخساره تولید کردند که خیلی غیر عادی بودند و باززا نشدند (شکل 1- E).

باززایی گیاه

برای باززایی جنین های سوماتیکی از محیط کشت جوانه زنی جنین های سوماتیکی به اضافه IAA ($۰/۱mgl^{-1}$) استفاده گردید (Zhang *et al.*, 2001b). در این محیط کشت برخی از جنین های سوماتیکی که در مراحل نیزه ای و کوتیلدونی بودند شروع به

جدول ۱- مقایسه میانگین زمان کالوس دهی، درصد کالوس دهی و حجم کالوس در سه رقم پنبه

Table 1. Mean comparison of callus initiation, percentage of callus production and callus size in three cotton cultivars.

Cultivars	ارقام	کالوس دهی (روز) Callus initiation (day)	درصد کالوس دهی %Callus production	حجم کالوس Callus size
Coker 312	کوکر ۳۱۲	10.7a ± 2.80	75.8ab	12.6a ± 2.58
Sahel	ساحل	10.9a ± 2.83	88.3a	11.9a ± 2.44
Varamin	ورامین	12.8b ± 2.69	57.0b	7.7b ± 2.58

میانگین هایی، در هر ستون، که دارای حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by the same letters are not significantly different at the 1% Probability level-using Duncan's Multiple Range Test

جدول ۲- آزمون t برای مقایسه درصد تولید کالوس جنین زا در بین سه رقم پنبه

Table 2. Comparison of percentage of embryogenic callus production in three cotton cultivars using t-test

Comparisons	مقایسه ها	مقدار t یا t′ t or t′ values	سطح احتمال Probability Level
Coker versus Varmin	کوکر۳۱۲ با ورامین	-0.033	0.9763 ns
Coker versus Sahel	کوکر۳۱۲ با ساحل	2.491	0.0189*
Varamin versus Sahel	رامین یا ساحل	1.967	0.0585 ns

*=Significant at the 5%, probability level

ns=Non-significant

*: معنی دار در سطح احتمال ۵٪

ns: غیر معنی دار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- مقایسه میانگین زمان شروع جوانه زنی جنین های سوماتیکی و متوسط تعداد جنین های سوماتیکی سه رقم پنبه

Table 3. Comparison of initiation of germination in somatic embryos and average number of somatic embryos in three cotton cultivars

Cultivars	ارقام	شروع جوانه زنی جنین های سوماتیکی (روز) Initiation of germination in somatic embryos (day)	میانگین تعداد جنین های سوماتیکی Avarag of somatic embryo no.
Coker 312	کوکر۳۱۲	23.1a ± 4.58	198.7a ± 23.42
Varamin	ورامین	31.6a ± 3.29	81.7ab ± 10.17
Sahel	ساحل	191.4b ± 9.60	42.0b ± 6.20

میانگین هایی، در هر ستون، که دارای حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی دار ندارند.

Means, in each column, followed by the same letters are not significantly different at the1% probability level-using Duncan's Multiple Range Test

ریشه دهی کردند. در مواردی، گیاهچه هایی که ابتدا ریشه داده بودند، تشکیل ساقه چه با تاخیر زیاد و رشد بسیار کند همراه بود و یا اصلاً شاخساره ای حاصل نشد. در این حالت ریشه های اولیه قهوه ای شده و گیاهچه ها ظاهر غیر عادی داشته و باززا نشدند (شکل ۱- I). ریشه های تولید شده نیز دارای تمایز و توسعه کامل نبودند.

هنگامی که کالوس های جنینی به محیط باززایی انتقال یافتند. علیرغم این که تمایز و تبدیل جنین های سوماتیکی به خوبی صورت گرفت اما ریشه دهی جنین هایی که در مرحله نیزه ای و کوتیلدونی بودند قابل توجه نبود (جدول٤). در محیط کشت مذکور نه تنها ریشه دهی و باززایی به خوبی صورت نگرفت و جنین ها بیشتر در مرحله کوتیلدونی بدون تمایز باقی ماندند، بلکه تعدادی از جنین های سوماتیکی شروع به کالوس دهی کردند (شکل ۱-K). این جنین ها، جنین های ثانویه ای تولید کردند که از آنها گیاهچه های عادی حاصل شد.

برای حل مشکل ریشه دهی و باززایی ٤ محیط کشت ریشه دهی و باززایی (بخش باززایی مواد و روش ها) دیگر نیز مورد ارزیابی قرار گرفت ولی اختلاف درصد ریشه دهی در بین ارقام و محیط کشت های مختلف معنی دار نبود (جدول ٤).

با این تیمارها مشخص شد که ریشه دهی در پنبه به سختی صورت گرفته و ممکن است وابسته به ژنوتیپ باشد. در نهایت برای ریشه دار کردن از محیط کشت زاپاتا و همکاران (Zapata *et al*., 1998) استفاده شد ولی قبل از کشت، انتهای جنین ها در محلول غلیظ ایندول بوتیریک اسید (IBA) ($۲mgl^{-۱}$) و نفتالن استیک اسید (NAA) ($۰/۵mgl^{-۱}$) به مدت ۳۰ ثانیه تیمار شدند (شکل ۱-J).

جدول ٤- مقایسه میانگین درصد جنین های ریشه دار شده در سه رقم پنبه و چهار محیط کشت ریشه دهی و باززایی

Table 4. Mean comparison of percentage of rooted embryos in three cotton cultivars and four rooting and regenerating media

Culture media	محیط کشت	Cultivars ارقام کوکر۳۱۲ Coker312	ساحل Sahel	ورامین Varamin
M1 (Zapata *et al*., 1998)		12.9a	26.3a	8.3a
M2 (1/2 MS)		8.3a	20.0a	nd
M3 (Gould and Magallanes-Cedenedo, 1998)		11.6a	nd	12.5a
M4 (Zhang *et al*; 2001b)		4.3a	nd	0.0a

میانگین هایی در هر ستون، که دارای حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی دار ندارند

Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different at the 5% Probability level-using Duncan's Multiple Range Test

www.SID.ir

Archive of SID

شروع کالوس دهی در پنبه صفتی است که تا حدودی وابسته به ژنوتیپ می باشد. در بررسی های توحیدفر و همکاران (Tohidfar *et al*., 2005) کوکر ۳۱۲ زودتر از ساحل شروع به کالوس دهی کرده بود.

در این بررسی مشخص شد که درصد کالوس دهی ژنتیکی - محیطی می باشد چون همه شرایط بجز نوع رقم ثابت بود. تفاوت مشاهده شده بین ارقام علاوه بر این که ممکن است به خاطر واکنش بهتر رقم ساحل با محیط کشت کالوس دهی باشد و می تواند نشان دهنده برتری توان ژنتیکی آن نیز باشد. درصد کالوس دهی بالا می تواند صفت با ارزشی محسوب گردد، زیرا در صورتی که در محیط کشت معینی کالوسهای ایجاد شده به کالوسهای جنین زا تبدیل شوند با بالا رفتن فراوانی آنها احتمال دست یابی به جنین های سوماتیکی بیشتر شده و احتمال تولید گیاهان تراریخت نیز افزایش می یابد.

تنظیم کننده های رشد نقش مهمی در ایجاد کالوس دارند. برخی از قطعات گیاهی کشت شده برای تولید کالوس فقط به اکسین و برخی فقط به سیتوکینین و اکثر کشت ها به هر دو نیاز دارند. ژانگ و همکاران (Zhang *et al*., 2001b) وقتی از زآتین (mgl^{-1} ۱۰ - mgl^{-1} ۰/۰۱) و ریزنمونه های لپه، محور زیر لپه و ریشه استفاده کردند میزان تولید کالوس در همه ریز نمونه ها ۱۰۰ درصد نبود ولی وقتی از 2,4-D (mgl^{-1} ۰/۱) همراه با زآتین (mgl^{-1} ۰/۱) استفاده کردند، میزان تولید کالوس در همه ریزنمونه ها ۱۰۰ درصد بود که نشان دهنده تاثیر مطلوب 2,4-D در تولید کالوس می باشد. در این بررسی نیز از این اکسین استفاده شد.

ژانگ و همکاران (Zhang *et al*., 2001b) وقتی از 2,4-D برای تحریک و تکثیر کالوس پنبه رقم Simian-3 استفاده کردند کالوس های یکسانی گرفتند که سبز رنگ و متراکم بود. شنگوی و جینگسان (Shengwai and Jingsan, 2000) با استفاده از کینتین و IBA در پنبه رقم Xinluzao کالوسهایی تولید کردند که جنین زا و غیر جنین زا بودند ولی کومریا و همکاران (Kumria *et al*., 2003) با استفاده از 2,4-D، کینتین و جداکشت هیپوکوتیل توانستند کالوس های بسیار ترد بدست آورند. نتایج بدست آمده در بررسی حاضر در پنبه رقم کوکر ۳۱۲ مشابه نتایج لیلاواثی و همکاران (Leelavathi *et al*., 2004) بود که با استفاده از 2,4-D و کینتین کالوسهای بسیار ترد از ریز نمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون پنبه رقم کوکر ۳۱۰ بدست آورند.

با وجود اینکه رقم ساحل حجم کالوس بالاتری از ورامین داشته و همراه با رقم کوکر۳۱۲ در یک سطح قرار گرفته بود ولی کمترین درصد تولید کالوس جنینی را در بین سه رقم داشت. این ویژگی هنگامی با ارزش می باشد که با صفت تولید کالوس های جنینی همبستگی مثبت داشته باشد. مثلاً رقم کوکر۳۱۲ بالاترین حجم کالوس را تولید کرده و بیشترین درصد کالوسهای جنینی را نیز داشت. چون تکثیر کالوس بعد از انتقال به محیط کشت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها نیز صورت می گیرد پس صفت حجم کالوس اگر همراه با صفت ایجاد کالوسهای جنینی باشد مطلوب بوده و در غیر این صورت مفید نخواهد بود. نتایج بدست آمده در مورد حجم کالوس با نتایج توحیدفر و همکاران (Tohidfar *et al*., 2005) مطابقت دارد. کیفیت کالوس مانند رنگ بافت و تردی آن نقش عمده ای در باززایی پنبه توسط جنین زایی سوماتیکی دارند (Mishra *et al*., 2003).

با وجود اینکه 2,4-D به طور گسترده در کشت بافت پنبه استفاده می شود ولی باید از محیط باززایی و جنین زایی حذف شود. به نظر می رسد انتقال کالوس ها از محیط دارای 2,4-D به محیط کشت فاقد آن باعث تحریک جنین زایی شود و استفاده از نیترات پتاسیم درصد جنین زایی را افزایش می دهد. آنیون نیترات در ترکیب با نیترات پتاسیم با تحریک شروع جنین زایی و نیز نمو جنین ها باعث افزایش درصد جنین زایی می شود. در پنبه کینتین برای جوانه زنی و باززایی

www.SID.ir

Archive of SID

جنین های سوماتیکی مفید نمی باشد و فقط جنین هایی که در مرحله آخر نیزه ای و یا در مرحله کوتیلدونی هستند قادرند جوانه زده و به گیاه کامل تبدیل شوند (Zhang *et al.*, 2000). ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2000) هنگامی که برای جوانه زنی جنین های سوماتیکی پنبه از محیط کشت بدون کینیتن استفاده کردند میزان جوانه زنی جنین های سوماتیکی (٥٦٪) و باززایی حداکثر بود با افزایش مقدار کینتین درصد جوانه زنی جنین های سوماتیکی و درصد باززایی کاهش یافت بطوری که در حداکثر مقدار کینتین (١٠mg/L) درصد جوانه زنی جنین های سوماتیکی حداقل (٦.٧٪) و میزان باززایی صفر بود.

در این بررسی زآتین جهت تحریک جوانه زنی سوماتیکی موثر واقع شد ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2001b) نیز به نتیجه مشابهی دست یافته اند. غلظت کم زآتین ($0/1\ mgl^{-1}$) عامل کلیدی در تحریک کالوس جنینی بوده و محیط کشت بدون هورمون برای جوانه زنی جنین های سوماتیکی کفایت نمی کند (Zhang *et al.*, 2001b).

در بررسی حاضر فاصله زمانی زیادی در جوانه زنی جنین های سوماتیکی رقم ساحل نسبت به دو رقم دیگر مشاهده شد. این تاخیر ممکن است به دلیل جنین زایی دیر رقم ساحل باشد. به علاوه رقم ساحل کمترین درصد کالوس جنین زا را نیز تولید کرد. مواد فنلی که در محیط کشت جنین زایی تولید شد می توانست مانع جدی در باززایی باشد. مشکل مزبور با واکشت های زیاد با فاصله زمانی کم به ویژه با افزودن ذغال فعال حل شد. از فیتاژل و گلوکز نیز برای رفع این مشکل استفاده گردید. استفاده از ذغال فعال علاوه بر کنترل اثر مواد فنلی در جوانه زنی جنین های سوماتیکی نیز موثر واقع شد. ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2001b) نیز با استفاده از ذغال فعال به چنین نتایجی دست یافته اند.

پنبه گیاهی است که تحریک ریشه دهی در آن بسیار مشکل بوده و گیاهچه های باززایی شده دارای رشد کم بوده و درصد باززایی خیلی پائین می باشد (Shengwai and Jingsan, 2000). در این بررسی نیز با وجود ارزیابی محیط کشت های متعدد، ریشه دهی قابل توجه نبود و به همین دلیل از ریزپیوندی استفاده شد.

سپاسگزاری

از سرکار خانم ها مهندس لیلا رمضانپور و مهندس فاطمه یامی برای همکاری در اجرای بخشی از طرح سپاسگزاری می شود.

منابع مورد استفاده References

گروسی، ش.، م. توحیدفر، ح. رحیمیان، ک. کاظمی تبار و ق. نعمت زاده. ١٣٨٦. بررسی پتانسیل باززایی مستقیم از کشت نوک ساقه در سه رقم پنبه. مجله دانش کشاورزی. ١٧ (٢):١٠٩ – ١١٥.

یزدی صمدی، ب.، ع. رضائی، و م. ولی زاده. ١٣٧٦. طرحهای آماری در پژوهشهای کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران. ٧٦٤ صفحه.

Agrawal, D. C., A. K. Banerjee, R. R. Kolala, A. D. Dhage, A. V. Kulkarni, S. M. Nalawade, S Hazra and K. V. Krishnamurthy. 1997. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep. 16: 647–652.

Chen, Z. X., S. J. Li and N. L. Trolinder. 1987. Some characteristics of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton cell suspension culture. Sci. Agric. Sin. 20: 6-11.

www.SID.ir

Archive of SID

Davidonis, G. H. and R. H. Hamilton. 1983. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. Plant Sci. Lett. 32: 89-93.

Feng, R. and B. H. Zhang. 1994. Ovule culture and rescue of cotton hybrid embryos. Shaanxi J. Agric. Sci. 2: 46-48.

Finer, J. J. 1988. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep. 7:399–402.

Firoozabady, E. and D. L. DeBoer. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In Vitro Cell Develop. Biol. 29P:166–173.

Gould, J. and M. Magallanes-Cedenedo. 1998. Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobactium*-mediated transformation. Plant Mol. Biol. 16:1-10.

James, C. 2003. Global review status of commercialized transgenic crops. ISAAA. 30: 1-25.

Kolganova, T. V., D. K. Srivastava and V. L. Mett. 1992. Callusogenesis and regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv 108-F). Sov. Plant Physiol. 39: 232-236.

Kumria, R., V. G. Sunnichan, D. K. Das, S. K. Gupta, V. S. Reddy, R. K. Bhatnagar and S. Leelavathi. 2003. High frequency of somatic embryo production and maturation in normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through metabolic stress. Plant Cell Rep. 21: 635-3-639.

Leelavathi, S., V. Sunnichan, R. Kumria, G. P. Vijaykanth, R. K. Bhatangar and V. S. Reddy. 2004. A simple and rapid *Agrobacterium*–mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutsm* L.): Embryogenic cell a source to generate large numbers of transgenic plants. Plant Cell Rep. 22: 465-470.

Mishra, R., H. U. Wang, N. R. Yadav and T. A. Wu. 2003. Development of a highly regeneration elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Maxa)–a step towards genotype-independent regeneration. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73: 21-35.

Morshedi, A. 1987. Callus induction in wheat cultivars. M.Sc. Thesis. IndustrialUniversity of Isfshan.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A rapid revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 80: 662-668.

Ouma, J., P M. M. Young and N. M. Reichert. 2004. Optimization on *in vitro* regeneration of multiple shoots from hypocotyle sections of cotton (*Gossypium hirsutsm* L.). African J. Biotech. 3:169-173.

Price, H. J. and R. H. Smith. 1979. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschiaanum* Anderss. Planta. 145: 305-307.

Rajasekaran K. 1996. Regeneration of plants from cryopreserved embryogenic cell suspension and callus cultures of cotton *(Gossypium hirsutsm* L.*)* Plant Cell Rep. 10: 161–162.

Rajasekaran, K., R. L. Hudspeth, J. W. Carry, D. M. Anderson and T. E. Cleveland. 2000. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 19: 539-545.

www.SID.ir

Archive of SID

Sakhanokho, H. F., A. Zipf, K. Rajasekaran, S. Saha and G. C. Sharma. 2001. Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in Upland and Pima cottons. Crop Sci. 41: 1235-1240.

Satyavathi, V. V., V. Prasad, B. G. Lakshmi and G. S. Lakshmi. 2002. High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci. 162: 215-223.

Shengwai, Z. H. U. and S. U. N. Jingsan. 2000. Rapid plant regeneration from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Chinese Sci. Bult. 45: 1771-1774.

Shoemaker, R. C., I. J. Couche and D. W. Galbraith. 1986. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep. 3:178-181.

Tohidfar, M., M. Mohammadi and B. Ghareyazie. **2005.** *Agrobacterium*- mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 83: 83–96.

Trolinder, N. L. and J. R. Goodin. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep. **6:** 231-234.

Voo, K. S., C. L. Rugh and J. C. Kamalay. 1991. Indirect somatic embryogenesis and plant recovery from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. 27: 117-124.

Zapata, C., S. H. Park, K. M. El-Zik and R. H. Smith. 1998. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. Theor. Appl. Genet. 252-256.

Zhang, B. H. 1994a. A rapid induction method for cotton somatic embryos. Chinese Sci. Bull. 39: 1340-1342.

Zhang, B. H. 1994b. List of cotton tissue culture (continuous).Plant Physiol. Communications. 30: 386-391.

Zhang, B. H. 1995. Advance of cotton protoplast culture. J. Sichuan Agric. Univ. 1: 27-33.

Zhang, B. H. 2000. Regulation of plant growth regulators on cotton somatic embryogenesis and plant regeneration. Biochemistry. 39: 1567.

Zhang, B. H. and R. Feng. 1992. List of cotton tissue culture. Plant Physiol. Communications. 28**:** 308-314.

Zhang, B. H. and X. L. Li. 1992. Somatic embryogenesis of cotton and its artificial seed production. Acta Gossypii Sin. 4(2)**:** 1-8.

Zhang, B. H., F. Liu and Q. L. Wang. 2000. Germination of somatic embryos and plant recovery in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Int. J. Expt. Bot. 68**:** 39-46.

Zhang, B. H., Q. L. Wang and F. Liu. 2001a. Phenotypic variation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) regenerated plants. Curr. Sci. 81: 1112-1115.

Zhang, B. H., R. Feng, F. Liu and Q. Wang. 2001b. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety**.** Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 9-16.

Zhang, B. H., R. Feng, F. Liu and C. B Yao. 1999. Direct induction of cotton somatic embryogenesis. Chinese Sci. Bull. 44: 766-767.

Zhang, B. H., R. Feng, X. L. Li and F. L. Li. 1996b. Anther culture and plant regeneration of cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss). Chinese Sci. Bull. 41: 145-148.

www.SID.ir

Archive of SID

Zhang, B. H., X. L. Li, F. L. Li and F. G. Li. 1996a. Development of abnormal plantlets and their normalization during cotton tissue culture. Acta Bot. Sin. 38: 845–852.

Zhang, D. L. and Z. Z. Wang. 1989. Tissue culture and embryogenesis of *Gossypium hirsutum* L. Acta Bot. Sin. 31: 161-163.

www.SID.ir

Archive of SID

Somatic embryogenesis in three cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars

Garousi, Sh[1]., M. Touhidfar[2] K. Kazemi Tabar[3], H. Rahimian[4] and Gh. Nematzadeh[5]

ABSTRACT

Garousi, Sh., M. Touhidfar, K. Kazemi Tabar, H. Rahimian and Gh. Nematzadeh. 2008. Somatic embryogenesis in three cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. **Iranian Journal of Crop Sciences. 9(4): 302-314.**

In cotton (*Gossypium hirsutum* L.) transformation, for regenerating plants from a single cell, an optimized tissue culture system is necessary. Successful production of transgenic cotton depends on regenerating of many plants; therefore, somatic embryogenesis was investigated for three cotton cultivars. Hypocotyls of cvs. Sahel, Varamin and Coker 312 were isolated and placed on two cotton callus induction media containing MSB medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l kinetin, 0.75 g/l $MgCl_2$; and MS medium supplemented with 0.1 mg/l Kinetin and 0.2 mg/l IBA. In medium containing 2,4-D and Kinetin, Sahel and Coker312 explants produced callus earlier than Varamin and the volume of calli were larger, too. The percentage of callus production for Sahel cultivar was higher than Varamin. For embryogenesis induction and maturation of embryos, produced calli were transferred onto MSB medium supplemented with 0.75 g/l $MgCl_2$ and 1.9 g/l KNo_3. Numbers of embryogenic calli for Coker312 were higher than Sahel. Germination of somatic embryos for Coker312 and Sahel on embryo germination medium containing MSB supplemented with 0.1 mg/l Zeatin and 2 g/l activated charcoal were earlier than Varamin. Percentage of somatic embryos produced from Coker 312 was higher than Sahel. For rooting, there were no significant differences among cotton cultivars and five rooting media.

Key words: Cotton, Regeneration, Somatic embryogenesis, Tissue Culture.

Received: August 2007.

1- M.Sc. in biotechnology, Ardabil, Iran. (Corresponding author)
2- Faculty member, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran.
3- Assistant Prof., The University of Mazandaran, Sari, Iran.
5- Associate Prof., The University of Mazandaran, Sari, Iran.

www.SID.ir