

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

شاهرخ گروس^۱، مسعود توح^۲، کمال کاظمی تبار^۳، حشمت الله رحمان^۴ و قربانعلی نعمت زاده^۵

چکیده

گروسی، ش.، م.، مسعود توح، ک.، کاظمی تبار، ح. رحیمیان، ق. نعمت زاده. جنین زایی سوماتیکی در سه رقم پنبه (*Gossypium hirsutum* L.). مجله علوم زراعی ایران. ۱۱ (۱): ۱۳۸۸-۱۳۹۳.

در انتقال ژن به پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) وجود سیستم کشت بافت بهینه به منظور باززایی گیاه از یک سلول تراریخت ضروری است. در این مطالعه، ریزنمونه های محور زیر لپه ارقام ساحل، ورامین و کوکر برای کالوس دهی به محب^۱ کشت های MSB (نمک های MS و ویتامین های B₅) همراه با 2,4-D (0.1 mg/l)، ک^۲ (0.1 mg/l) و کلرید منیزیم 0.1 mg/l گرم در لیتر و MS به اضافه ک^۳ (0.1 mg/l) و IBA (0.1 mg/l) در محیط کشت دارای 2,4-D و کیتین ریزنمونه های ارقام کوکر^۴ 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 (0.1 mg/l) و نیترات پتاسیم (0.1 g/l) انتقال^۵ درصد کالوس های جنینی رقم کوکر^۶ بیشتر از ساحل بود. جوانه زنی جنین های سوماتیکی در محیط جوانه زنی MSB همراه با ژآ^۷ (0.1 mg/l) و ذغال فعال (0.1 g/l) در ارقام کوکر^۸ و ورامین سریعتر از ساحل بود. تعداد جنین های سوماتیکی تولید شده رقم ک^۹ بیشتر از ساحل بود. تفاوت درصد ریشه دهی^{۱۰} در بین سه رقم و در کشت باززا^{۱۱} دار نبود.

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

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۰۵/۰۵

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی (مکاتبه کننده)

۲- عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

۳- استادیار دانشگاه مازندران

۴- استاد دانشگاه مازندران

۵- دانشیار دانشگاه مازندران

چکیده

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 ۵۰۰ میلیون نفر در دنیا وابسته به آن است (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 بیماری ها 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، افزایش پایداری ژن های 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 اکروباکتریوم، مباران ذره ای و سایر روش ها نیازمند سیستم کشت بافت بهینه برای باززایی گیاه از یک سلول تراریخت می باشد. 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 سهولت می توان به دست آورد. 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). 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 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 شد (Zhang and Feng, 1992; Zhang, 1994b). از راهکارهای اصلاحی سوماتیکی در آزمایشگاه های متعدد تولید شده است (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)، بساتک (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 تغنک ژنی با جداکشت های محور زیر لپه ای و لپه ها مورد استفاده قرار گرفت.

لیاهی است که باززایی بیشتر ژنوتیپ های تجاری آن از طریق جنین زایی سوماتیکی یا سوسپانسون سلولی، نسبت به سایر گیاهان مشکل و قابل اتکا نیست. ان توسط جنین زایی سوماتیکی به مقدار زیادی وابسته به ژنوتیپ است (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.

11

گیاهچه ها به ترتیب به صورت اسپری با آب استریل و آبیاری با محلول MS / ۱۰۰ MS و MS در طی ۱۰ روز اول انجام شد.

۲.۱.۱. و بحث

تولید کالوس های بن زرا

جداکشت های محور زیر لپه در محیط کشت کالوس دهی دوم (ZSW-2) بعد از گذشت چند ماه و چند بار واكشت، واكنش 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 ۱۰-۱۵ روز شروع به کالوس دهی کردند. زمان شروع کالوس دهی در ارقام کوکر ۱۰۰ و ساحل زودتر از ورامین بود (جدول ۱). در مجموع ۱۰۰٪ درصد کل ریزنمونه های سه رقم کالوس دادند. درصد کالوس دهی نیز در بین ارقام مختلف، متفاوت بوده و رقم ساحل (A-۱۰۰) نسبت به رقم ورامین برتری داشت. ارقام ۱۰۰ و ساحل حجم کالوس بیشتری نسبت به رقم ورامین تولید کردند.

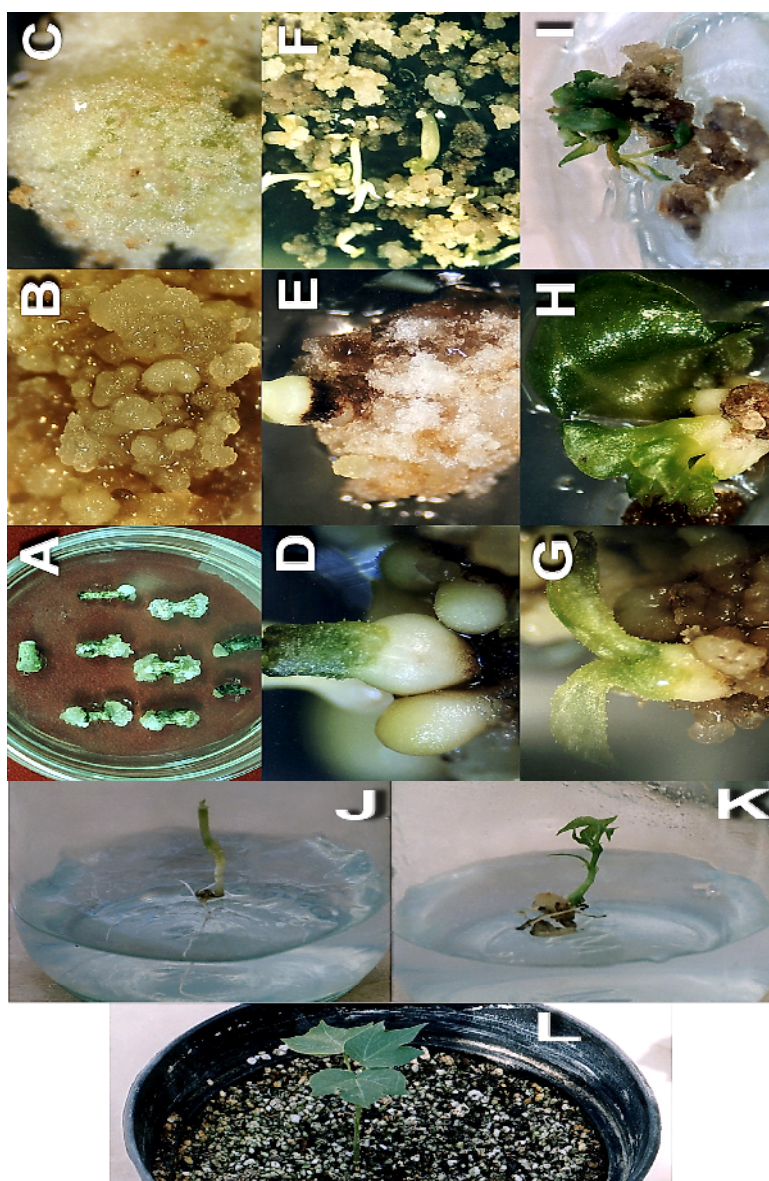
کالوس ها بر اساس رنگ و کیفیت به دو گروه کالوس های جنینی و غیر جنینی تقسیم بندی شدند. کالوس های دانه دار و شل که دارای رنگ کرم خاکستری و ترد و شکننده و با رشد سریعت بودند به کالوس های جنینی تبدیل شدند (B-۱۰۰) و کالوس هایی که متراکم و فشرده به رنگ سفید، سبز تیره یا قهوه ای و دارای رشد کمتری بودند کالوس جنینی تولید نکردند (C-۱۰۰). در محیط کشت تحریک جنین زایی در ارقام کوکر ۱۰۰ و ورامین به ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ درصد از کالوس های سفید پنبه ای متراکم (E-۱۰۰) جنین زایش شدند. ۱۰۰٪ تعدادی از کالوس های غیر جنینی (سفید و متراکم، شروع به ریشه دهی کردند. نتایج آزمون t (جدول ۱) نشان داد رقم کوکر ۱۰۰ (۱۰۰٪ / ۱۰۰٪)

تعداد جنین های سوماتیکی از رابطه $Y_1 = \sqrt{Y_2}$ استفاده شد (یزدی صمدی و همکاران، ۱۳۹۳).

باززایی

گیاهچه ها برای ریشه زایی به محیط کشت MS ۱۰۰ به اضافه ویتامین های گروه B₅، زاتین (۱۰^{-۵} mg/l) IAA (۱۰^{-۵} mg/l) و ساکارز ۵ درصد (Zahng et al., 2001b) منتقل شدند ولی به علت باززایی ۱۰۰٪ ای شدن بعضی جنین ها و حضور طولانی مدت در محیط کشت، از محیط های باززایی و ریشه زایی زیر نیز استفاده گردید. ۱۰۰٪ - ۱۰۰٪ MS حاوی قندها و ۱۰۰٪ (میواینوزیتول (۱۰^{-۵} mg/l) نیکوتینیک اسید (۱۰^{-۵} mg/l)، پیریدوکسین (۱۰^{-۵} mg/l) و ساکارز ۵ درصد و فیتاژل ۱۰ گرم در لیتر (Zapata et al., 1998) MS-۱۰۰ پایه به اضافه ویتامین های گروه B₅ و ساکارز ۵ درصد MS-۱۰۰ پایه به اضافه ویتامین های گروه B₅ ساکارز ۵ درصد و ذغال فعال ۱۰ درصد (Gould and Magallanes - Cedenedo., 1998)

برای ارزیابی درصد ریشه دهی از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی ۱۰۰٪ تکرار و با ۱۰۰٪ تکرار هر تکرار استفاده شده و ریشه دهی ارقام در هر محب کشت و نیز ریشه دهی ۱۰۰٪ رقم در ۱۰۰٪ محیط کشت بطور ۱۰۰٪ (آزمایش) ارزیابی شد. ۱۰۰٪ همه ارقام در ۱۰۰٪ زمان دارای گیاهچه باززایی شده بودند. برای ۱۰۰٪ داده های درصد ریشه دهی از رابطه $Y_2 = \log Y_1$ استفاده شد. بعد از بررسی ۱۰۰٪ محیط کشت ها از محب کشت MS پایه به اضافه ویتامین های گروه B₅ ۱۰۰٪ درصد و فرو بردن ته گیاهچه ها در IBA (۱۰^{-۵} mg/l) ودر NAA (۱۰^{-۵} mg/l) و همچنین ۱۰۰٪ (Micrografting) استفاده شد. گیاهچه های ریشه دار شده برای سازگار شدن به خاک استریل (تورب: ورمیکولايت: ۱:۱:۱) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۶ ساعته زیر پوشش شفاف جهت حفظ رطوبت منتقل شدند. آبیاری



□ □ □ □ - 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 □ □ □ □ □ □ □ □ E- تولید جنین از کالوس غیر جنین زا در رقم ورامین، F- تکامل جنین ها در رقم کوکر □ □ □ □ □ □ G- برگ در جنین های سوماتیکی پنبه در رقم ورامین، H- □ □ □ □ □ های سوماتیکی جوانه زده رقم کوکر □ □ □ □ در مرحله کوتیلدون، 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 ۱ گرم در لیتر استفاده گردید و زمان واکشت ها کوتاهتر شد.

پدیده کم سابقه ای که در پتری دیش های دارای کالوس های *Varamin* که در ابتدای آزمایش از کالوس های *Sahel* جدا شده بودند مشاهده شد. زایل شدن کالوس های سبز غیر جنینی بدون عبور از مرحله جنین زایی بود. دو کالوس از ارقام کوکر ۳۱۲ و ساحل به ترتیب هر کدام ۱ و ۱ شاخساره تولید کردند که خیلی غیر عادی بودند و باززائ شدند (شکل ۱- E).

باززایی گیاه

برای باززایی جنین های سوماتیکی از محیط کشت جوانه زنی جنین های سوماتیکی به اضافه IAA (1 mg/l) استفاده گردید (Zhang et al., 2001b). در این محیط کشت برخی از جنین های سوماتیکی که در مراحل نیه ای و کوتیلدونی بودند شروع به

در تولید کالوس جنین زا برتر از ساحل (*Sahel*) بود. رقم کوکر ۳۱۲ 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 (*D* - *S*). 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 ۳۱۲ و ورامین زودتر از ساحل بود. بین رقم کوکر ۳۱۲ تعداد جنین های *Varamin* و *Sahel* 1 mg/l IAA (جدول ۱).

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

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

در هر ستون با 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	مقدار t t or t' values	احتمال Probability Level
Coker versus Varmin	-0.033	0.9763 ^{ns}
Coker versus Sahel	2.491	0.0189*
Varamin versus Sahel	1.967	0.0585 ^{ns}

*=Significant at the 5%, probability level

ns=Non-significant

*معنی دار در سطح احتمال ۱٪

ns: غیر معنی دار

جدول ۳- مقایسه میانگین زمان شروع جوانه زنی جنین سوماتیک و متوسط تعداد جنین های سوماتیک در 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	Initiation of germination in somatic embryos (day)	Avarag of somatic embryo no.
Coker 312	کوکر ۳۱۲	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

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- χ^2). این جنین ها، جنین های ثانویه ای تولید کردند که از آنها گیاهچه های عادی حاصل شد. برای حل مشکل ریشه دهی و باززایی جنین کشت ریشه دهی و باززایی (بخش باززایی) مواد و روش ها) در این مورد ارزش قرار گرفت و اختلاف درصد ریشه دهی در بین ارقام و محب کشت های سوماتیک دار نبود (جدول ۳).

با این تیمارها مشخص شد که ریشه دهی در پنبه به 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) ($mg l^{-1}$) و نفتالن استیک اسید (NAA) ($mg l^{-1}$) مدت ۲۴ ثانیه تیمار شدند (J- χ^2).

ریشه دهی کردند. در مواردی، گیاهچه ها 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 (I- χ^2). ریشه های سوماتیک شده دارای ریشه و توسعه کاملاً نبود.

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 کوتیلدون بودنی بودند قابل توجه نبود (جدول ۴). در محیط کشت مذکور نه تنها ریشه دهی و باززایی به خوبی صورت نگرفت و جنین ها بیشتر در مرحله کوتیلدون بدون تمایز باقی ماندند، بلکه تعدادی از جنین های سوماتیکی شروع به کالوس دهی

جدول ۴- 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	Cultivars ارقام		
	کوکر ۳۱۲	ساحل	ورامین
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

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

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 را 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.

نقش رشد 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 اکسین کشت ها به هر دو نیاز دارند. ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2001b) وقتی از زاتین (1 mg/l - 1 mg/l) و ریزنمونه های لپه، محور زیر لپه و ریشه استفاده کردند میزان تولید کالوس در همه ریزنمونه ها 1 mg/l درصد نبود ولی وقتی از 2,4-D (1 mg/l) همراه با زاتین (1 mg/l) استفاده کردند، میزان تولید کالوس در همه ریزنمونه ها 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. شنکوی و جینگسان (Shengwai and Jingsan, 2000) استفاده از کینتین و IBA در پنبه رقم Xinluzao کالوسهایی تولید کردند که

جنین را و غیر جنین را 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 کینتین کالوسهای بسیار ترد از ریزنمونه 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 می باشد که با صفت تولید کالوس های جنینی همبستگی مثبت داشته باشد. مثلاً رقم کوکر 1 mg/l 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

دیر رقم ساحل باشد. به علاوه رقم ساحل کمترین درصد کالوس جنین 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 باززا^۱ شده دارای رشد کم بوده و درصد باززایی خیلی پائین می باشد (Shengwai and Jingsan, 2000). در این بررسی^۲ وجود ارزش^۳ لط^۴ کشت های متعدد، ریشه ده^۵ توجه نبود و به همین دلیل از ر^۶ ای استفاده شد.

سپاسگزاری

از سرکار خانم ها مهندس لبتا رمضانپور و مهندس مهندس^۷ برای همکاری در اجرای^۸ از طرح سپاسگزاری^۹ شود.

جنین های سوماتیکی مفید نمی باشد و فقط جنین هایی که در مرحله آخر نیزه ای و یا در مرحله کوتیلدون^{۱۰} هستند قادرند جوانه زده و به گیاه کامل تبدیل شوند (Zhang et al., 2000). ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2000) که برای جوانه زنب^{۱۱} ای^{۱۲} پنبه از محیط کشت بدون ک^{۱۳} استفاده کردند میزان جوانه زنب^{۱۴} ای^{۱۵} (۰.۰۰۰۰۰۰) و باززا^{۱۶} حداکثر بود با افزایش مقدار ک^{۱۷} درصد جوانه زنب^{۱۸} ای^{۱۹} و درصد باززا^{۲۰} کاهش^{۲۱} بطوری که در حداکثر مقدار ک^{۲۲} (۰.۰۰ mg/L) درصد جوانه زنب^{۲۳} ای^{۲۴} حداقل^{۲۵} (۰.۰۰%) و م^{۲۶} باززا^{۲۷} صفر بود.

در این بررسی^{۲۸} زاتین جهت تحریک جوانه زنی سوماتیکی موثر واقع شد ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2001b) که^{۲۹} یافته اند. غلظت کم زاتین^{۳۰} (۰.۰۰ mg/L) عامل کلیدی در تحریک کالوس جنینی بوده و محیط کشت بدون هورمون برای جوانه زنی جنین های سوماتیکی کفایت^{۳۱} (Zhang et al., 2001b).

در بررسی حاضر فاصله زمانی زیادی در جوانه زنی جنین های سوماتیکی رقم ساحل نسبت به دو رقم د^{۳۲} مشاهده شد. این تاخیر ممکن است به دلیل^{۳۳} جنین زایی

References

- منابع مورد استفاده
- گروس^{۳۴} ش^{۳۵}، م. ^{۳۶} دفر^{۳۷}، ح. رح^{۳۸} بان^{۳۹}، ک. کاظم^{۴۰} تبار و ق. نعمت زاده^{۴۱}. بررسی پتانسیل باززایی مستقیم از کشت نوک ساقه در سه رقم پنبه. مجله دانش کشاورزی. ^{۴۲} (۰): ۰۰۰ - ۰۰۰.
- یزدی صمدی^{۴۳}، ب. ع. رضائی^{۴۴}، و م. ولی زاده^{۴۵}. ^{۴۶} طرحهای آماری در پژوهشهای کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران. ^{۴۷} ۰۰۰ ۰۰۰.
- 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.