

بررسی کالوس زایی و جنین زایی سوماتیکی در پنبه

ل. فهمیده^۱، غ. ع. رنجبر^۲، ع. عالیشاه^۳ و ن. ع. باباییان جلودار^۴

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکترای، دانشیار و استاد دانشگاه علم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار مؤسسه تحقیقات پنبه کشور گرگان

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۷

چکیده

بهینه سازی روش های باززایی در پنبه با استفاده از تکنیک کشت بافت در اصلاح و تولید موفق ارقام پنبه های تراریخت ضروری به نظر می رسد. جهت بررسی کال زایی در پنبه، ۳ ژنوتیپ (۳۴۹، 4-S-4 و C1211) به همراه ژنوتیپ شاهد (کوکر ۳۱۲) انتخاب گردید و آزمایشی با استفاده از آزمایش فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در مؤسسه تحقیقات پنبه گرگان در سال ۱۳۸۹ انجام شد. ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی این ژنوتیپ ها به دو نوع محیط کشت MSB (شامل نمک های MS و ویتامین های B5)، MSB₁ همراه با 2,4-D (1 mg l^{-1})، کینتین (1 mg l^{-1}) و کلرید منیزیم (75 g l^{-1}) و MSB₂ به اضافه NAA (1 mg l^{-1}) منتقل شدند. کشت ها به اتافک رشد با شرایط دمایی 28 ± 2 درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس به منظور القای کال زایی منتقل شدند. در محیط کشت دارای 2,4-D و کینتین ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی ژنوتیپ 4-S-4 زودتر از سایر ژنوتیپ ها شروع به کال زایی کردند. درصد کال زایی ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ 4-S-4 در هر دو محیط بیشتر از سایر ژنوتیپ ها بود. کال های تولید شده کلیه ژنوتیپ ها، از ریزنمونه هیپوکوتیل در هر دو محیط و برگ کوتیلدونی در محیط MSB₁ عمدتاً جنین زا بودند. ریزنمونه های برگ کوتیلدونی تمامی ژنوتیپ ها در محیط MSB₂ شروع به ریشه زایی کرده ولی کالوسی تولید نکردند. کال های تولید شده جهت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها به محیط MSB به اضافه کلرید منیزیم (75 g l^{-1}) و نیترات پتاسیم ($1/9 \text{ g l}^{-1}$) انتقال یافتند. سپس جنین های سوماتیکی بدست آمده به محیط باززایی منتقل و از ژنوتیپ های 4-S-4، ۳۴۹ و کوکر ۳۱۲، گیاهچه باززا شده دارای ریشه تولید گردید.

واژه های کلیدی: پنبه، کشت بافت، ریزنمونه، کالوس، جنین سوماتیکی

مقدمه

سایر گیاهان مشکل است و قابلیت باززایی آن توسط جنین زایی سوماتیکی به مقدار زیادی وابسته به ژنوتیپ می باشد (۴ و ۱۵). در پنبه، باززایی در تعداد معدودی از ژنوتیپ ها مانند

پنبه گیاهی است که باززایی بیشتر ژنوتیپ های تجاری آن از طریق جنین زایی سوماتیکی یا سوسپانسیون سلولی، نسبت به

گیاهچه‌های مختلف نیز در باززایی گیاهان مؤثر می‌باشد. کومار و پانتال (۹) نیز با استفاده از هیپوکوتیل به عنوان ریزنمونه نتایج خوبی گرفته و اعلام داشتند در بین ارقام زراعی اختلافات زیادی از نقطه نظر قابلیت کال زایی و باززایی دیده می‌شود و در گیاهانی که هر دو قابلیت دیده می‌شود، امکان تولید گیاهچه در طی مدت ۶-۷ ماه وجود خواهد داشت.

رستگاری و حسینی‌نژاد (۱۶) با بررسی ریزنمونه‌های مختلف در ۴ رقم از پنبه‌های زراعی ایران گزارش کردند که ریزنمونه ریشه هیچگونه کالوسی تولید نکرده و مقدار کال تولید شده از کناره‌های برگ نیز بسیار کم بود و تنها کشت هیپوکوتیل مقدار قابل توجهی کال تولید کرد. این محققین تنوع مورفوتیپی در بافت‌های سوماکلون و اختلاف احتمالی از نظر باززایی در ژنوتیپ‌های پنبه ایران را نیز گزارش نمودند. گروسی و همکاران (۶) کال زایی و جنین زایی سوماتیکی را در تعدادی از ارقام پنبه بررسی کردند. آنها ریزنمونه هیپوکوتیل ارقام ساحل، ورامین و کوکر ۳۱۲ را در دو نوع محیط کشت MS (۱۳) کشت کردند و صفاتی چون شروع کال زایی، حجم کال و درصد کال زایی، تعداد جنین‌های سوماتیکی تولید شده و جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی ارقام را با یکدیگر مقایسه نمودند.

شیدایی و همکاران (۱۷) سه رقم پنبه تتراپلوئید را در شرایط درون شیشه کشت و پس از باززایی گیاهان و انجام بررسی‌ها، تفاوت‌های معنی‌داری در خصوصیات مورفولوژیکی چون طول جوانه و تعداد برگ‌ها مشاهده نمودند.

کوکر ۳۱۲ گزارش گردیده و در ژنوتیپ‌های مختلف نیز تنوع زیادی از لحاظ باززایی دیده شده است (۲۲). اولین مشاهده جنین سوماتیکی پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) توسط پرایس و اسمیت (۱۵) در کشت سوسپانسیون سلولی یک گونه وحشی پنبه گزارش گردیده است. جنین‌ها پس از یک پیش کشت کالوس در محیط محتوی ۲-*ip* تشکیل شدند. جنین‌های کوچک تولید ریشه و برگ‌های کوچک کردند، ولی گیاه باززایی شده‌ای گزارش نگردید. دیویدونیس و همیلتون (۳) اولین باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی را از کال‌های دوساله رقم کوکر ۳۱۰ در محیط کشت بدون هورمون گزارش کردند.

ژانگ و همکاران (۲۲) در آنالیز ژنتیکی هیبریدهای پنبه دریافتند که ژنوتیپ اثر معنی‌داری روی کال‌زایی ندارد، ولی تأثیر بسیار معنی‌داری روی قابلیت جنین‌زایی و باززایی ایفاء می‌کند. فیروزآبادی و دبوئر (۵) در بررسی قابلیت باززایی ژنوتیپ‌های مختلف پنبه به این نتیجه رسیدند که رقم کوکر ۳۱۲ که قابلیت کال‌زایی و باززایی مناسبی دارد، امکان تولید گیاهچه در طی ۷-۸ ماه وجود دارد در حالیکه در برخی دیگر از ژنوتیپ‌های پنبه امکان تولید گیاهچه از طریق واکشت‌های مختلف و در طی ۱۱-۱۰ ماه امکان‌پذیر خواهد بود. ماندش‌وار (۱۲) در بررسی قابلیت باززایی ژنوتیپ‌های مختلف کوکر به این نتیجه رسید که قابلیت باززایی بین ریزنمونه‌های مختلف و همچنین ارقام مختلف متفاوت است. به علاوه اینکه حتی زمان انتخاب ریزنمونه از

از آنجا که اغلب مطالعات باززایی موفق در پنبه روی رقم کوکر ۳۱۲ و لاین های وابسته به آن انجام گرفته است، لذا جهت گسترش پنبه های ترانسژنتیک و استفاده از دست ورزی های ژنتیکی در این گیاه، ضرورت بهینه سازی شرایط کشت بافت و افزایش قابلیت باززایی مستقل از ژنوتیپ، در ارقام پنبه ایران احساس می شود. در این مطالعه قابلیت کال زایی و رفتار کال های تولید شده در شرایط درون شیشه و در سطح محیط کشت های مختلف چندین ژنوتیپ برتر پنبه کشور، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی، ضد عفونی و کشت بذر

در این مطالعه از رقم کوکر ۳۱۲ و ژنوتیپ های ۳۴۹، C1211 و 4-S-4 که بذر آنها از مؤسسه تحقیقات پنبه گرگان تهیه شده بود، استفاده شد.

بذر ها پس از الیاف زدایی، ابتدا با اتانل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و سپس در محلول هیپوکلرید سدیم ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضد عفونی شدند. بعد از ضد عفونی سطحی، بذر ها ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو و درون ظروف شیشه ای استریل دارای درب محکم و حاوی آب مقطر استریل به مدت دو روز نگهداری و سپس در محیط 1/2MS با pH: ۵/۶-۵/۸ کشت شدند. کشت ها درون اتاقک رشد در دمای 28 ± 2 درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

کشت ریزنمونه ها و روش مورد استفاده

هفت تا چهارده روز بعد از کشت بذر روی محیط 1/2MS، ریزنمونه های هیپوکوتیل (۴-۵ میلی متر) و برگ کوتیلدون (۳-۵ میلی متر) تهیه و جهت کال زایی روی دو نوع محیط کشت مختلف MSB (محیط کشت MSB، محیط کشت حاوی نمک های محیط MS به همراه ویتامین های گروه B5: تیامین (10 mg l^{-1})، نیکوتینیک اسید (1 mg l^{-1})، پیریدوکسین (1 mg l^{-1}) و میواینوزیتول (100 mg l^{-1}) می باشد) کشت شدند. محیط کشت MSB₁ (محیط کشت حاوی نمک های محیط MS به همراه ویتامین های گروه B5) حاوی هورمون های توفوردی ($0/1 \text{ mg l}^{-1}$) و کینتین ($0/1 \text{ mg l}^{-1}$) و کلرید منیزیم ($0/75 \text{ gl}^{-1}$)، ساکارز (30 gl^{-1}) و آگار (7 gl^{-1}) با pH=۵/۸ بود (۱۹) و محیط کشت MSB₂ (محیط کشت حاوی نمک های محیط MS به همراه ویتامین های گروه B5) حاوی هورمون نفتالین استیک اسید (1 mg l^{-1})، ساکارز (30 gl^{-1}) و آگار (7 gl^{-1}) با pH=۵/۸ بود.

بدین ترتیب، اثر سه عامل: ژنوتیپ (۴ ژنوتیپ: کوکر ۳۱۲، ۳۴۹، C1211 و 4-S-4)، نوع ریزنمونه (دو نوع ریزنمونه: هیپوکوتیل و برگ کوتیلدون) و ترکیب محیط کشت (دو ترکیب محیط: MSB₁ و MSB₂) بر تولید و رشد کالوس به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در مؤسسه تحقیقات پنبه گرگان در سال ۱۳۸۹ مورد بررسی قرار گرفت. هر واحد آزمایشی عبارت از یک پتری دیش حاوی ۵-۸ ریزنمونه بود و کشت ها درون اتاقک رشد با دمای

یادداشت برداری شد. با توجه به اینکه اکثر داده‌ها براساس درصد بود، برای اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده جذری $X_1 = \sqrt{X^2}$ استفاده شد. در مواردی که صفر وجود داشت از تبدیل $\sqrt{X^2 + 0.5}$ استفاده گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزارهای کامپیوتری EXCEL و SAS انجام شد و تجزیه واریانس بر مبنای طرح فاکتوریل با دو فاکتور (ژنوتیپ و محیط کشت) برای هر ریزنمونه و همچنین طرح فاکتوریل با سه فاکتور (ژنوتیپ، محیط کشت و ریزنمونه) انجام شد و مقایسه میانگین به روش دانکن انجام گردید.

نتایج و بحث

کال زایی و تولید کال های جنین زای

ریزنمونه هیپوکوتیل

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در محیط کشت MSB_1 بعد از گذشت ۲۰-۷ روز و در محیط کشت MSB_2 بعد از گذشت ۲۷-۱۷ روز شروع به کال زایی کردند (جدول ۱). براساس نتایج جدول تجزیه واریانس صفت زمان شروع کال دهی ریزنمونه هیپوکوتیل، عکس العمل ژنوتیپ‌های مورد بررسی معنی دار ولی اثر محیط کشت و همچنین اثر متقابل محیط کشت در ژنوتیپ اختلاف معنی داری نشان نداده است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین برای صفت زمان شروع کال دهی در محیط MSB_1 ، نشان داد که ژنوتیپ 4-S-4 (۷/۶ روز) به همراه کوکر ۳۱۲ (۱۰ روز) و ۳۴۹ (۱۱ روز) از لحاظ آماری اختلاف معنی داری

عبارت از یک پتری دیش حاوی ۵-۸ ریزنمونه بود و کشت‌ها درون اتاقک رشد با دمای 28 ± 2 درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. واکشت‌ها تقریباً ۲۱-۳۰ روز یکبار انجام گردید.

کال‌ها بعد از ۱۲ هفته قرار گرفتن در محیط کشت MSB_1 و MSB ، جهت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین‌ها، به محیط کشت MS_{1a} (شامل نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین‌های گروه B5) حاوی نیترات پتاسیم ($1/9 \text{ g l}^{-1}$)، کلرید منیزیم ($0/75 \text{ g l}^{-1}$)، ساکارز (30 g l^{-1}) و آگار (7 g l^{-1}) با $\text{pH}=5/8$ (۱۹) به مدت ۷ هفته منتقل و هر ۲۱-۳۰ روز یکبار واکشت شدند. کال‌های جنینی بعد از قرار گرفتن در محیط کشت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین‌ها به محیط کشت جوانه زنی جنین‌های سوماتیکی، محیط MS_{2a} (شامل نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین‌های گروه B5) حاوی هورمون زآتین ($0/1 \text{ mg l}^{-1}$)، ساکارز (30 g l^{-1}) و آگار (7 g l^{-1}) با $\text{pH}=5/8$ تغییر یافته محیط منتقل شدند و بعد از جوانه‌زنی جنین‌ها و تولید گیاهچه، گیاهچه‌های باز زاشده به خاک سبک و استریل منتقل گردیدند (۲۱).

صفات مورد بررسی در این مطالعه، شامل: شروع کال‌زایی (تعداد روز سپری شده تا مشاهده اولین علائم تولید کالوس)، درصد کال‌زایی (تعداد ریزنمونه به کالوس تبدیل شده در هر تکرار) و درصد کال جنین‌زا (تعداد کالوس‌های جنین‌زا در هر تکرار) شمارش و

نداشتند و به طور معنی داری زودتر از C1211 (۲۰ روز) تولید کال نمودند. در محیط MSB₂ نیز، ژنوتیپ 4-S-4 (۱۷/۶ روز) زودتر از کوکر ۳۱۲ (۱۹ روز) و ۳۴۹ (۲۲/۶ روز) و C1211 (۲۶ روز) شروع به کال دهی نمودند.

جدول ۱- میانگین داده های حاصل از کشت ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی ژنوتیپ های مختلف در ۲ محیط کشت

محیط کشت	ژنوتیپ	شروع کال زایی (روز)	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	کال زایی (%)	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	جنین زایی (%)	ریشه زایی (%)
کوکر ۳۱۲	۲۸/۳۳	۱۱	۷۳/۳۳	۳۳/۳۳	۸۸/۳۳	۷۱	-
محیط MSB ₁	۲۲/۳۳	۱۰	۸۶/۶۶	۴۶/۶۶	۸۶/۶۶	۶۸/۳۳	-
C1211	۲۳/۳۳	۲۰	۲۰/۸۳	۳۳/۳۳	۳۳/۳۳	۵۵	-
4-S-4	۱۶/۳۳	۷/۶۶	۹۳/۳۳	۷۳/۳۳	۹۷/۶۶	۷۷	-
کوکر ۳۱۲	-	۱۹	۶۶/۶۶	-	۵۲/۶۶	-	۵۸/۳۳
محیط MSB ₂	۲۲/۶۶	۲۰	۸۶/۶۶	۱۶/۳۳	۶۸/۳۳	-	۳۳
C1211	۲۶	-	۴۰	-	۷۵	-	۵۸/۳۳
4-S-4	۱۷/۶۶	۲۲	۸۰	۱۶/۳۳	۷۵	-	۶۶/۶۶

ژنوتیپ ۳۴۹ (۸۶/۶۶ درصد) و 4-S-4 (۸۰ درصد) برتر از کوکر ۳۱۲ (۶۶/۶۶ درصد) و همچنین برتر از C1211 (۴۰ درصد) بودند (جدول ۳). با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی بین ۴ ژنوتیپ در ۲ محیط کشت مورد مطالعه، ژنوتیپ C1211 هم از شروع کال زایی دیرتر و هم از درصد کال زایی کمتری نسبت به سایر ژنوتیپها برخوردار است.

درصد کال زایی در بین ژنوتیپها معنی دار نبوده ولی در ۲ محیط کشت مورد بررسی اختلاف معنی دار نشان داده است (جدول ۲). با انجام مقایسه میانگین به روش دانکن مشخص شد که در محیط MSB₁، ژنوتیپ 4-S-4 (۹۳/۳۳ درصد) به همراه ۳۴۹ (۸۶/۶۶ درصد) و کوکر ۳۱۲ (۷۳/۳۳ درصد) از برتری معنی دار نسبت به C1211 (۲۰/۸۳ درصد) برخوردار بوده است و در محیط MSB₂ نیز

جدول ۲- تجزیه واریانس فاکتوریل با ۲ فاکتور ژنوتیپ (۴ سطح) و محیط کشت (۲ نوع) در ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی پنبه

منابع تغییرات	درجه آزادی	شروع کال زایی (روز)	کال زایی (%)	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	کال زایی (%)	جنین زایی (%)	ریشه زایی (%)
ژنوتیپ	۳	۲۰/۷۴**	۱۱۵/۳۷ ^{ns}	۱۱۷/۹۴ ^{ns}	۱۲/۱۵**	۷/۵۳ ^{ns}	۰/۵۱ ^{ns}
محیط کشت	۱	۰/۱۴ ^{ns}	۸۷۶/۰۴**	۵۰۴/۱۶*	۱۲۵/۴**	۰/۱۸ ^{ns}	۲/۴۷ ^{ns}
ژنوتیپ × محیط کشت	۳	۱/۶۹ ^{ns}	۴۰۰/۳۷**	۱۲/۱۶ ^{ns}	۱/۱۱ ^{ns}	۱۱/۲۷*	۲/۲۳ ^{ns}
خطا	۱۶	۱/۱۶	۴۱/۹۱	۶۶/۷۵	۲/۲۴	۳/۲۵	۱/۲۱

ns و **: به ترتیب عدم معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

حاکمی از برتری معنی دار ژنوتیپ‌های 4-S-4، کوکر ۳۱۲ و ۳۴۹ (به ترتیب با ۹۷/۶۶، ۸۸/۳۳ و ۸۶/۶۶ درصد) نسبت به ژنوتیپ C1211 (۳۳/۳۳ درصد) می‌باشد. در محیط MSB₂، نتایج از وجود عدم اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ‌ها و محیط کشت‌ها دلالت دارد و درصد تولید کال‌های جنین‌زا در ژنوتیپ‌های 4-S-4 و C1211 (۷۵ درصد) و در ۳۴۹ و کوکر ۳۱۲ به ترتیب با ۶۸/۳۳ و ۵۲/۶۶ درصد بوده است که براساس مقایسه میانگین در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۳).

کال‌ها براساس رنگ و کیفیت به گروه جنینی (کال‌های دانه‌دار و شل که دارای رنگ کرم خاکستری و ترد و شکننده و با رشد سریع‌تر بودند) و غیرجنینی (کال‌های که متراکم و فشرده به رنگ سفید، سبز تیره یا قهوه‌ای و دارای رشد کمتری بودند) تقسیم‌بندی شدند. کال‌ها تا مدت ۱۲ هفته در محیط اولیه برای تکمیل و تکثیر کال‌دهی واکشت گردیدند. نتایج مقایسه میانگین برای صفت درصد تولید کال‌های جنین‌زا در محیط MSB₁.

جدول ۳- مقایسه میانگین (روش دانکن) درصد کال دهی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی ۴ ژنوتیپ پنبه

محیط کشت ژنوتیپ	MSB ₁		MSB ₂	
	هیپوکوتیل	برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل	برگ کوتیلدونی
کوکر ۳۱۲	۷۳/۳۳ ^a	۳۳/۳۳ ^b	۶۶/۶۶ ^{ab}	. ^a
۳۴۹	۸۶/۶۶ ^a	۴۶/۶۶ ^{ab}	۸۶/۶۶ ^a	۱۶/۳۳ ^a
C1211	۲۰/۸۳ ^b	۳۳/۳۳ ^b	۴۰. ^b	. ^a
4-S-4	۹۳/۳۳ ^a	۷۳/۳۳ ^a	۸۰. ^a	۱۶/۳۳ ^a

میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

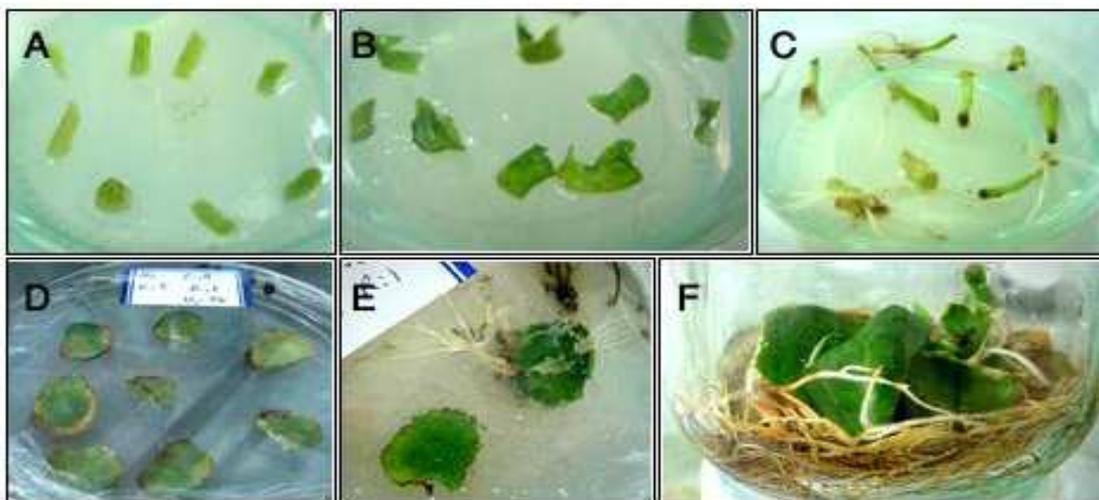
عکس‌العمل تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به استثناء ژنوتیپ C1211 مناسب بود.

کال زایی و تولید کال‌های جنین‌زای ریزنمونه برگ کوتیلدونی

در محیط کشت MSB₁، ریزنمونه برگ کوتیلدونی بعد از گذشت ۲۸-۱۶ روز و در محیط MSB₂، فقط برخی از ژنوتیپ‌ها بعد از گذشت ۲۲-۲۰ روز شروع به تولید سلول‌های کالوسی نمودند. که نتایج جدول تجزیه واریانس حاکمی از اختلاف معنی دار بین محیط کشت‌ها و همچنین اثر متقابل ژنوتیپ × محیط کشت می‌باشد (جدول ۲). نکته قابل توجه در این مطالعه، مشاهده افزایش سطح نمونه برگ

نتایج بدست آمده برای ریزنمونه هیپوکوتیل در ۲ محیط مورد مطالعه، بیانگر آن است که اختلاف بین ژنوتیپ‌ها برای درصد کال‌زایی و تولید کال‌های جنین‌زا معنی دار نبوده و عکس‌العمل تمامی ژنوتیپ‌ها تقریباً یکسان می‌باشد. ولی بین محیط‌ها تفاوت معنی‌داری در تولید کال مشاهده شد. برای درصد کال‌های جنینی نیز بین ژنوتیپ‌ها و محیط‌ها اختلاف معنی دار وجود نداشته است. لذا می‌توان نتیجه گرفت که محیط MSB₁ بهترین محیط برای تمامی ژنوتیپ‌ها با ریزنمونه هیپوکوتیل‌شان از نظر تولید کال و تولید کال‌های جنین‌زا می‌باشد. همچنین

در این محیط در روزهای اولیه کشت و سپس شروع تولید ریشه از ریزنمونه برگ کوتیلدونی به جای تولید کالوس در محیط MSB_2 می‌باشد. زمان تولید ریشه از هفته اول آغاز و با گذشت زمان، فقط به تعداد و طول ریشه‌های تولیدی افزوده شد (شکل ۱).



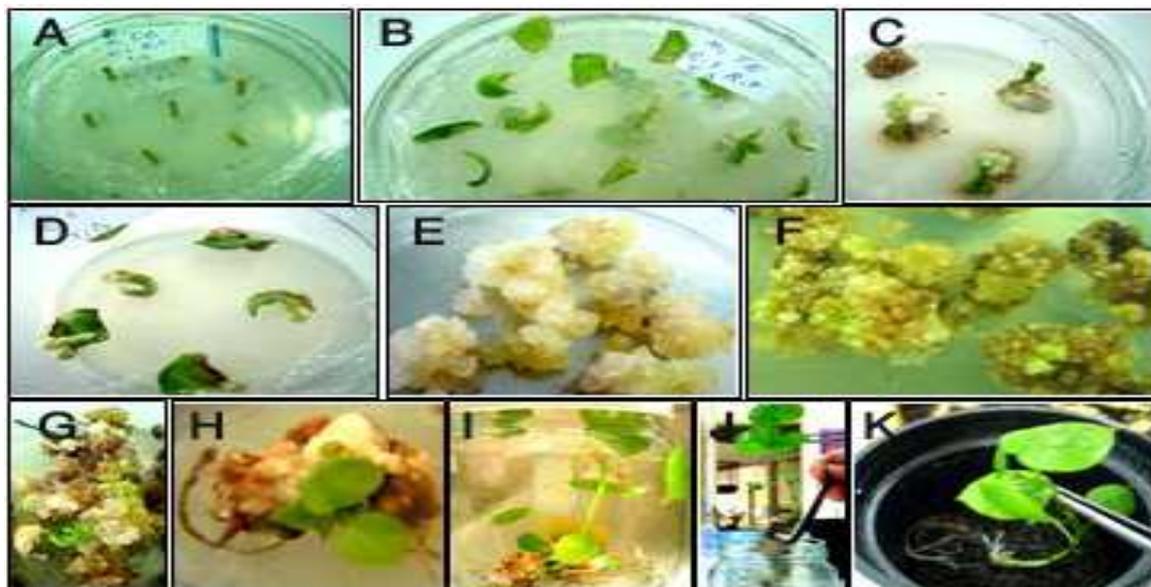
شکل ۱- نتایج بدست آمده از کشت ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی در محیط MSB_2 .
 A: کشت ریزنمونه هیپوکوتیل رقم کوکر ۳۱۲ در محیط MSB_2 ; B: کشت ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ ۳۴۹ در محیط MSB_2 ; C: ریشه زایی به جای تشکیل کال ریزنمونه هیپوکوتیل رقم کوکر ۳۱۲ در محیط MSB_2 ; D: افزایش سطح ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ C1211 در محیط MSB_2 ; E: ریشه زایی به جای تشکیل کال ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ ۳۴۹ در محیط MSB_2 ; F: تولید ریشه های فراوان ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ 4-S-4 و عدم تشکیل ساقه در محیط MSB_2 .

کشت ها می باشد که کال زایی فقط در ۲ ژنوتیپ 4-S-4 و ۳۴۹ آن هم ناچیز (۱۶/۳۳ درصد) مشاهده شد. ولی همه ژنوتیپ ها شروع به تولید تعداد زیادی ریشه در این محیط نمودند که مقدار ریشه زایی از ۶۶/۶۶ درصد (ژنوتیپ 4-S-4) تا ۳۳ درصد (ژنوتیپ ۳۴۹) متغیر بوده است (جدول ۲).

مقایسه میانگین درصد تولید کال‌های جنین زا در محیط MSB_1 نشان داد که باز هم ژنوتیپ 4-S-4 (۷۷ درصد) در رتبه نخست و ژنوتیپ های کوکر ۳۱۲ و ۳۴۹ و C1211

در محیط MSB_1 ژنوتیپ ها فقط تولید سلول های کالوسی نموده و ریشه زایی مشاهده نشد (شکل ۲). درصد کال زایی در بین ژنوتیپ ها متفاوت بوده و از ۳۳/۳۳-۷۳/۳۳ درصد متغیر بوده است که بیشترین درصد کال دهی مربوط به ژنوتیپ 4-S-4 (۷۳/۳۳ درصد) و سپس ۳۴۹ (۴۶/۶۶ درصد) و در نهایت کوکر ۳۱۲ و C1211 (هر دو با ۳۳/۳۳ درصد) بوده است. نتایج بررسی ها در محیط MSB_2 حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ ها و محیط

تولید کال ناچیزی مشاهده شده بود کال های جنینی تولید نشد. (به ترتیب با ۷۱، ۶۸/۳۳ و ۵۵ درصد) در گروه بعدی قرار گرفتند. در محیط MSB₂ نیز که



شکل ۲- مراحل انجام شده برای باززایی ژنوتیپ های پنبه از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی در محیط MSB₁. A: کشت ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ ۳۴۹ در محیط MSB₁. B: کشت ریزنمونه برگ کوتیلدونی رقم کوکر ۳۱۲ در محیط MSB₁. C: تحریک و شروع کال دهی ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ 4-S-4. D: تحریک و شروع کال دهی ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ ۳۴۹. E: کال جنین زا در ژنوتیپ 4-S-4. F: شروع تولید جنین از کال های جنین زا ژنوتیپ ۳۴۹. G: مراحل جنین زایی در ژنوتیپ 4-S-4. H: جوانه زنی جنین های سوماتیکی ژنوتیپ 4-S-4. I: رشد گیاهچه جوانه زده ژنوتیپ ۳۴۹. J: انتقال گیاهچه های باززا شده از محیط کشت به خاک سبک و استریل شده.

تعیین بهترین محیط کشت، ریزنمونه و ژنوتیپ برای کال زایی

با توجه به نتایج بدست آمده (جدول ۴) بین ژنوتیپ ها، ریزنمونه ها و محیط ها برای کال دهی و تولید کال جنین زا از نظر آماری اختلاف معنی داری (در سطح ۱ درصد) مشاهده شد. در این تحقیق محیط مناسب برای تولید کال و کال جنین زا هم برای ریزنمونه هیپوکوتیل و هم برگ کوتیلدونی محیط MSB₁ می باشد.

در نتیجه این بررسی می توان گزارش داد که محیط MSB₂ برای تولید کال از ریزنمونه برگ کوتیلدونی نامناسب بوده و تمامی ژنوتیپ ها در این محیط قادر به تولید کال و کال جنین زا نبوده و فقط ۲ ژنوتیپ مقدار ناچیزی کال غیرجنین زا تولید نمودند. لذا این محیط برای محیط کال زایی توصیه نمی گردد. برای ریزنمونه برگ کوتیلدونی نیز محیط MSB₁ بهترین محیط شناخته شده است.

جدول ۴- تجزیه واریانس فاکتوریل با ۳ فاکتور ژنوتیپ (۴ سطح)، محیط کشت (۲ نوع) و ریزنمونه (۲ نوع) در پنبه

میانگین مربعات (MS)					
منابع تغییرات	درجه آزادی	شروع کال دهی (روز)	کال زایی (%)	جنین زایی (%)	ریشه زایی (%)
ژنوتیپ	۳	۳۸/۷۴ ^{NS}	۲۸/۰۷ ^{**}	۵/۹۴ ^{NS}	۲/۷۵ ^{NS}
ریزنمونه	۱	۰/۵۲ ^{NS}	۱۶۱/۷ ^{**}	۱۷۲/۹ ^{**}	۹۲/۴ ^{**}
محیط کشت	۱	۲۵/۵۲ ^{NS}	۵۸/۵۷ ^{**}	۱۷۳/۷ ^{**}	۱۶۷/۰۲ ^{**}
ژنوتیپ × ریزنمونه	۳	۱۹۴/۵ [*]	۴/۸۳ ^{NS}	۲/۱۰ ^{NS}	۱/۲۷ ^{NS}
ژنوتیپ × محیط کشت	۳	۲۵۸/۰۲ ^{**}	۱/۳۶ ^{NS}	۷/۹۶ [*]	۲/۷۵ ^{NS}
ریزنمونه × محیط کشت	۱	۱۳۵۴/۶ ^{**}	۶۶/۹۹ ^{**}	۱۵۸/۲ ^{**}	۹۲/۴۵ ^{**}
ژنوتیپ × ریزنمونه × محیط کشت	۳	۱۵۴/۵ ^{NS}	۱/۴۴ ^{NS}	۳/۸۱ [*]	۱/۲۷ ^{NS}
خطا	۳۲	۵۴/۳۳	۱/۷۰	۲/۰۹	۱/۰۴

ns * و ** به ترتیب عدم معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

محیط MSB_1 و هم در محیط MSB_2 نتایج یکسان و خوبی نشان داده است. و در بین این دو ژنوتیپ، 4-S-4 با هر دو نوع ریزنمونه عملکرد بهتری داشته است، و عکس العمل آن از کوکر ۳۱۲ که تاکنون بهترین پاسخ را به مطالعات کشت بافتی پنبه نشان داده است، نیز بهتر می باشد. بعد از آنها ژنوتیپ کوکر ۳۱۲ بهتر بوده است و ژنوتیپ C1211 برای مطالعات کشت بافتی (تولید کال) در این ۲ محیط مورد مطالعه، توصیه نمی شود.

تحریک جنین زایی و جوانه زنی جنین های سوماتیکی

کال های جنین زا بعد از ۱۲ هفته قرار گرفتن در محیط کال دهی (MSB_1 و MSB_2) وارد محیط تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها (MS_{1a}) شدند. کال ها به مدت ۷ هفته در این محیط قرار گرفته و هر ۲۱-۲۸ روز یکبار واکشت گردیدند. نکته قابل توجه در این محیط، قهوه ای شدن و عدم رشد اغلب تکرارهای کالوسی بعد از واکشت در این محیط بود. که به نظر مدت زمان ماندن در این محیط می بایست از ۷ هفته کمتر شود. لذا یکسری از

بهترین ریزنمونه هیپوکوتیل می باشد که از برگ کوتیلدونی در هر ۲ محیط نتایج بهتری نشان داده است ولی با توجه به اینکه تعداد نمونه های برگ کوتیلدونی که از جوانه زنی بذر (به عنوان منبع ریزنمونه) بدست می آید نسبت به هیپوکوتیل بیشتر است و همچنین پاسخ ریزنمونه برگ کوتیلدونی به کال زایی نیز مناسب می باشد و در مقایسه سرعت تکثیر کال بین ریزنمونه ها، سرعت تکثیر ریزنمونه برگ کوتیلدونی در ژنوتیپ های 4-S-4 و ۳۴۹ از ریزنمونه هیپوکوتیل بیشتر و کال های جنینی خوبی نیز تولید نمودند، لذا می توان از برگ کوتیلدونی هم به عنوان ریزنمونه فقط در محیط MSB_1 استفاده نمود.

در بین ژنوتیپ های مورد بررسی، می توان ژنوتیپ های 4-S-4 و ۳۴۹ و سپس کوکر ۳۱۲ را به عنوان بهترین ژنوتیپ ها معرفی نمود. به عبارت دیگر می توان گفت که ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ 4-S-4 در محیط MSB_1 بهترین نتیجه را نشان داده است. ولی در ژنوتیپ ۳۴۹ ریزنمونه هیپوکوتیل هم در

تعدادی گیاهچه شدند. از ژنوتیپ C1211 گیاهچه ای تولید نشد. تعدادی از گیاهچه ها در محیط MS_{2a} تولید ریشه نموده و آن دسته از گیاهچه هایی که ریشه زایی اندک و یا هیچ ریشه ای تولید نکرده بودند، برای ریشه زایی به محیط MSB حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر از هورمون IBA وارد شدند و ریشه دار گردیدند. گیتا و همکاران (۷) بهترین تیمار جهت ریشه زایی لوبیای سودانی و یورانبی و همکاران (۲۰) بالاترین ریشه زایی در شبدر ایرانی و افشاری (۱) بهترین تیمار برای ریشه زایی شنبليله را استفاده از هورمون IBA (با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر) در محیط MS معرفی نمودند. گیاهچه های حاوی ریشه به خاک سبک و استریل منتقل و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت قرار گرفتند و جهت حفظ رطوبت زیر پوشش شفاف نگهداری شدند.

نتایج این بررسی نشان داد که شروع کال دهی در پنبه صفتی است که تا حدود زیادی وابسته به ژنوتیپ می باشد که در بین ژنوتیپ های مورد بررسی در این مطالعه ژنوتیپ 4-S-4 زودترین شروع کال دهی را هم با ریزنمونه هیپوکوتیل و هم با برگ کوتیلدونی نسبت به سایر ژنوتیپ ها دارا بوده است. در بررسی توحیدفر و همکاران (۱۹) رقم کوکر ۳۱۲ زودتر از ارقام ساحل و در بررسی گروسی و همکاران (۶) رقم کوکر ۳۱۲ زودتر از ارقام ساحل و سپس ورامین شروع به کال دهی کرده بودند. درصد کال دهی علاوه بر نوع ریزنمونه، به نظر ژنتیکی - محیطی نیز می باشد و تفاوت مشاهده شده بین ژنوتیپ ها

تکرارهای کالوسی واکشت نشده و فقط به مدت یک ماه در محیط MS_{1a} قرار گرفتند که علائم جوانه زنی ژنوتیپ های 4-S-4 و ۳۴۹ در این محیط اتفاق افتاد و بلافاصله جوانه ها و کال های جنینی از این محیط به محیط جوانه زنی MS_{2a} وارد شدند. بعد از انتقال به محیط جوانه زنی، جوانه ها شروع به رشد نموده و بعد از گذر از مرحله کوتیلدونی، تولید ساقه و برگ های بیشتر و همچنین برخی از آنها همزمان شروع به تولید ریشه نمودند. بعد از ۲-۱ بار واکشت، گیاهچه ها کامل و آماده انتقال به خاک گردیدند. اما اغلب کال هایی که از مرحله قبلی به این محیط وارد شده بودند یا جنین زایی نداشته و یا در مراحل اولیه جنین زایی (کروی) باقی ماندند که می تواند به علت عدم وجود شرایط مناسب جهت پیشرفت مراحل جنین زایی از جمله قرار گرفتن طولانی مدت در محیط تحریک جنین زایی (MS_{1a}) و یا نامناسب بودن میزان نور، نوع هورمون های مورد استفاده و یا سایر موارد همچون خصوصیات ژنتیکی کال های مربوط به هر ژنوتیپ باشد (۸). اغلب این جنین های سوماتیکی نابالغ شروع به تولید سلول های کالوسی سبز رنگ نمودند که باز هم بعد از گذشت زمان رشد آنها متوقف شده و جوانه زنی صورت نگرفت.

باززایی

در این مطالعه، باززایی و تولید گیاهچه از ریزنمونه ها تفاوتی نداشته و در کل تعداد گیاهچه های باززایی شده نسبتاً اندک بوده است که در بین ژنوتیپ ها، ژنوتیپ 4-S-4 و ۳۴۹ و سپس کوکر ۳۱۲ موفق به تولید

پنبه گیاهی است که درصد باززایی آن پایین و گیاهچه های باززایی شده از آن دارای رشد کم می باشند (۱۸). در این مطالعه نیز باززایی گیاهچه در پنبه نسبتاً اندک بوده و پیشنهاد می شود از محیط های دیگری برای تحریک و بلوغ جنین ها و همچنین جوانه زنی جنین ها استفاده شود تا بتوان به تعداد گیاهچه های باززا شده بیشتری دست یافت.

منابع

1. Afshari, A. 2009. Tissue culture study and investigation of cytogenetic variation induced by colchicines and trifluralin in fenugreek (*Trigonella Foenum-graecum* L.). M.S. Thesis in Mazandaran Univ. 118 pp.
2. Bay, Z., K. Ghasemi bezdi and R. Bozorgi poor. 2008. Study of some critical parameters in regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars in Invitro conditions. The 10th Iranian Congress of Crop Sciences. Karaj, Iran. 519 pp.
3. Davidonis, G.H. and R.H. Hamilton. 1983. Plant regeneration from callus tissue of (*Gossypium hirsutum* L.) Plant Sci Lett. 32: 89-93.
4. Finer, J.J. 1988. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep., 7: 399-402.
5. Firoozabady, E. and D.L. DeBoer. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypim hirsutum* L.). In Vitro Cell Dev Biol Plant. 29: 166-173.
6. Garousi, Sh., M. Tohidfar, K. Kazemi Tabar, H. Rahimian and Gh. Nematzadeh. 2007. Somatic embryogenesis in three cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. Iranian J of Agric Sci., 9(4): 302-314.
7. Geetha, N., P. Venkatachalam, V. Prakash and L. Sita. 1998. High frequency induction of multiple shoots and plant regeneration from seedling explants of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Current Science. 75(10):1036-1041.
8. Karami, A., A. Deljo and A. Mahmodi Por. 2008. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in *Dianthus caryophyllus* L. Journal of Agric. Sci. Nature. Resource. 12(43). pp: 11-17.
9. Kumar, S. and D. Pantal. 1998. Regeneration of Indian cotton variety MCU-5 through somatic embryogenesis. Current Sci., 74(6): 538-540.
10. Kumria, R., V.G. Sunnichan, D.K. Das, S.K. Gupta, V.S. Reddy, R.K. Bhatnagar and S. Leellavathi. 2003. High frequency somatic embryo production and maturation in normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through metabolic stress. Plant Cell Rep., 21: 635-639.
11. Leellavathi, S., V.G. Sunnichan, R. Kumria, G.P. Vijaykanth, R.K. Bhatnagar and V.S. Reddy. 2004. A simple and rapid *Agrobacterium*- mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic cell a source to generate large numbers of transgenic plants. Plant Cell Rep., 22: 465-470.
12. Mundeshvar, S.B. 1995. Regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) from shoot tip culture. Plant Sci., 8(1): 89-94.
13. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 173-197.

14. Ouma, J., PM.M. Young and N.M. Reichert. 2004. Optimization on in vitro regeneration of multiple shoots from hypocotyle section of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African J. Biotech. 3: 169-173.
15. Price, H.J. and R.H. Smith. 1979. Somatic embryogenesis in suspension culture of *Gossypium klotzschiaanum* Anderss. Planta. 145: 305-307.
16. Rastegar, J. and Z. Hosseini Nejad. 1998. Callus produce and cell culture in four cotton cultivars in suspension media. The 5th Iranian Congress of Crop Sciences. 579 pp.
17. Sheidai, M., F. Yahyazadeh, F. Farahanei and Z. Noormohammadi. 2008. Genetic and morphological variations induced by tissue culture in tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Acta Biologica Szegediensis. 52(1): 33-38.
18. Shengwei, Zh. and S. Jingsan. 2000. Rapid plant regeneration from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Chinese Science Bulletin. 45(19): 1771-1774.
19. 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.
20. Uranbey, S., C.S. Sevimay and S. Ozcan. 2005. Development of high frequency multiple shoot formation in Persian clover. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 80: 229-232.
21. Zhang, B.H., R. Feng, F. Liu and Q. Wang. 2001. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. Bot. Bull. Acad. Sin., 42: 9-16.
22. Zhang, XL., J.M. Zhang., M.J. Yiao, J.Z. Sun and J.L. Liu. 1993. Studies on somatic cell culture and its application in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) improvement. J Huazhong Agri Univ., 12: 421-426.

Study of Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Cotton

L. Fahmideh¹, G.A. Ranjbar², O. Alishah³ and N.A. Babaeian Jelodar⁴

1, 2 and 4- Ph.D. Student, Associate Professor and Professor of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

3- Assistant Professor of Cotton Research Institute, Gorgan

Abstract

Optimization of regeneration methods in cotton is necessary to improve and Successful production of transgenic cotton cultivars by tissue culture technique. This study was conducted to determine the genotypic effect on callus induction in cotton using 3 genotypes (Coker349, 4-S-4 and C1211) and Coker 312 selected and a study was carried out in Cotton Research Institute of Gorgan using a factorial experiment based on completely randomized design with three replications in 2011. Explants of hypocotyls and cotyledons of these genotypes were isolated and placed on two cotton callus media MSB (MS medium with Gamborg vitamins-B5), MSB1 medium supplemented with 0.1 mg l⁻¹ 2,4-D, 0.1 mg l⁻¹ kinetin, 0.75 g l⁻¹ MgCl₂ and MSB2 medium supplemented with 1 mg l⁻¹ NAA. Cultures incubated at 28±2°C under a light intensity of approximately 2000 lx with 16/8 light/darkness photoperiod for callus induction. In medium containing 2,4-D and Kinetin, 4-S-4 explants of hypocotyls and cotyledons produced callus earlier than Coker349, Coker312 and C1211. The percentage of callus production for 4-S-4 cultivar in two callus media was higher than other genotypes. Callus production from hypocotyls in two media and cotyledon in MSB1 medium for all genotypes showed the highest size of calli most of which were embryogenic. Explants of cotyledon for all genotypes were produced root and no produce callus. For embryogenesis induction and maturation of embryos, produced calli were transferred onto MSB medium supplemented with 0.75 g l⁻¹ MgCl₂ and 1.9 g l⁻¹ KNO₃. Induced Somatic embryos were transferred on embryo germination medium and plantlets produced for 4-S-4, Coker 349 and Coker 312 genotypes.

Keywords: Cotton, Tissue culture, Explants, Callus, Somatic embryo