

جنین زایی سوماتیکی در سه رقم پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) Somatic embryogenesis in three cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars

شاهرخ گروس، مسعود توح، کمال کاظمی تبار، حشمت الله رحبان و قربانعلی نعمت زاده

چکیده

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

در انتقال ژن به پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) وجود سیستم کشت بافت بهینه به منظور باززایی گیاه از یک سلول تراریخت ضروری است. ی 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 برای کالوس دهی به محیط کشت های MSB (نمک های MS و ویتامین های B₅) همراه با 2,4-D (mg l^{-1})، کوکر (mg l^{-1}) و کلرید منیزیم (mg l^{-1}) / گرم در لیتر و MS به اضافه کوکر (mg l^{-1}) و IBA (mg l^{-1}) در محیط کشت دارای 2,4-D و کیتین ریزنمونه های ارقام کوکر 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 منیزیم (mg l^{-1}) و نترات پتاسیم (mg l^{-1}) انتقال دادند. درصد کالوس های جنینی رقم کوکر بیشتر از ساحل بود. جوانه زنی جنین های سوماتیکی در محیط جوانه زنی MSB همراه با زآئین (mg l^{-1}) و ذغال فعال (mg l^{-1}) در ارقام کوکر و ورامین سریعتر از ساحل بود. تعداد جنین های سوماتیکی تولید شده رقم کوکر بیشتر از ساحل بود. تفاوت درصد ریشه دهی بین رقم کوکر و ساحل در کشت باززایی وجود ندارد.

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

تاریخ دریافت: //

-استاد دانشگاه مازندران
-دانشیار دانشگاه مازندران

-کارشناس ارشد بیوتکنولوژی (مکاتبه کننده)
- عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
-استادیار دانشگاه مازندران

تعدادی از صفات مهم زراعی بوده و موتانت های دارای خصوصیات مطلوب می توانند در برنامه های اصلاحی تجاری مورد استفاده قرار (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 نکردید. دیویدونیس و همیلتون (Davidonis and Hamilton, 1983) اولین باززایی از طریق جنین زایی سوماتیکی را از کالوس های دو ساله رقم کوکر گزارش کردند. بعد از آن پیشرفت قابل ملاحظه ای در کشت بافت پنبه گزارش (Zhang and Feng, 1992; Zhang, 1994b) با استفاده

از راهکارهای سوماتیکی در آزمایشگاه های متعدد تولد (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.*, 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 اکروباکتریوم و تفنگک ژنی با جدا کشت های محور زیر لپه ای و لپه ها مورد استفاده قرار گرفت.

یاهی 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 (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

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 میلیون نفر در دنیا وابسته به آن (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 پلاسما 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 ژنتیک

استفاده بهینه از نهاده های کشاورزی، افزایش پایداری تولید با کاهش صدمات سالهای خشکسالی زنده و غیر زنده و پیشرفت های اقتصادی، اجتماع و کاهش فقر مفرط در کشورهای در حال توسعه می (James, 2003; Satyavathi *et al.*, 2002).

انتقال ژن به گیاهان توسط سیستم اکروباکتریوم، مباران ذره ای و سایر روش ها نیازمند سیستم کشت بافت بهینه برای باززایی گیاه از یک سلول تراریخت می . بت 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 دومین مزیت مهم جنین زایی

سوماتیکی، احتمال تک سلولی بودن منشا گیاهچه تولید شده و کاهش وقوع پدیده نامطلوب شیمیری می باشد (Sakhanokho *et al.*, 2001). بن پنبه های سوماکلونال تولید شده دارای کارایی مورد انتظار برای

دمای - درجه سانتی گراد و دوره نوری ،
 با شدت نور لوکس برای محیط کشت اول و
 لوکس برای محیط کشت ZSW-2 قرار گرفتند.
 واکشت ها در محیط کشت اول هر روز یکبار و در
 محیط کشت دوم هر روز یکبار انجام گردید.
 آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.
 در این بررسی سه تیمار (سه رقم پنبه) هر کدام دارای
 تکرار (نری دیش) بودند و هر تکرار دارای ریزنمونه
 بود. شمارش درصد کالوس دهی 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 های هفته ای -
 جنین زایی و بلوغ جنین ها (MS به اضافه
 ویتامین های گروه B₅، کلرید منیزیم / گرم در لیتر،
 نیترات پتاسیم / گرم در لیتر، گلوکز ' درصد، فیتاژل
 / درصد و pH= 5.8) (Tohidfar et al., 2005)
 . واکشت ها هر 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
 $Y_1 = \sqrt{Y_2}$ استفاده استفاده شد (یزدی صمدی و
 همکاران، .).

جوانه زنی جنین های سوماتیکی

کالوس های جنینی ' هفته بعد از جنین زایی
 سوماتیکی به محیط کشت جوانه زنی جنین های
 (MS اضافه ویتامین های گروه B₅،
 ز آتین / mg l⁻¹)، ذغال فعال (gl⁻¹)
 ساکارز ' درصد، فیتاژل / درصد و pH = 5.8
 . واکشت ها هر روز یکبار انجام شد
 (Zahng et al., 2001b). برای تبدیل داده های مربوط به

(Kumria et al., 2003). پژوهشگران با بهینه سازی
 کشت به ویژه تغیر نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد
 توانسته اند میزان وابستگی باززایی
 ژنوتیپ را کاهش دهند.
 در حاضر پتانسیل باززایی ارقام پنبه کشت
 شده در ایران در محیط کشت های مختلف توسط جنین
 زایی سوماتیکی مورد ارزی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مواد گ

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

و کشت بذور

بذور، بعد از ضدعفونی (گروپ و همکاران،)
 در محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) که
 حاوی ' درصد ساکارز و ' / درصد آگار بود کشت
 شدند و به مدت ' روز در اتاقک رشد در دمای
 - درجه سانتی گراد و دوره نوری ،
 شدت نور لوکس قرار گرفتند
 (Zhang et al., 2000).

تحریک و شروع کالوس دهی

ی محور ز - ی
 روزه پنبه (به طول تقری (در دو محیط
 کشت کالوس دهی شامل - MS اضافه
 بواینوزیتول (mg l⁻¹)، بکوته ک اسب (mg l⁻¹)
 پیریدوکسین (mg l⁻¹) (mg l⁻¹)
 (D-2,4 / mg l⁻¹)، ک (/ mg l⁻¹) / گرم در
 لیتر کلرید منیزیم، گرم در لیتر گلوکز و فیتاژل
 (/ gl⁻¹) pH= 5.8 همراه با استوس. بنکون
 (Tohidfar et al., 2005) و (μM)
 (Shengwai and Jingsan, 2000) ZSW-2 MS
 اضافه ک (/ mg l⁻¹) IBA (/ mg l⁻¹)
 گرم در لیتر، آگار آگار (/ gl⁻¹) pH = 6.2

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

باززایی

گیاهچه ها برای ریشه زایی به محیط کشت MS به اضافه ویتامین های گروه B₅، زاتین (/ mg l⁻¹) IAA (/ mg l⁻¹) و ساکارز ' درصد (Zahng et al., 2001b) منتقل شدند ولی به علت باززایی ای شدن بعضی جنین ها و حضور طولانی مدت در محیط کشت، از محیط های باززایی و ریشه زایی زیر نیز استفاده گردید. MS حاوی قندها و (میوانوزیتول (/ mg l⁻¹) نیکوتینیک اسید (/ mg l⁻¹)، پیریدوکسین (/ mg l⁻¹)، ساکارز ' درصد و فیتازل / گرم در لیتر (Zapata et al., 1998) MS - پایه به اضافه ویتامین های گروه B₅ و ساکارز درصد ' MS - پایه به اضافه ویتامین های گروه B₅ ساکارز ' درصد و ذغال فعال / درصد (Gould and Magallanes - Cedenedo., 1998)

برای ارزی درصد ریشه دهی از طرح آزما کاملاً تصادفی تکرار و با هر تکرار استفاده شده و ریشه دهی ارقام در هر محب کشت و نیز ریشه دهی رقم در بط کشت بطور (آزما) ارزی همه ارقام در یک زمان دارای باهچه باززا شده نبودند. برای بل داده های درصد ریشه دهی از رابطه $Y_2 = \log Y_1$ استفاده شد. بعد از بررسی بط کشت ها از محب کشت MS پایه به اضافه ویتامین های گروه B₅ رز درصد و فرو بردن ته گیاهچه ها در (/ mg l⁻¹) IBA و در (/ mg l⁻¹) NAA و همچنین ر (Micrografting) استفاده شد. گیاهچه های ریشه دار شده برای سازگار شدن به خاک استریل (تورب: ورمیکولایت: :) در دمای درجه سانتی گراد و دوره نوری ساعتی زیر پوشش شفاف جهت حفظ رطوبت منتقل شدند. آبیاری

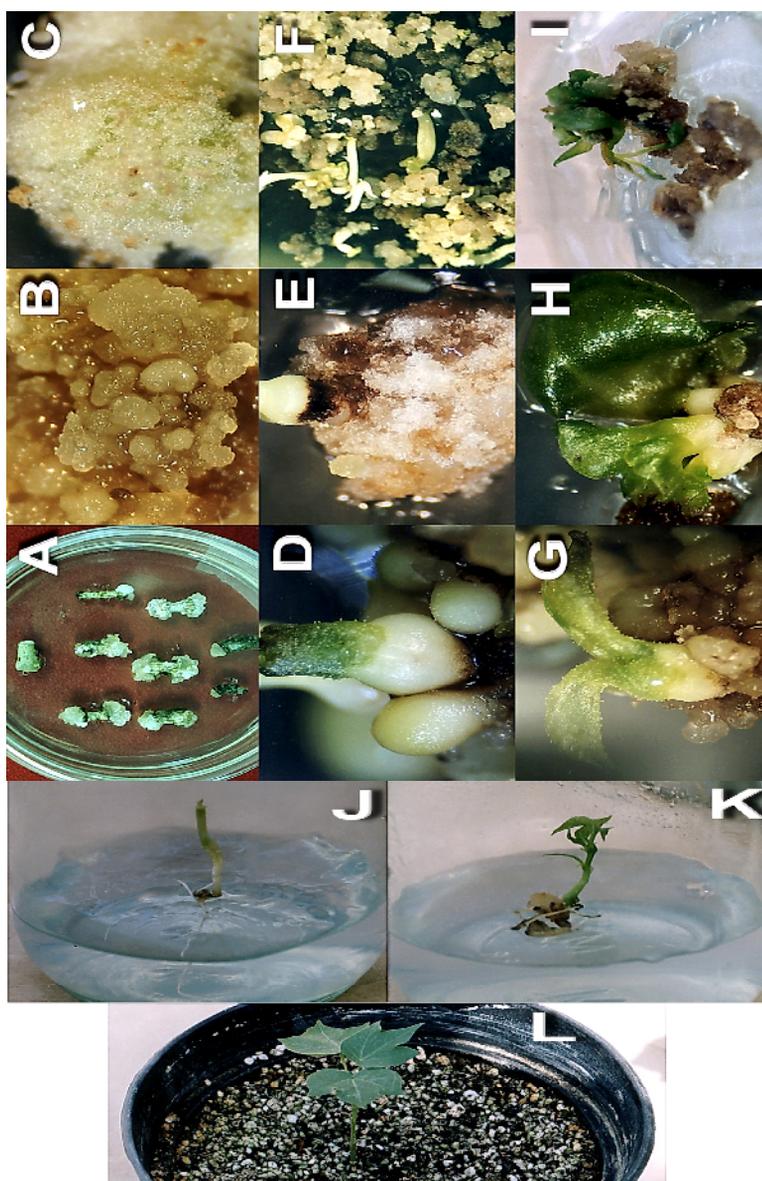
گیاهچه ها به ترتیب به صورت اسپری با اب استریل و آبیاری با محلول MS / MS / MS در طی اول انجام شد.

و بحث

تولید کالوس های بن 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 - روز شروع به کالوس دهی کردند. زمان شروع کالوس دهی در ارقام کوکر و ساحل زودتر از ورامین بود (جدول). در مجموع ' درصد کل ریزنمونه های سه رقم کالوس دادند. درصد کالوس دهی نیز در بین ارقام مختلف، متفاوت بوده و رقم ساحل (A-) نسبت به رقم ورامین برتری داشت. ارقام 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 و شل که دارای رنگ کرم خاکستری و ترد و شکننده و با رشد سریعتر بودند به کالوس های جنینی تبدیل شدند (B -) کالوس هایی که متراکم و فشرده به رنگ سفید، سبز تیره یا قهوه ای و دارای رشد کمتری بودند کالوس جنینی تولید نکردند (C -). در محیط کشت تحریک جنین زایی در ارقام کوکر و ورامین به / و / درصد از کالوس های سفید پنبه ای متراکم (E -) جنین زا شدند. تعدادی از کالوس های غیر جنینی (سفید و متراکم،) شروع به ریشه دهی کردند. نتایج از مون t (جدول) نشان داد رقم کوکر (/)



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

رفع این مشکل از ذغال فعال به میزان گرم در لیتر استفاده گردید و زمان واكشت ها کوتاهتر شد. پدیده کم سابقه ای که در پتری د. ی دارای کالوس های که در ابتدای آزمایش از کالوس های جدا شده بودند مشاهده شد. زا. از کالوس های سبز غیر جنینی بدون عبور از مرحله جنین زایی بود. دو کالوس از ارقام کوکر و ساحل به ترتیب هر کدام ' و 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 (mg l⁻¹) استفاده گردید (Zhang et al., 2001b). در این محیط کشت برخی از جنین های سوماتیکی که در مراحل نیشه ای و کوتیلدونی بودند شروع به

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

تمایز و جنین های سوما

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 (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 کوکر و ورامین زودتر از ساحل بود. بن رقم کوکر تعداد جنین ی بک ی بد کرد (جدول ').

در محیط جوانه زنی تعدادی از جنین های سوماتیکی بعد از چند واكشت قهوه ای شده و از بین رفتند. برای

جدول - 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	10.7a ± 2.80	75.8ab	12.6a ± 2.58
Sahel		10.9a ± 2.83	88.3a	11.9a ± 2.44
Varamin	ورامین	12.8b ± 2.69	57.0b	7.7b ± 2.58

در هر ستون، که دارای حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال % 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 - آزمون t برای سه 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	مقدار t مقدار t' t or t' values	احتمال Probability Level	
Coker versus Varmin	با ورامین	-0.033	0.9763 ^{ns}
Coker versus Sahel		2.491	0.0189*
Varamin versus Sahel	ورامین یا ساحل	1.967	0.0585 ^{ns}

*=Significant at the 5%, probability level

ns=Non-significant

*:معنی دار در سطح احتمال %

ns: غیر معنی دار

جدول ۱ - مقایسه میانگین زمان شروع جوانه زنی سوماتیکی و متوسط تعداد جنین‌زایی 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 سوماتیکی (روز)	تعداد جنین‌زایی
Cultivars	ارقام	Initiation of germination in somatic embryos (day)	Avarag of somatic embryo no.
Coker 312	کوکر	23.1a ± 4.58	198.7a ± 23.42
Varamin	ورامین	31.6a ± 3.29	81.7ab ± 10.17
Sahel		191.4b ± 9.60	42.0b ± 6.20

در هر ستون، که دارای حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌دار 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

کردند (K-). این جنین‌ها، جنین‌های ثانویه‌ای تولید کردند که از آنها گیاهچه‌های عادی حاصل شد. برای حل مشکل ریشه‌دهی و باززایی کشت ریشه‌دهی و باززایی (بخش باززا). مواد و روش‌ها) د. بز مورد ارزی قرار گرفت و اختلاف درصد ریشه‌دهی در بین ارقام و محبت کشت‌های دار نبود (جدول).

با این تیمارها مشخص شد که ریشه‌دهی در پنبه به صورت گرفته و ممکن است وابسته به ژنوتیپ در نهایت برای ریشه‌دار کردن از محیط کشت زاپاتا و همکاران (Zapata et al., 1998) استفاده شد ولی قبل از کشت، انتهای جنین‌ها در محلول غلیظ ایندول بوتیریک اسید (IBA) (mg l⁻¹) و نفتالن استیک اسید (NAA) (mg l⁻¹) مدت ثانیه تیمار شدند (J-).

ریشه‌دهی کردند. در مواردی، گیاهچه‌ها که ابتدا ریشه‌دهی دادند، تشکیل ساقه‌چه با تاخیر زیاد و رشد بسیار کند همراه بود و یا اصلاً شاخساره‌ای حاصل نشد. در این حالت ریشه‌های اولیه قهوه‌ای شده و گیاهچه‌ها ظاهر غیر عادی داشته و باززا نشدند (I-). ریشه‌دهی در سه رقم پنبه به وسیله دارای بز و توسعه کام نبود.

هنگامی که کالوس‌های جنینی به محیط باززایی انتقال یافتند. علیرغم این که تمایز و تبدیل جنین‌های سوماتیکی به خوبی صورت گرفت اما ریشه‌دهی جنین‌هایی که در مرحله نیزه‌ای و کوتیلدون‌ی بودند قابل توجه نبود (جدول). در محیط کشت مذکور نه تنها ریشه‌دهی و باززایی به خوبی صورت نگرفت و جنین‌ها بیشتر در مرحله کوتیلدون‌ی بدون تمایز باقی ماندند، بلکه تعدادی از جنین‌های سوماتیکی شروع به کالوس‌دهی

جدول ۲ - درصد جنین‌های ریشه‌دار شده در سه رقم پنبه و چهار محیط کشت ریشه‌دهی و باززا.

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

Culture media	Cultivars ارقام		
	کوکر	Sahel	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-Cedeno, 1998)	11.6a	nd	12.5a
M4 (Zhang et al., 2001b)	4.3a	nd	0.0a

در هر ستون، دارای حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار 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

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 مشابه نتایج لیلواثی 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 بدست آورند.

با وجود اینکه رقم ساحل حجم کالوس بالاتری از ورامین داشته و همراه با رقم کوکر در یک سطح قرار گرفته بود ولی کمترین درصد تولید کالوس جنینی را در بین سه رقم داشت. این ویژگی هنگامی با ارزش باشد که با صفت تولید کالوس های جنینی

همبستگی مثبت داشته باشد. مثلا رقم کوکر 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

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) زودتر از ساحل شروع به کالوس دهی کرده بود.

در این بررسی مشخص شد که درصد کالوس دهی ژنتیک - 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 با 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 دستیابی به جنین های سوماتیکی بیشتر شده و احتمال تولید گیاهان تراریخت نیز افزایش

ه 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 زاتین (mg l^{-1} - mg l^{-1}) / و ریزنمونه های لپه، محور زیر لپه و ریشه استفاده کردند میزان تولید کالوس در همه ریز نمونه ها درصد نبود ولی وقتی از 2,4-D (mg l^{-1}) / همراه با زاتین (mg l^{-1}) / استفاده کردند، میزان تولید کالوس در همه ریزنمونه ها درصد بود که نشان دهنده تاثیر مطلوب 2,4-D در تولید کالوس می . 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. شنکوی و جینگسان (Shengwai and Jingsan, 2000) استفاده از کینتین و IBA در پنبه رقم Xinluzao کالوسهایی تولید کردند که

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 فاصلد 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 باززا شده دارای رشد کم بوده و درصد باززایی خیلی پائین می باشد (Shengwai and Jingsan, 2000). در این بررسی وجود ارزط کشت های متعدد، ریشه دهم توجه نبود و به همین دلیل از رطوبت استفاده شد.

سپاسگزاری

از سرکار خانم ها مهندس لبلا رمضانپور و مهندس برای همکاری در اجرای از طرح سپاسگزاری شود.

جنین های سوماتیکی مفید نمی باشد و فقط جنین هایی که در مرحله اخر 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) که برای جوانه زنی ی بک پنبه از محیط کشت بدون کربن استفاده کردند میزان جوانه زنی ی بک (%) و باززا حداکثر بود با افزایش مقدار کربن درصد جوانه زنی ی بک و درصد باززا کاهش بطوری که در حداکثر مقدار کربن (mg/L) درصد جوانه زنی ی بک حداقل (. %) و میزان باززا صفر بود.

در این بررسی زاتین جهت تحریک جوانه زنی سوماتیکی موثر واقع شد ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2001b) پی دست یافته اند. غلظت کم زاتین (/ mgL) عامل کلیدی در تحریک کالوس جنینی بوده و محیط کشت بدون هورمون برای جوانه زنی جنین های سوماتیکی کفایت (Zhang et al., 2001b).

در بررسی حاضر فاصله زمانی زیادی در جوانه زنی جنین های سوماتیکی رقم ساحل نسبت به دو رقم د مشاهده شد. این تاخیر ممکن است به دلیل جنین زایی

References

منابع مورد استفاده

- گروس ش، م. دفر، ح. رحبان، ک. کاظم تبار و ق. نعمت زاده. بررسی پتانسیل باززایی مستقیم از کشت نوک ساقه در سه رقم پنبه. مجله دانش کشاورزی. () : - .
- یزدی صمدی، ب. ع. رضائی، و م. ولی زاده. طرحهای آماری در پژوهشهای کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران.

- 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.

- 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-Cedeno. 1998.** Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-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. 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.
- 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. Industrial University 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 hirsutum* L.). African J. Biotech. 3:169-173.
- Price, H. J. and R. H. Smith. 1979.** Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzschianum* Anderss. Planta. 145: 305-307.
- Rajasekaran K. 1996.** Regeneration of plants from cryopreserved embryogenic cell suspension and callus cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* 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.

- 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.

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.

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

Garousi, Sh¹., M. Touhidfar² K. Kazemi Tabar³, H. Rahimian⁴ and Gh. Nematzadeh⁵

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 MgCl₂; 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 MgCl₂ and 1.9 g/l KNO₃. 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.