دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

باززایی ۶ ژنوتیپ پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) از طریق جنین‌زایی سوماتیکی

لیلا فهمیده[۱]، غلامعلی رنجبر[۲]، عمران عالیشاه[۳] و نادعلی بابائیان جلودار[۴]

۱ - استادیار، دانشگاه زابل، (نویسنده مسوول: L.fahmideh@uoz.ac.ir)
۲ و ۴- دانشیار و استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار، موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021

چکیده

بهینه‌سازی روش‌های باززایی در پنبه با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت در اصلاح و تولید موفق ارقام پنبه‌های تراریخت ضروری به‌نظر می‌رسد. ریزنمونه های ۱۴-۷ روزه هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای ۶ ژنوتیپ پنبه به‌منظور تحریک کالوس به مدت ۱۰ هفته روی محیط کشت MS_1 (محیط کشت MS حاوی ویتامین‌های محیط B5) حاوی هورمون‌های اکسین و سیتوکینین با استفاده از آزمایش فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. کشت‌ها به اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس به‌منظور القای کال‌زایی منتقل شدند. کالوس‌های جنین‌زا جهت تحریک و بلوغ جنین‌ها به محیط کشت‌های MS حاوی NH_4NO_3 و KNO_3 بدون هورمون منتقل شدند. با اینکه KNO_3 تأثیر ناچیزی جهت تحریک جنین‌های سوماتیکی دارد اما برای نمو و بلوغ جنین‌ها بیشترین کارایی را دارد. به‌منظور جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی از محیط کشت MS حاوی هورمون GA_3 استفاده شد و گیاهچه‌های باززا شده از روش جنین‌زایی سوماتیکی تولید شدند. ژنوتیپ 4-S-4 با هر دو نوع ریزنمونه (هیپوکوتیل و برگ کوتیلدون) از نظر شروع کال‌زایی، درصد کال‌زایی و همچنین درصد تولید کال جنین‌زا برتر از سایر ژنوتیپ‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: باززایی گیاهچه، برگ لپه‌ای، پنبه، جنین‌زایی سوماتیکی، هیپوکوتیل

مقدمه

پیشرفت‌های بیوتکنولوژی در کوتاه کردن مراحل اصلاح کلاسیک گیاهان مختلف کاربرد دارد. روش‌های اصلاحی کلاسیک می‌تواند در ترکیب با روش‌های کشت بافت، برای تغییر ژنتیکی صفات مطلوب بکار برده شود (۱۷،۱۴). کلید دستیابی به کاربرد موفق بیوتکنولوژی در اصلاح نباتات، داشتن سیستم باززایی کارآمد می‌باشد که می‌تواند در هیبریداسیون بین گونه‌ای، موتاسیون، اصلاح واریته‌های هیبرید، ریزازدیادی سریع و انتقال ژن، مورد استفاده قرار گیرد (۲۱،۱۶،۲).

جنین‌زایی سوماتیکی یکی از سریع‌ترین روش‌های ازدیاد گیاهان در مقیاس وسیع محسوب می‌شود. در مقایسه با سایر گیاهان زراعی، جنین‌زایی سوماتیکی در پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) به سختی قابل انجام است. اولین مشاهده جنین سوماتیکی در پنبه توسط پرایس و اسمیت (۱۸) صورت گرفت، آنها جنین‌های سوماتیکی را در کشت سوسپانسیون سلولی یک گونه وحشی پنبه مشاهده کردند. دیویدنس و همیلتون (۱) از طریق کشت طولانی مدت کالوس‌های جنین‌زا در محیط کشت بدون هورمون، گیاهان باززا شده بدست آوردند، رشد گیاهان و پیدایش ریشه زمانی بود که غلظت گلوکز در محیط کشت را کاهش دادند.

تان و همکاران (۲۴) از قطعات ساقه پنبه در محیط کشت MS حاوی IAA و کینتین، کالوس تولید کردند و زمانی که IAA با NAA و 2-ip جایگزین شد، گیاهچه‌های سبز بدست آمد. ایکرام الحق (۹) روش سریعی را برای تولید و تکثیر کالوس از ریزنمونه هیپوکوتیل پنبه رقم کوکر ۳۱۲ بکار گرفت، کالوس‌های حاصله دارای درجه بالای جنین‌زایی سوماتیکی بودند. گیاهچه‌های باززا شده طبیعی در مدت ۵-۴ ماه تولید شدند. وانگ و همکاران (۲۹) در محیط MSB حاوی گلوتامین و آسپاراژین از کالوس‌های جنین‌زای سوماتیکی پنبه، گیاه باززایی شده بدست آوردند. همچنین آنها با کاهش غلظت عناصر پرمصرف، رنگ قهوه‌ای ایجاد شده در محیط کشت را کاهش دادند. قاسمی و همکاران (۸) کالوس‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی ریزنمونه هیپوکوتیل را در برخی از ژنوتیپ‌های پنبه ایرانی (هاشم آباد، کرمان، ترمز و سپید) به همراه رقم کوکر ۳۱۲، مورد بررسی قرار دادند.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021

آنها به‌منظور تحریک کالوس و تشکیل کالوس‌های جنین‌زا، ریزنمونه هیپوکوتیل ۷-۴ روزه را در چند محیط کشت MSB با سطوح و غلظت‌های مختلف هورمون‌های اکسین و سیتوکینین کشت کردند. درصد جنین‌زایی در بین ژنوتیپ مورد مطالعه متفاوت بود.

اصلاح سیستم‌های کشت بافت و افزایش کارایی باززایی گیاهچه در واریته‌های پنبه، اولین قدم در جهت کاربرد تکنولوژی انتقال ژن در بهبود و اصلاح آن است. هرچند کارایی باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی در پنبه گسترش یافته است اما هنوز مشکلاتی همانند تعداد زیاد جنین‌های غیرطبیعی، تولید کم گیاهچه، کاهش طول ساقه‌های تولید شده و ریشه‌دهی کم گیاهچه‌های باززا شده از طریق جنین‌زایی سوماتیکی وجود دارد (۹). لذا در حال حاضر بدست آوردن یک سیستم بهینه با توان تولید کالوس و گیاهچه باززا شده مناسب، برای سیستم کشت بافت پنبه مسئله مهمی است. هدف از مطالعه حاضر بهینه‌سازی تکنیک‌های کشت بافت و باززایی گیاه پنبه و شناسایی ارقام تجاری و ایرانی دارای پتانسیل بالای باززایی توسط جنین‌زایی سوماتیکی بود که برای موفقیت‌های بعدی در امر انتقال ژن به این گیاه بسیار مهم می‌باشد.

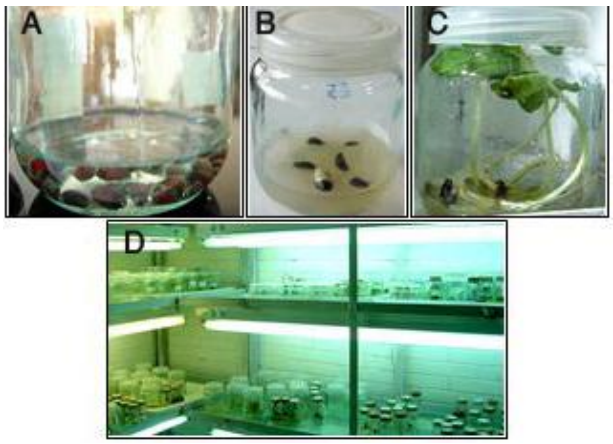
مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت مؤسسه تحقیقات پنبه گرگان در سال ۱۳۸۹ و با استفاده از ژنوتیپ‌های کوکر ۳۱۲، لاین ۳۴۹، C1211، 4-S-4، N200 و ساحل انجام شد. جهت حذف الیاف سلولزی موجود در روی بذر، بذرها با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ الیاف‌زدایی شده و بلافاصله با مقادیر زیاد آب شستشو شدند. در ادامه به‌منظور ضدعفونی سطحی بذرها، ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و سپس در محلول هیپوکلریدسدیم ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. بعد از ضدعفونی سطحی، ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو و به مدت دو روز درون ظروف شیشه‌ای استریل دارای درب محکم و حاوی آب مقطر استریل نگهداری شده و سپس در محیط 1/2MS با pH:۵/۶-۵/۸ کشت شدند. کشت‌ها درون اتاقک رشد در دمای۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

به‌منظور القای کالوس، از دو بخش هیپوکوتیل (۵-۴ میلی‌متر) و برگ لپه‌ای (۵-۳ میلی‌متر) گیاهچه‌های ۱۴-۷ روزه، ریزنمونه تهیه شد و در داخل محیط کشت MS_1 قرار داده شدند (جدول ۱). هر واحد آزمایشی عبارت از یک پتری دیش حاوی ۸-۵ ریزنمونه بود. بدین ترتیب، اثر دو عامل: ژنوتیپ (۶ سطح شامل: کوکر ۳۱۲، لاین ۳۴۹، C1211، 4-S-4، N200 و ساحل) و نوع ریزنمونه (۲ سطح شامل: هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای) بر تولید و رشد کالوس به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل با سه تکرار بررسی شدند. کشت‌ها درون اتاقک رشد با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند (شکل ۱). واکشت‌ها تقریباً هر۳۰-۲۱ روز یکبار انجام گردید و صفاتی چون شروع کالوس‌زایی (تعداد روز سپری شده تا مشاهده اولین علائم تولید کالوس)، درصد کالوس‌دهی (تعداد ریزنمونه به کالوس تبدیل شده در هر تکرار) و درصد کالوس جنین‌زا (نسبت تعداد کالوس‌های جنین‌زا به تعداد کل کالوس‌ها در هر تکرار) شمارش و یادداشت‌برداری شدند. کالوس‌ها بر اساس رنگ و کیفیت به گروه‌های جنینی (شامل کالوس‌های دانه‌دار و شل دارای رنگ کرم خاکستری و ترد و شکننده و با رشد سریعتر بودند) و غیرجنینی (شامل کالوس‌های متراکم و فشرده به رنگ سفید، سبز تیره یا قهوه‌ای و دارای رشد کمتر بودند)، تقسیم‌بندی شدند.

به‌منظور دستیابی به جنین‌زایی و باززایی گیاهچه به ترتیب از محیط کشت‌های MS_{1b}، MS_{2b} و MS_{3b} استفاده شد (جدول ۱). بدین ترتیب که به‌منظور تحریک جنین‌زایی و بلوغ جنین‌ها، کالوس‌ها بعد از ۱۰ هفته از محیط کشت کالوس‌دهی (MS_1) به محیط کشت MS_{1b} به مدت ۲ هفته و در ادامه به محیط کشت MS_{2b} به مدت ۳ هفته منتقل شدند. به‌منظور جوانه‌زنی جنین های سوماتیکی از محیط کشت MS_{3b} استفاده شد (مطابق روش ایکرام الحق (۹)). تمامی محیط‌های مورد استفاده (محیط کشت MSB، محیط پایه MS حاوی ویتامین‌های محیط کشت B5) با ساکارز (۳ درصد) و آگار (۷ گرم در لیتر) و با pH:۵/۸ تهیه گردیدند.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021



شکل ۱- مراحل مختلف انجام شده برای ضدعفونی و کشت بذر پنبه در شرایط کشت درون شیشه‌ای. A. بذور ضدعفونی شده و خیسانـده شده در آب مقطر استریل، B. شروع جوانـه‌زنی بذرهـای کشت شده در محیط کشت 1/2 MS، C. بذرهـای جوانه زده و آماده برای تهیه ریزنمونه، D. قرار دادن کشت‌ها درون اتاقک رشد.

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت‌های مورد استفاده

نام محیط کشت	اجزاء محیط کشت
MS_1	MSB + 2,4-D (0.1 mgl^{-1}) + kin (0.5 mgl^{-1}) + $MgCl_2$ (1.6 mgl^{-1})
MS_{1b}	MSB + NH_4NO_3 (1.9 mgl^{-1}) + $MgCl_2$ (1.6 mgl^{-1})
MS_{2b}	MSB + KNO_3 (0.5 mgl^{-1}) + $MgCl_2$ (1.6 mgl^{-1})
MS_{3b}	MSB + GA_3 (0.05 mgl^{-1})

تجزیه واریانس داده‌ها به‌صورت آزمـایش فاکتوریـل در قالب طرح کاملاً تصـادفی و مقایسـه میـانگین‌هـا بـه روش LSD انجام شد. بـا توجـه بـه اینکـه اکثـر داده‌هـا بر اساس درصد بود قبل از انجام تجزیه‌های آماری، برای نرمـال کـردن توزیـع داده‌هـا از تبـدیل جـذری داده‌هـا $X_1=\sqrt{X2}$ اسـتفاده شـد. بـرای محاسـبات آمـاری از نرم‌افزارهای کامپیوتری EXCEL و SAS استفاده گردید.

نتایج و بحث

شروع، تحریک و تولید کالوس جنین‌زا

نتـایج تجزیـه واریـانس بـرای صـفت شـروع کالوس‌دهی ژنوتیپ‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود و ریزنمونه‌های مختلف (هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای)، شـروع کالوس‌دهی متفاوتی داشتند (جدول ۲). ریزنمونـه‌هـای هیپوکوتیل در محیط کشت MS_1 بعد از گذشـت ۱۰- ۶ روز شروع به کالوس‌زایی کردند و ریز نمونـه‌هـای بـرگ لپه‌ای ژنوتیپ 4-S-4 (۶ روز) به‌طور معنی‌داری زودتـر و N200 (۹/۶۶ روز) دیرتـر از سـایر ژنوتیـپ‌هـا تولیـد کالوس کرد (جـدول ۳). درصـد کـالوس‌دهـی ریزنمونـه هیپوکوتیل در بـین ژنوتیـپ‌هـا معنـی‌دار نبـود و همـه ژنوتیپ‌ها برای صفت درصد تولید کالوس‌هـای جنـین‌زا نیز در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیـه واریـانس فـاکتوریـل داده‌هـای حاصـل از کشت ریزنمونه‌هـای هیپوکـوتیل و بـرگ لپـه‌ای ژنوتیپ‌های مختلف پنبه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)		
		شروع کالوس‌زایی (روز)	کالوس‌دهی (٪)	جنین‌زایی (٪)
ژنوتیپ	۵	۲۱**	۰/۴۸*	۱/۲۹**
ریزنمونه	۱	۹۰/۲**	۳۴/۱**	۲/۹۶**
ژنوتیپ × ریزنمونه	۵	۱۱/۳**	۰/۱۸ns	۰/۴۹ns
خطا	۲۴	۱/۷۵	۰/۱۸	۰/۲۹

ns، * و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021

جدول ۳- مقایسه میانگین داده‌های حاصل از کشت ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای ژنوتیپ‌های مختلف پنبه

	ریزنمونه هیپوکوتیل			ریزنمونه برگ لپه‌ای		
واریته	شروع کالوس‌زایی (روز)	کالوس‌دهی (٪)	جنین‌زایی (٪)	شروع کالوس‌زایی (روز)	کالوس‌دهی (٪)	جنین‌زایی (٪)
کوکر ۳۱۲	۸/۳۳^{bc}	۹۳/۳^{a}	۷۸/۳^{a}	۷^{a}	۶۰^{ab}	۶۸/۶^{ab}
لاین ۳۴۹	۷/۳۳^{ab}	۹۱/۶^{a}	۷۵^{a}	۹/۳۳ ^{a}	۵۸/۳^{ab}	۷۰^{ab}
C1211	۶/۶۶^{ab}	۹۶/۶^{a}	۷۵/۶^{a}	۱۳/۳^{b}	۵۶/۶^{b}	۵۶^{b}
4-S-4	۶^{a}	۹۳/۳^{a}	۷۸/۳^{a}	۸/۶۶^{a}	۷۰^{a}	۸۵^{a}
N200	۹/۶۶^{c}	۸۸/۶^{a}	۶۷/۶^{a}	۱۴/۳^{b}	۵۰^{b}	۵۵^{b}
ساحل	۸/۶۶^{bc}	۹۰^{a}	۷۰^{a}	۱۳^{b}	۵۵^{b}	۶۰^{b}

*: در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حرف یا حروف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

پس از ۱۴-۷ روز ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای در محیط کشت MS_1، تولید کالوس را آغاز کردند. ژنوتیپ‌های کوکر ۳۱۲ (۷ روز)، 4-S-4 (۸/۶۶ روز) و لاین ۳۴۹ (۹/۳۳ روز) به‌طور معنی‌داری زودتر از سایرین شروع به کالوس‌دهی کردند. در صفت درصد کالوس‌دهی ریزنمونه برگ لپه‌ای، ژنوتیپ 4-S-4 (۷۰ درصد) نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری نشان داد. همچنین ژنوتیپ 4-S-4 با ۸۵ درصد جنین‌زایی برتر از سایرین و در گروه نخست قرار گرفت (جدول ۳).

نتایج نشان داد که شروع کالوس‌دهی در پنبه صفتی است که تا حدودی وابسته به ژنوتیپ می‌باشد. در بررسی‌های توحیدفر و همکاران (۲۵) و گروسی و همکاران (۵) نیز کوکر ۳۱۲ سریعتر از ساحل و ورامین شروع به کالوس‌دهی کرده بود. در این مطالعه نیز 4-S-4 با هر دو ریزنمونه برگ لپه‌ای و هیپوکوتیل سریعتر از سایر ژنوتیپ‌ها کالوس‌دهی را آغاز کرد. اثر ریزنمونه و همچنین اثر متقابل ریزنمونه در ژنوتیپ برای شروع کالوس‌دهی معنی‌دار (در سطح احتمال ۱ درصد) گردید، یعنی اینکه روند کالوس‌زایی ژنوتیپ‌ها با توجه به نوع ریزنمونه متفاوت بوده است. بر اساس نتایج حاصله، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با ریزنمونه هیپوکوتیل در دامنه زمانی کوتاه‌تری (۱۰-۶ روز) نسبت به برگ لپه‌ای (۱۴-۷ روز) کالوس‌دهی را آغاز کردند (جدول ۳).

درصد کالوس‌دهی نیز تحت تأثیر ژنوتیپ و نوع ریزنمونه بوده است و اثر ژنوتیپ و ریزنمونه برای این صفت معنی‌دار گردید (جدول ۱). در بین ژنوتیپ‌ها، هیپوکوتیل از درصد کالوس‌دهی بالاتری (حدود ۹۲ درصد) نسبت به برگ لپه‌ای (حدود ۵۸ درصد) برخوردار بوده است، به عبارت دیگر بیش از ۹۰ درصد از مجموع هیپوکوتیل‌های کشت شده در محیط کشت MS_1، به کالوس تبدیل شدند که این مقدار بسیار قابل توجه است. در این بررسی با اینکه بسته به ژنوتیپ و ریزنمونه درصد کالوس‌دهی متفاوت بود، ولی در مجموع درصد کالوس‌دهی بالا با هیپوکوتیل و درصد کالوس‌دهی خوب و مناسب با برگ لپه‌ای حاصل شد (جدول ۳).

در مقایسه بین ژنوتیپ‌ها، همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با هیپوکوتیل درصد کالوس‌دهی بالا در دامنه‌ای تقریباً نزدیک (دامنه ۹۷-۸۹ درصد) به هم داشتند. در حالیکه درصد کالوس‌دهی همین ژنوتیپ‌ها با ریزنمونه برگ لپه‌ای، کمتر و در دامنه‌ای نسبتاً گسترده‌تر (دامنه ۷۰-۵۰ درصد) قرار داشت (جدول ۳).

درصد کالوس‌دهی بالا می‌تواند صفت با ارزشی محسوب گردد، زیرا در صورتی‌که در محیط کشت معینی کالوس‌های ایجاد شده به کالوس‌های جنین‌زا تبدیل شوند، با بالا رفتن فراوانی آنها احتمال دستیابی به جنین‌های سوماتیکی بیشتر می‌شود (۵). درصد کالوس‌دهی ریزنمونه برگ لپه‌ای نیز در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متفاوت بود و 4-S-4 (۷۰ درصد) بالاترین درصد کالوس‌دهی را نشان داد. در بررسی رستگاری و حسینی‌نژاد (۲۰) با ریزنمونه‌های مختلف ۴ رقم از پنبه‌های زراعی ایران، ریزنمونه ریشه هیچ کالوسی تولید نکرد و مقدار کالوس تولید شده از کناره‌های برگ نیز بسیار کم بود و تنها کشت هیپوکوتیل منتج به تولید مقدار قابل توجهی کالوس شد. نتایج بدست آمده در بررسی حاضر تقریباً مشابه با رائو و همکاران (۱۹) بود که در مطالعه آنها بیشترین درصد کالوس‌های حاصل مربوط به ریزنمونه هیپوکوتیل بود که در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر کینتین (مشابه با محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه)، ۷۵ درصد کالوس‌زایی مشاهده کردند.

اثر ژنوتیپ و ریزنمونه بر درصد تولید کالوس جنین‌زا نیز معنی‌دار گردید (جدول ۲) و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نتایج متفاوتی نشان دادند. در مجموع ۷۴ درصد از کالوس‌های تولید شده از ریزنمونه هیپوکوتیل و ۶۴ درصد از کالوس‌های حاصله از برگ لپه‌ای ، جنین‌زا بودند. در بررسی ژانگ و همکاران (۳۱) که از سه ریزنمونه هیپوکوتیل، لپه و ریشه پنبه روی محیط کشت MSB حاوی هورمون زآتین، کالوس‌های جنین‌زای سوماتیکی بدست آورده بودند، اعلام کردند که توانایی ایجاد کالوس‌های جنین‌زا به نوع ریزنمونه بستگی دارد

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021

به‌طوری‌که بیشترین پاسخ جنین‌زایی از ریشه و هیپوکوتیل بدست آمد. نتایج گذشته نشان داده است که قسمت‌های مختلف کالوس‌های جنین‌زا با درجات مختلف فشردگی با رنگ‌های کرم- روشن ایجاد می‌شود. تنوع در رنگ بافت کالوس‌های جنین‌زای پنبه بوسیله چندین محقق گزارش شد (۲۶،۲۳،۶،۴،۳).

در مجموع کلیه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه توانستند در محیط کشت بکار رفته (محیط کشت MS_1)، شروع کالوس‌دهی سریع، درصد کالوس و کالوس جنین‌زای قابل توجهی تولید نمایند، این امر نشان‌دهنده مناسب بودن محیط کشت انتخاب شده برای انجام مطالعات کشت بافتی پنبه می‌باشد، که این نتیجه با نتایج ایکرام الحق (۹) که فقط با ریزنمونه هیپوکوتیل رقم کوکر ۳۱۲ در محیط کشت مشابه، به درصد کالوس‌دهی و درصد تولید کالوس جنین‌زای بالایی دست یافته بود، مطابقت دارد.

تحریک جنین‌زایی و جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی

کالوس‌های جنین‌زای بدست آمده، بعد از گذشت ۱۰ هفته و ۳-۲ بار واکشت در محیط کشت MS_1، وارد محیط کشت تحریک جنین‌زایی (MS_{1b}) شده و دو هفته در این محیط قرار گرفتند. کالوس‌های جنین‌زا دو هفته بعد از کشت روی محیط MS_{1b}، شروع به قرمز شدن ناشی از سنتز آنتوسیانین کردند که منجر به محدود کردن تعداد جنین‌های تولیدی گردید. اغلب جنین‌های تولید شده از نظر مورفولوژی غیرطبیعی بوده و سپس شروع به از بین رفتن کردند.

در مطالعه میشرا و همکاران (۱۳) سنتز آنتوسیانین کم در بین جنین‌های رشد یافته کوکر ۳۱۲ مشاهده شد که این ویژگی نشان‌دهنده خصوصیت مطلوب در باززایی کوکر است. تولید آنتوسیانین ممکن است تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی چون UV، نور، منبع نیتروژن، نوع قند، استرس اسمزی، دما، شرایط فیتوهورمون‌ها یا هورمون‌های خارجی باشد (۳۲). زمانی که مقدار NH_3 یا NO_3 محیط کم شود، با کاهش رشد سلول‌ها مقدار آنتوسیانین افزوده می‌شود. زمانی که مقدار NO_3 بیشتر از NH_3 شود، این کمبود سبب افزایش رشد سلولی شده و در نتیجه مقدار آنتوسیانین نسبتاً کم می‌شود و با افزایش NO_3 رشد سلولی افزایش یافته در حالیکه NH_3 تولید آنتوسیانین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۱). ذخیره آنتوسیانین زمانی که تکثیر سلولی رخ نمی‌دهد، آغاز می‌شود و زمانی که تکثیر سلولی رخ می‌دهد، ذخیره آنتوسیانین کم می‌شود (۱۲). بنابراین توقف رشد سلولی ممکن است سبب سنتز آنتوسیانین شود و زمانی که سلول‌ها تحت مراحل مختلف تقسیم سریع سلولی قرار می‌گیرند، سنتز محصولات ثانویه (آنتوسیانین) در اغلب موارد کاهش می‌یابد (۱۵).

کالوس‌های جنین‌زا حاوی جنین‌های نابالغ به مدت ۳ هفته در محیط کشت MS_{2b} قرار گرفتند تا جنین‌های بالغ تشکیل گردد. ایکرام الحق (۹) گزارش کرد که وجود ماده NH_4NO_3 در محیط کشت، نقش مهمی در تمایز کالوس‌ها و تشکیل جنین‌های سوماتیکی دارد، اما وجود آن برای جنین‌های جوان با سن دو هفته کشنده است. گرچه KNO_3 تأثیر کمی برای تحریک جنین‌زایی سوماتیکی دارد، ولی این ماده برای نمو و بلوغ جنین‌ها بسیار مؤثر می‌باشد. نیترات آمونیوم نقش کلیدی را در شروع مراحل تمایز در کالوس‌های جنین‌زا بازی می‌کند و منجر به کاهش زمان مراحل تحریک جنین می‌شود. کاهش مدت زمان کشت، اجازه می‌دهد تا جمعیت‌های بزرگ سلولی به جنین و سپس به گیاهچه‌های طبیعی تبدیل شوند (۹). علیرغم این که جنین‌زایی سوماتیکی در اغلب ژنوتیپ‌ها صورت گرفت اما تمایز مطلوب در همه ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد و اغلب جنین‌ها در مراحل مختلف جنین‌زایی به ویژه مراحل اولیه جنین زایی (کروی) و برخی در مرحله نیزه‌ای باقی ماندند و اغلب این جنین‌های سوماتیکی نابالغ شروع به کالوس‌دهی مجدد نمودند. دلیل این امر می‌تواند به عدم وجود شرایط مناسب جهت پیشرفت مراحل جنین‌زایی از جمله نامناسب بودن میزان نور، نوع و غلظت هورمون‌های مورد استفاده و یا سایر موارد همچون خصوصیات ژنتیکی کالوس‌های مربوط به هر ژنوتیپ باشد (۱۰).

تمامی نمونه‌ها، اعم از جنین‌های نابالغ و بالغ به محیط جوانه‌زنی که همان محیط کشت MS حاوی هورمون GA_3 می‌باشد (MS_{3b}) وارد شدند. اغلب نمونه‌های بدست آمده از ریزنمونه برگ لپه‌ای ژنوتیپ‌های C1211، 4-S-4، ساحل و N200 در این محیط کشت، فقط قادر به تولید تعدادی ریشه بودند. برخی نمونه‌های حاصل از ریزنمونه هیپوکوتیل در برخی ژنوتیپ‌ها، به نظر فقط افزایش حجم داده و به توده‌های سفید- کرم مایل به سبز تبدیل شدند. در بسیاری از مطالعات نشان داده شد که پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه‌های مختلف یک گیاه به هورمون در یک محیط کشت، در نتیجه اختلاف در خصوصیات ویژه درون سلولی ریزنمونه‌ها از قبیل بیان ژن و سطوح هورمون‌های درون‌زاد ریزنمونه است (۳۰،۲۸). برخی از جنین‌های سوماتیکی که در مرحله لپه‌ای بودند شروع به ریشه دهی کردند که ریشه‌های تولید شده در برخی نمونه‌ها مناسب و در برخی دیگر قابل توجه نبوده است.

در این مطالعه در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی ژنوتیپ 4-S-4 با هر دو نوع ریزنمونه (هیپوکوتیل و برگ کوتیلدون) عملکرد بهتری داشت و عکس‌العمل آن به صفات مورد بررسی (شروع کال‌زایی سریعتر، درصد

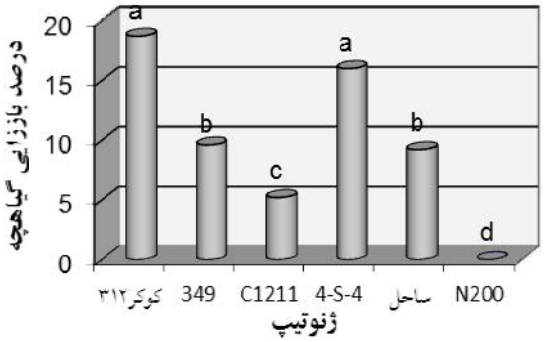
Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021

کال‌زایی بالاتر و همچنین درصد تولید کال جنین‌زای بالا) بهتر بود.

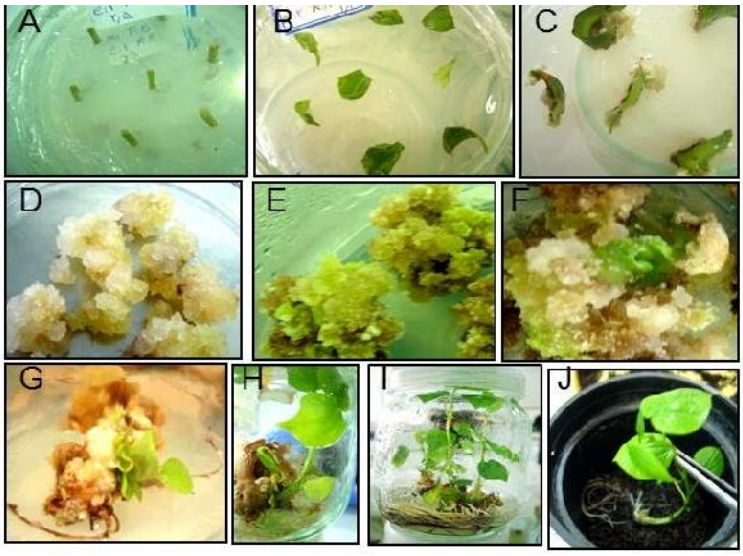
باززایی

کلیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی به جز N200 موفق به باززایی گیاهچه شدند (شکل ۲). آن دسته از گیاهچه‌هایی که ریشه‌زایی اندک داشته و یا هیچ ریشه‌ای تولید نکرده بودند، برای ریشه‌زایی به محیط کشت MSB حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA وارد شدند و در این محیط اغلب ریشه‌دار گردیدند. تحریک ریشه‌دهی در پنبه مشکل و گیاهچه‌های باززا شده آن دارای رشد کم بوده و به همین دلیل درصد باززایی پنبه خیلی پایین می‌باشد (۲۲). گروسی و همکاران (۵) نیز به دلیل ریشه‌دهی کم گیاهچه‌های باززا شده پنبه، مجبور به استفاده از روش ریزپیوندی شدند.

در این مطالعه گیاهچه‌های تولید شده‌ای که ریشه‌دهی مناسبی نداشتند، با قرار گرفتن در محیط کشت MSB حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA، تولید ریشه نموده و تعداد ریشه‌ی قابل توجهی تولید نمودند (شکل ۳).



شکل ۲- درصد باززایی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه



شکل ۳- مراحل انجام شده برای باززایی ژنوتیپ‌های پنبه از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای A: کشت ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ 4.S.4 در محیطMS_1، B: کشت ریزنمونه برگ لپه‌ای رقم کوکر ۳۱۲ در محیطMS_1، C: تحریک و شروع کالوس‌دهی ریزنمونه برگ لپه‌ای ژنوتیپ C1211، D: تکثیر کالوس جنین‌زا از ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ 4.S.4، E. شروع تولید جنین از کالوس‌های جنین زا رقم کوکر۳۱۲، F. تشکیل برگ از جنین‌های سوماتیکی ژنوتیپ 4.S.4، G. جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی ژنوتیپ 4.S.4، H. تشکیل و رشد گیاهچه حاوی ریشه در رقم کوکر ۳۱۲، I. تکثیر ریشه گیاهچه جوانه زده رقم ساحل در محیط $MSB_{rooting}$ J. انتقال گیاهچه باززا شده از محیط کشت به خاک سبک و استریل.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021

گیتا و همکاران (۷) بهترین تیمار جهت ریشه‌زایی لوبیای سودانی و همچنین یورانبی و همکاران (۲۷) بالاترین ریشه‌زایی در شبدر ایرانی را استفاده از هورمون IBA (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت MS معرفی نمودند. در این مطالعه بازرایی گیاهچه در مدت زمان ۸-۵ هفته در اغلب ژنوتیپ‌های پنبه انجام گرفت و گیاهچه‌های حاوی ریشه به خاک سبک و استریل منتقل (شکل ۳) و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت قرار گرفتند و جهت حفظ رطوبت زیر پوشش شفاف نگهداری شدند.

بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه، ژنوتیپ 4-S-4 با هر دو نوع ریزنمونه (هیپوکوتیل و برگ کوتیلدون) عملکرد بهتری داشت و عکس‌العمل آن به صفات مورد بررسی (شروع کال‌زایی سریعتر، درصد کال‌زایی بالاتر و همچنین درصد تولید کال جنین‌زای بالا) از رقم کوکر ۳۱۲ که تاکنون بهترین پاسخ را به مطالعات کشت بافتی پنبه نشان داده است، نیز بهتر بود. هرچند روش بکار رفته در این مطالعه برای تحریک جنین‌زایی و جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی، مشابه مطالعات قبلی باز هم منجر به میزان بازرایی گیاهچه نسبتاً کمی شد، ولی برخلاف مطالعات مشابه گذشته همچون گروسی و همکاران (۵) که گیاهچه بازرا شده در مدت زمان ۱۱-۸ ماه تولید شده بود، در این روش بازرایی گیاهچه در مدت زمان ۸-۵ ماه انجام شد و برخلاف مطالعات گذشته که بیشترین بازرایی را کوکر و ارقام وابسته کوکر داشتند، در این تحقیق ژنوتیپ 4-S-4 نیز از نظر میزان بازرایی اختلاف معنی‌داری با کوکر ۳۱۲ نشان نداد، همچنین در این تحقیق اغلب گیاهچه‌های تولید شده‌ای که ریشه‌دهی مناسب نداشتند، با قرار گرفتن در محیط کشت MSB حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون IBA، ($MSB_{rooting}$) ریشه‌های قابل توجهی تولید نمودند. لذا می‌توان این محیط کشت را محیط کشت مناسب برای ریشه‌زایی پنبه، معرفی نمود، این در حالی است که در مطالعات گذشته پنبه، ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های پنبه یکی از مشکلات اصلی برای بازرایی گیاهچه ذکر شده است.

منابع

1. Davidonis, G.H. and R.H. Hamilton. 1983. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. Plant Science Letters. 32: 89-93.
2. Efe, L. 2005. Callus formation and plant regeneration from two cotton species (*Gossypium hirsutum* L. and *G. barbadense* L.). Pakistan Journal of Botany. 37: 227-236.
3. Finer, J.J. 1988. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports. 7: 399-402.
4. Firoozabady, E., D.L. DeBoer, D.J. Merlo, E.L. Halk, L.N. Amerson, K.E. Rashka and E.E. Murray. 1987. Transformation of cotton by Agrobacterium and regeneration of transgenic plants. Plant Mol. Biotechnology. 1: 105-116.
5. Garousi, S.H., M. Tohidfar, K. Kazemi Tabar, H. Rahimian and G.h. Nematzadeh. 2007. Somatic embryogenesis in three cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. Iranian J of Agricultuer Science. 9: 302-314. (In Persian)
6. Gawel, N.J. and C.D. Robacker. 1990. Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semisolid versus liquid proliferation media. Plant Cell Tissue Organ Culture. 23: 201-204.
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: 1036-1041.
8. Ghasemi, M., A. Majd, F. Fallahian and K. Ghasemi Bezdi. 2011. Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (*Gossypium* Spp.) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis. African Journal of Biotechnology. 10: 2915-2922. (In Persian)
9. Ikram-ul-Haq. 2005. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology. 4: 206-209.
10. Karami, A., A. Deljo and A. Mahmodi Por. 2008. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in *Dianthus caryophyllus* L. Journal of Agriculture Science and Nature Resource. 12: 11-17. (In Persian)
11. Kim, S. and S. Kim. 2002. Effect of Nitrogen Source on Cell Growth and Anthocyanin Production in Callus and Cell Suspension Culture of 'Sheridan' Grapes. Journal of Plant Biotechnology. 4: 83-89.
12. Kirby, E.G., T. Leustek and M.S. Lee. 1987. Nitrogen nutrition. *In:* Bonga JM, DJ Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry. 1: 237 pp. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
13. Mishra, R., H.Wang, N.R. Yadav and T.A. Wilkins. 2003. Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa)-a step towards genotype-independent regeneration. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 73: 21-35.
14. Naz, S., A. Ali, F.A. Siddique and J. Iqbal. 2007. Multiple shoot formation from different explants of chick pea (*Cicer arietinum* L.), Pakistan Journal of Botany. 39: 2067-2073.
15. Ozeki, Y. and A. Komamine. 1981. Induction of anthocyanin synthesis in relation to embryogenesis in a carrot suspension culture: Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. Plant Physiol. 53: 570-577.
16. Ozyigit, I.I. 2009. *In vitro* shoot development from three different nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj-Napoca. 37: 74-78.
17. Ozyigit, I.I., N. Gozukirmizi. 2008. High efficiency shoots and root formation from cotyledonary nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Pakistan Journal of Botany. 40: 1665-1672.

18. Price, H.J. and R.H. Smith. 1979. Somatic embryogenesis in suspension culture of Gossypium klotzschiaanum Anderss. Planta, 145: 305-307.
19. Rao, A.Q., H. Syed Sarfraz, S. Shahzad, Y. Abbas Bokhari, A.R. Allah Rakha, A. Shahid, Z. Saleem, H. Tayyab and S. Riazuddin. 2006. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium Spp.)*. Journal of Zhejiang Univercity Science B. 7: 291-298.
20. Rastegary, J. and Z. Hosseini Nejad. 1998. Callus produce and cell culture in four cotton cultivars in suspension media. The5th Iranian Congress of Crop Sciences. (In Persian)
21. Rauf, S., H. Ur-Rahman and T.M. Khan. 2004. Effect of kinetin on multiple shoot induction in cotton *(Gossypium hirsutum* L.) cv. NIAB-999. Iranian Journal of Biotechnology. 2: 279-282.
22. Shengwei, Z.h. and S. Jingsan. 2000. Rapid plant regeneration from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Chinese Science Bulletin. 45: 1771-1774.
23. Shoemaker, R.C., L.J. Couche and D.W. Galbraith. 1986. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports. 5: 178-181.
24. Tan, X.L., Y.O. Qi and Y. Chen. 1988. Effect of explant source and culturl coudition on Plant regeneration in G. gossipioides (ulbrich) standley. Genettic Science, 81-85.
25. Tohidfar, M., M. Mohammadi and B. Ghareyazie. 2005. *Agrobacterium*- mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 83: 83-96. (In Persian)
26. Trolinder, N.L. and J.R. Goodin. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Gossypium hirsutum L. Plant Cell Reports. 6: 231-234.
27. 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.
28. Wang, L., B. Huang, M. He and S. Hao. 1990. Somatic embryogenesis and its hormonal regulators in tissue culture of freesia refracta. Annals of Botany. 65: 271-276.
29. Wang, Y.X., X.F. Wang, G.Y. Zhang and G.Y. Han. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from two recalcitrant genotypes of Gossypium hirsutum L. Agricultural Sciences in China. 5: 323-329.
30. Williamse, E.G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. Annals of Botany. 57: 443-462.
31. Zhang, B.H., R. Feng, F. Liu and Q. Wang. 2001. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 42: 9-16.
32. Zhang, W., M. Seki and S. Furusaki. 1998. Anthocyanin synthesis, growth and nutrient uptake in suspension cultures of strawberry cells. Journal of Fermentation and Bioengineering, 86: 72-78.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021

Plant Regeneration from 6 Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genotypes Through Somatic Embryogenesis

Leila Fahmideh[1], Gholam Ali Ranjbar[2], Omran Alishah[3] and Nad Ali Babaeian Jelodar[4]

1- Assistant Professor, Zabol University
2 and 4- Associate and Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: L.fahmideh@uoz.ac.ir)
3- Assistant Professor, Cotton Research Institute, Gorgan,
Received: October 14, 2014 Accepted: December 22, 2014

Abstract

Optimization of regeneration methods in cotton is necessary to improve and successful production of transgenic cotton cultivars by tissue culture techniques. Present study was conducted to determine the callus induction and plant regeneration of cotton genotypes through *In vitro* culture and this carried out using hypocotyl and cotyledon explants from 7-14 day-old. For callus induction the explants were cultured on MS_1 medium using a factorial experiment based on completely randomized design with three replications and supplemented with a combination of auxin and cytokinin hormones for 10 weeks. Cultures were incubated at 28±2ºC under a light intensity of approximately 2000 lux with 16/8 light/dark photoperiod for callus induction. For embryogenesis, embryogenic calli were transferred on a hormone-free MS medium supplemented with NH_4NO_3 and KNo_3. Although, KNO_3 is less efficient for somatic embryo induction but it was the best for embryo maturation. For germination of somatic embryos all produced embryogenic calli were cultured on a MS medium supplemented with GA_3. Genotype 4-S-4 was better than the other genotypes with both kinds of explants (hypocotyl and cotyledon) in callus initiation, callus induction and embryogenic callus production.

Keywords: Plantlet regeneration, Cotyledon, Cotton, Somatic Embryogenesis, Hypocotyl

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 11:36 +0430 on Friday June 18th 2021