بهینه‌سازی باززایی گیاه پنبه از طریق مریستم انتهایی

میترا محمدی بازرگانی[1]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[2]، عبدالمجید رضایی[1] و سیروس قبادی[3]

چکیده

بهینه‌سازی باززایی گیاه پنبه برای دو رقم ساحل و ورامین با استفاده از مریستم انتهایی با هدف انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم صورت گرفت. در این بررسی مریستم انتهایی از گیاهچه‌های ۴ تا ۵ روزه دو رقم جدا گردید و در محیط ویژه ساقه زایی (Murashige & Skoog, MS) تغییر یافتهٔ بدون تنظیم‌کننده رشد) قرار داده شدند. پس از ۲- ۱/۵ ماه مریستم‌هایی که تولید ساقه و برگ نمودند به منظور ریشه‌زایی در یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار ریشه‌زایی: ۱ـ MS تغییر یافته بدون تنظیم کننده رشد ۲ـ MS ۱/۲ به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA)(Indole-3-butyric Acid)، ۳ـ MS ۱/۲ به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) (a-Naphtaleneacetic Acid) و ۴ـ MS ۱/۲ به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) (Indoleacetic Acid) در چهار تکرار ارزیابی شدند.

پس از ۲- ۱/۵ ماه تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که بهترین محیط ریشه‌زایی برای دو رقم ساحل و ورامین محیط حاوی تنظیم‌کننده رشد IBA است. هم‌چنین نتایج بیانگر آن بود که ریشه‌زایی رقم ورامین بهتر از رقم ساحل می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *پنبه، مریستم انتهایی، باززایی*

مقدمه

پنبه یکی از مهم‌ترین و قدیمی‌ترین گیاهان لیفی می‌باشد که از نظر اقتصادی و تجارتی دارای اهمیت فوق العاده‌ای است هرچند که رقابت الیاف مصنوعی با پنبه موجب شده که این گیاه اهمیت نسبی خود را از دست بدهد ولی با این وجود، مصرف جهانی و سطح زیر کشت آن افزایش یافته است و هم‌چنین جزء مهم‌ترین و پر مصرف‌ترین الیاف صنعتی بوده است (۱). از جمله عواملی که باعث کاهش خصوصیات کیفی و کمی پنبه می‌گردد می‌توان به خسارت ناشی از آفات، بیماری‌ها، تنش‌های محیطی و علف‌های هرز اشاره کرد. با توجه به اهمیت این نبات و افزایش سطح زیر کشت آن در ایران، برای بهبود کیفیت، کمیت، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و هم‌چنین به منظور کاهش مصرف سموم و علف کش‌ها، نیاز به اصلاح پنبه ضروری به نظر می رسد.

اگرچه اخیراً موفقیت‌های بزرگی به منظور تولید واریته‌های اصلاح شده پنبه از طریق روش‌های مرسوم اصلاح نباتات

۱. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. دانشیار بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳. مربی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]

حاصل شده است، ولی این روش‌ها بسیار زمان‌بر می‌باشد و حدود ۶ الی ۱۰ سال برای تولید یک واریته پنبه زمان لازم می‌باشد، بنابراین به دلیل محدودیت‌های روش‌های اصلاحی سنتی، استفاده از تکنیک‌های بیوتکنولوژی از جمله کشت بافت و سلول گیاهی می تواند راه‌کاری را در جهت تسریع بخشیدن به جنبه‌های اصلاحی باشد. علاوه بر آن کشت بافت و سلول گیاه مقدمه‌ای برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک محسوب می‌گردد. بنابراین قبل از انتقال ژن یا ژن‌های مطلوب بهینه سازی باززایی گیاه پنبه یک شرط اساسی می‌باشد. تا کنون از روش‌های مختلف کشت بافت در گیاه پنبه استفاده شده است از جمله جنین زایی سوماتیکی، کشت تخمک، کشت پرتوپلاست و کشت مریستم (۹،۱۱،۱۲و۱۸).

در روش کشت جنین زایی سوماتیکی جنین‌های بدنی به‌دلیل شباهت بسیار زیادی که به جنین‌های جنسی دارند و طبیعت خاصی که دارا می‌باشند، از قابلیت خوبی برای تبدیل به یک گیاه کامل برخوردارند. در روش جنین زایی سوماتیکی از عواملی که در تشکیل کالوس و باززایی مؤثر هستند می‌توان به اثر ژنوتیپ، نوع ریز نمونه و محیط کشت اشاره کرد، که در این میان ژنوتیپ نقش بسیار مهمی در باززایی دارد، زیرا بسیاری از ارقام پنبه از نظر کالوس دهی و باززایی دارای محدودیت می‌باشند و فقط ارقام کوکر از باززایی وکالوس دهی نسبتاً بالایی برخوردار هستند. در بررسی‌هایی که توسط فیروزآبادی و همکاران روی ارقام مختلف پنبه صورت گرفته تولید جنین‌های سوماتیکی و باززایی در رقم کوکر سریع‌تر و با فراوانی بالایی گزارش شده است(۳). هم‌چنین گزارش‌های مشابه دیگری توسط نیک و همکاران (۱۹۹۰)، نورما و همکاران (۱۹۸۹) و کومار و همکاران (۱۹۹۸) ارائه گردید، که همگی اثر ژنوتیپ را بر روی کالوس دهی و باززایی تأیید می‌کردند (۳، ۱۵،۱۶ و ۱۹). بنابراین انتقال ژن به سایر ژنوتیپ‌های مورد نظر با استفاده از این روش، نخست از طریق تراریزش لاین‌های کوکر و متعاقباً تلاقی برگشتی با ژنوتیپ مورد نظر انجام می‌گیرد و با توجه به این‌که تراریزش لاین کوکر و به‌دست آوردن گیاهان تراریخت حدوداً ۱۰ الی ۱۶ سال به طول می‌انجامد، روش جنین زایی سوماتیکی بسیار وقت‌گیر می‌باشد(۷)، هم‌چنین درصدی از گیاهان حاصل از جنین‌های بدنی بعضی مواقع عقیم می‌باشند و یا تنوع سوماکلونی نشان می‌دهند (۳،۱۸و۲۲) علاوه بر محدودیت ژنوتیپی فراوانی موتاسیون با استفاده از این روش زیاد است(۸). روش باززایی از طریق کشت تخمک بیشتر با هدف بررسی و بهبود الیاف پنبه و تلاقی بین گونه‌ای می‌باشد و برای انتقال ژن کاربردی ندارد(۱۲). هم‌چنین روش کشت پرتوپلاست برای به‌دست آوردن هیبریدهای سوماتیکی مناسب است(۹).

در پنبه تا سال ۱۹۹۷ به‌طور عمده‌ای از جنین زایی سوماتیکی حاصل از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل استفاده می‌شده است ولی اخیراً کشت مریستم انتهایی جایگزین روش جنین زایی سوماتیکی شده است (۲، ۶،۷و۱۷). روش کشت مریستم انتهایی به دلیل این‌که منجر به باززایی مستقیم ساقه می‌گردد تحت عنوان روش باززایی مستقیم ساقه نیز استفاده می‌شود. اولین گزارش‌ها برای باززایی پنبه به روش مریستم انتهایی توسط گلد و اسمیت به سال ۱۹۸۸ بر می‌گردد (۴). ولی هیچ گیاه باززا شده‌ای گزارش نشد. گلد و همکاران (۱۹۹۱) توانستند مشکل باززایی پنبه از طریق جنین زایی سوماتیکی را که وابسته به ژنوتیپ بود، با کشت مریستم پنبه رفع کنند (۵). روش باززایی مستقیم ساقه از طریق مریستم انتهایی از لحاظ زمانی بسیار کوتاه‌تر از روش جنین‌زایی سوماتیکی است زیرا در آن مرحله کالوس دهی حذف می‌شود و مستقیماً تولید ساقه و سپس ریشه می‌نماید(۲۳) و از نظر عدم وابستگی به ژنوتیپ بهتر از روش جنین‌زایی سوماتیکی است(۲۱). هم‌چنین فراوانی تنوع سوماکلونی و موتاسیون در آن بسیار پایین می‌باشد که یکی از دلایل آن عدم وجود مرحله تشکیل کالوس و کشت جنین‌های بدنی است(۷) و روش بسیار مناسبی برای به‌دست آوردن گیاهان عاری از ویروس می‌باشد(۱۳) و به دلیل چنین مزایایی نسبت به روش جنین زایی سوماتیکی دارای برتری است.

بنابراین با توجه به اهمیت کشت مریستم در گیاه پنبه این پژوهش به‌منظور بهینه‌سازی باززایی گیاه پنبه در دو رقم

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]

تجارتی ساحل و ورامین از طریق مریستم انتهایی با هدف انتقال ژن صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

ضد عفونی بذور

بذرهای دو رقم ساحل و ورامین، مورد نیاز این پژوهش، از مرکز تحقیقات پنبه گرگان و ورامین تهیه گردیدند. قبل از جوانه‌زنی، بذرها به مدت۲ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر گندزدایی سطحی و سپس ۲ تا ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در ادامه ضدعفونی بذرها با الکل اتیلیک ۹۰ درصد به مدت ۱۰ ثانیه تیمار و مجدداً ۲ تا ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از شستشو، بذرها با کاغذ واتمن استریل خشک شدند و در مراحل بعدی آزمایش‌ها، مورد استفاده قرار گرفتند.

جوانه‌زنی بذور

پس از ضد عفونی تعداد ۳ بذر در لوله های آزمایشی حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط پایه MS جوانه زنی (۱۴) برای مدت ۴ تا ۵ روز و در تاریکی مطلق و دمای ۲۸ ^{o}C قرار داده شدند (شکل۱a).

جداسازی مریستم و شرایط کشت

جداسازی مریستم از گیاهچه‌های ۴ تا ۵ روزه با بینی کولر به دو روش صورت گرفت:

الف) روش یولین(Ulian)

دراین روش نخست به وسیله سوزن سرنگ انسولین دو برگ لپه‌ای (کوتیلدون)(Cotyledon) کنار زده وحذف گردیدند، سپس دو برگ اولیه (پریموردیا)(Primordia) حذف و در نهایت خود مریستم به تنهایی جداگردید (۲۰).(شکل۱a، ۱b و ۱c)

ب) روش گلد

در این روش هم مشابه روش قبل برگ‌های لپه‌ای حذف و بعد از آن یکی از دو برگ اولیه (پریموردیا) حذف گردید و مریستم به همراه یک پریموردیا جدا شد زیرا پریموردیا تنظیم کننده رشدها و یا دیگر عوامل مؤثر در رشد وتوسعه مریستم را فراهم می‌کند(۱۸).

مریستم‌های جدا سازی شده به هر دو روش در محیط ساقه‌دهی (MS۱) :(محیط پایه MS به همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مایواینوزیتول(Myo-Inositol)، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نیکوتینیک اسید، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پیرودوکسین (Pyrodoxin)، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تیامین(Thiamin)، ساکارز ۳ درصد و فیتاژل ۲/۵ درصد با pH ۵/۷) به مدت ۱/۵-۲ ماه در درجه حرارت ^{o}C ۲± ۲۵ در دوره روشنایی ۱۶ ساعته و رطوبت ۳۷ درصد نگه‌داری شد (۲۱).

بهینه‌سازی ریشه‌زایی

مریستم‌هایی که بعد از ۲ـ ۱/۵ ماه تولید ساقه و برگ نمودند برای ریشه‌زایی در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار ریشه‌زایی به شرح زیر در ۴ تکرار به مدت ۲- ۱/۵ ماه قرار داده شدند (شکل٤، جدول ۱).

۱. MS تغییر یافته بدون تنظیم‌کننده رشد (MS۱)

۲. MS_1 $\frac{1}{2}$ به همراه ۰/۱ میلی‌گرم تنظیم کننده رشد IBA، ۳ درصد ساکارز، ۲/۵ درصد فیتاژل ($MS_۲$)

۳. MS۱ $\frac{1}{2}$ به همراه ۰/۱ میلی‌گرم تنظیم کننده رشد NAA، ۳ درصد ساکارز، ۲/۵ درصد فیتاژل ($MS_۳$)

۴. MS۱ $\frac{1}{2}$ به همراه ۰/۱ میلی‌گرم تنظیم کننده رشد IAA، ۳ درصد ساکارز، ۲/۵ درصد فیتاژل ($MS_٤$)

انتقال گیاهچه‌های باززایی شده به گلدان

بعد از ۲ـ ۱/۵ ماه گیاهچه‌هایی که ریشه دار شدند به گلدان‌های حاوی ترکیب مساوی حجمی از شن، ماسه و ورمیکولایت منتقل شدند(شکل۵).

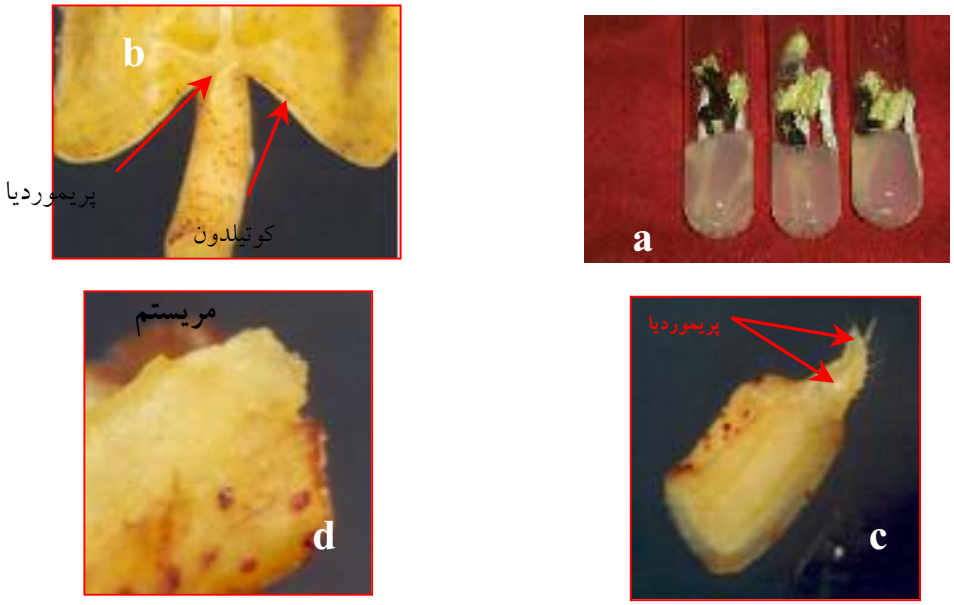
اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل‌های آماری

درصد ساقه‌دهی برای مریستم‌هایی که به دو روش جداسازی گردیده بودند مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفت (جدول ۲).

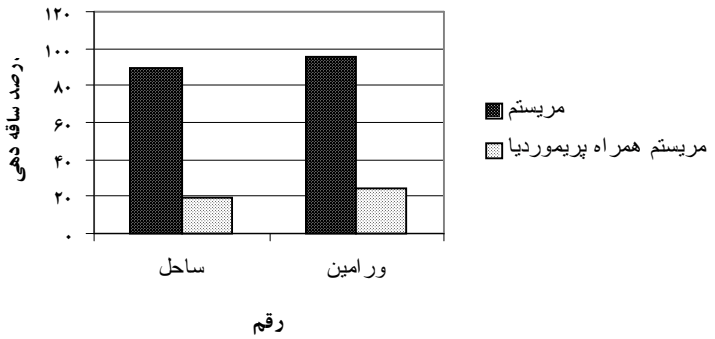
درصد ریشه‌زایی به عنوان ملاکی برای بررسی ریشه‌زایی انتخاب گردید و کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت (جدول۳).

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]



شکل ۱. مراحل جداسازی مریستم از گیاهچه های پنبه: a) گیاهچه ۴ تا ۵ روزه b) مرحله جداسازی برگ اولیه c) مریستم انتهایی پنبه به همراه پریموردیا بعد از جداسازی برگ‌های اولیه d) مریستم انتهایی پنبه بعد از جداسازی پریموردیا



شکل ۲. مقایسه درصد ساقه‌دهی دو ریز نمونه در دو رقم

جدول ۱. دستورالعمل استفاده شده برای بهینه‌سازی باززایی

مرحله	محیط کشت	ترکیب محیط کشت	مدت زمان
جوانه‌زنی بذر	MSB	MS پایه+ ۳ درصد ساکارز+ ۰/۸ درصد آگار	۴ تا ۵ روز
ساقه‌دهی	MS_1	MSپایه+ مایواینوزیتول ۱۰۰ میلی گرم درلیتر+ نیکوتینیک اسید ۰/۵ میلی گرم درلیتر+ پیرودوکسین ۰/۵ میلی گرم در لیتر+ تیامین ۰/۵ میلی گرم درلیتر ساکارز ۳ درصد و فیتاژل ۲/۵ درصد	۱/۵ - ۲ ماه
ریشه‌دهی	MS_1		
	MS_2	$\frac{1}{2}$ MS_1 + ۰/۱ میلی گرم درلیتر IBA	۱/۵ - ۲ ماه
		$\frac{1}{2}$ MS_1 + ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA	
	MS_3 MS_4	$\frac{1}{2}$ MS_1 + ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA	

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]

جدول ۲. جدول تجزیه واریانس ارقام ساحل و ورامین در محیط کشت‌های مختلف

منابع تغییر(SOV)	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات (MS)
رقم	۱	۹/۸۳*
محیط کشت	۲	۵۳/۸۷**
رقم×محیط کشت	۳	۰/۵۸

جدول ۳. مقایسه میانگین‌های درصد ریشه‌دهی محیط‌های مختلف کشت

میانگین	محیط کشت
٤٣/٥٥ a	IBA
٣٣/٧٤ a	محیط بدون تنظیم‌کننده رشد
٦/٣٥ b	IAA
٠/٩ b	NAA

نتایج و بحث

جداسازی مریستم و شرایط کشت

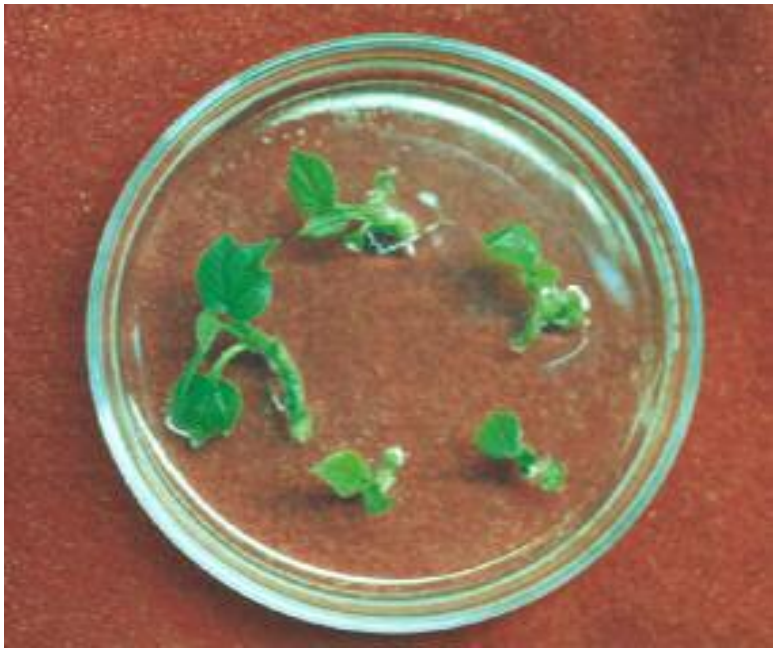
از دو نوع جداکشت مورد استفاده برای قراردادن در محیط ساقه‌دهی، جداکشت‌هایی که تنها از مریستم بدون پریموردیا با اندازه حدود ۰/۵ الی ۱ میلی مترو از گیاهچه‌های ۴ تا ۵ روزه تهیه شده بودند، بیشترین درصد ساقه‌دهی را داشتند (شکل۲). گیاهچه‌های به‌دست آمده مطلوب و دارای فرم طبیعی بودند، (شکل ۳ الف) و در مقایسه با روش گلد و همکاران (۱۹۹۸) که حدود یک هفته بعد از کشت، پریموردیا را از مریستم جدا کرده بود، درصد ساقه‌دهی بیشتری دیده شد(۵). درصد ساقه‌دهی در مریستم‌هایی که به همراه پریموردیا بودند بسیار پایین بود و گیاهچه‌های غیر طبیعی و نامطلوب ایجاد کردند (شکل ۳ ب). بنابراین به نظر می‌رسد که همراه بودن پریموردیا با مریستم نه تنها تأثیری در ساقه‌دهی ندارد بلکه باعث ایجاد گیاهچه‌های غیر مطلوب وغیر طبیعی نیز می‌شود. یکی دیگر از عوامل مؤثر در میزان ساقه‌دهی مطلوب و ایجاد گیاهچه‌های طبیعی ترکیب محیط کشت برای ساقه‌دهی می‌باشد. محققین در این زمینه ایده‌های متفاوتی دارند. بعضی از آنها معتقدند که مریستم خاصیت القا کننده ساقه را داراست، بنابراین استفاده از تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت ساقه‌دهی ضرورتی ندارد و بیشترین میزان ساقه‌دهی را در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده رشد حدود ۵۸ درصد گزارش کردند(۲۱). در صورتی که در پژوهش دیگر معتقد هستند که میزان تنظیم کننده رشد یکی از فاکتورهای مؤثر در ساقه‌دهی جداکشت‌هاست و در بررسی‌های خود مشاهده کردند که غلظت پایینی از سیتوکنین (کمتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر) در باززایی مستقیم و ساقه‌دهی مؤثر می‌باشد، بنابراین استفاده از تنظیم کننده‌های رشد از جمله (BAP) با غلظت کم (کمتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر) در محیط کشت ساقه‌دهی را پیشنهاد می‌کنند (۱۸). نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که برای دو رقم ساحل و ورامین، محیط ساقه‌دهی بدون تنظیم کننده رشد برای ساقه‌دهی جداکشت مریستم بسیار مطلوب می‌باشد، و میزان ساقه‌دهی برای ارقام ساحل و ورامین به ترتیب ۹۰ درصد و ۹۶ درصد دیده شد (شکل۲)، که این میزان مشاهده شده از میزانی که توسط زاپاتا و همکاران (۱۹۹۹) گزارش شده بود (۵۸ درصد) بیشتر است. به هر حال در این بررسی با توجه به درصد ساقه‌دهی برای دو رقم ساحل و ورامین، اختلاف معنی‌داری از نظر دو ژنوتیپ دیده نشد.

بهینه‌سازی ریشه‌زایی

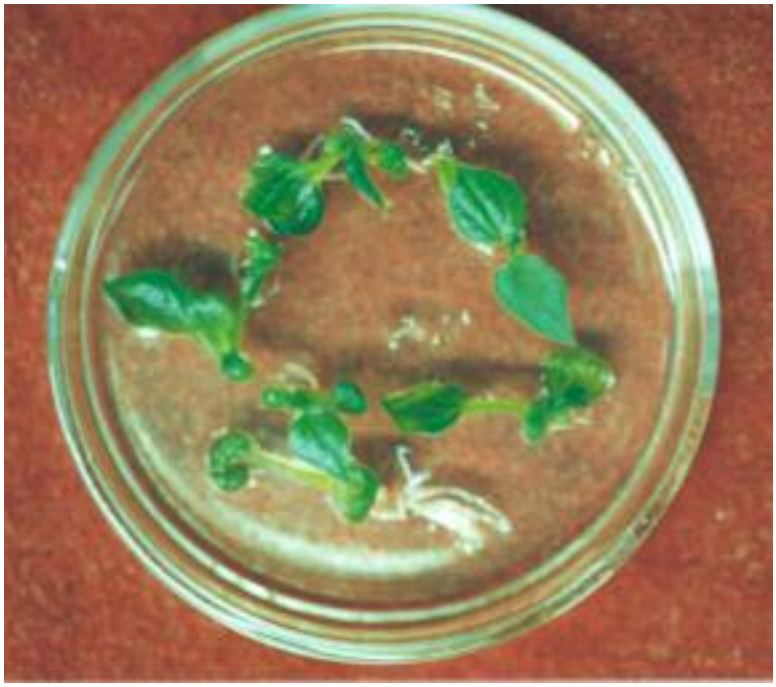
از بین مریستم‌های کشت شده در محیط ساقه‌دهی، تعداد ۱۶۰ مریستم از ارقام ساحل و ورامین که گیاهچه‌های طبیعی و مطلوب تولید کردند به ۴ نوع محیط کشت ریشه‌زایی منتقل و تعداد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده یادداشت برداری شدند. تجزیه واریانس در ۱۶۰ گیاهچه از ارقام ساحل و ورامین در طرح فاکتوریل ۲×۴ با پایه کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۵ نمونه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین محیط های کشت ریشه‌زایی وجود دارد ولی هیچ‌گونه اثر معنی‌داری بین رقم و محیط های کشت ریشه‌زایی دیده نشد (جدول۲). این نتیجه تأییدی بر

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]



شکل۳ الف.گیاهچه‌های باززا شده از مریستم ۴۵روز بعد از کشت در محیط ساقه دهی



شکل۳ ب.گیاهچه‌های باززاشده از مریستم همراه پریموردیا ۴۵روز بعد از کشت در محیط ساقه دهی

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]

شکل ٤. گیاهچه های ریشه‌دار شده ۶۰ روز بعد از کشت در محیط ریشه‌زایی

شکل ۵. گیاهچه‌های باززاشده انتقال یافته به گلدان

نتایج محققین بود که اعلام نموده بودند باززایی به روش کشت مریستم وابسته به ژنوتیپ نیست ودر مورد ارقام ایرانی نیز صدق می کرد (۱۰، ۱۷و۲۱). نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که درصد ریشه‌زایی در دو رقم ساحل و ورامین در محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد IBA (MS۲) و محیط کشت بدون تنظیم کننده رشد (MS۱)به ترتیب ۶۰ درصد و ۵۰ درصد از دو محیط کشت دیگر (MS_3 و MS_4 به ترتیب صفر درصد و ۵ درصد) بیشتر بود و تفاوت معنی‌داری در درصد ریشه‌زایی بین دو محیط کشت MS_1 وMS_2 دیده نشد(جدول۳). هم‌چنین مدت زمان مورد نیاز برای ریشه‌دار شدن در محیط کشت بدون تنظیم کننده رشد حدود دو ماه ونیم بود در محیط کشت حاوی تنظیم کننده رشد IBA حدود دو ماه می‌باشد. این نتایج نشان داد که احتمالاً تنظیم کننده رشد IBA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر برای دو رقم ساحل و ورامین به‌عنوان تحریک

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]

کننده ریشه‌زایی می‌باشد، و دو تنظیم کننده رشد دیگر NAA و IAA در همان غلظت تأثیری در ریشه‌زایی ندارند.

بعضی از پژوهش‌ها در این زمینه مانند بررسی‌های انجام گرفته در مورد ساقه‌دهی مؤید استفاده از محیط کشت به همراه تنظیم کننده رشد برای ریشه‌زایی مطلوب است و مدت زمان سپری شده برای ریشه‌زایی را حدود ۵ تا ۶ هفته (۲۱) و تعدادی دیگری از بررسی‌ها حدود ۶ هفته تا ۳ ماه را گزارش کردند (۲و۷). هم‌چنین بررسی‌های انجام شده دیگری لزوم استفاده از محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ به همراه تنظیم کننده رشدهای مؤثر در ریشه‌دهی را تأکید می‌کنند، از جمله ۰/۳ میلی‌گرم درلیتر تنظیم کننده رشد IBA توسط عده ای از محققین موثر در ریشه دهی گزارش شده است و در بررسی‌های خود مشاهده کردند که در حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد از گیاهچه ها ریشه دار شدند (۱۷). هم‌چنین پژوهش‌های دیگری استفاده از محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد NAA برای ریشه دهی مطلوب حدود ۹۰ درصد را گزارش کرده اند (۲).در این بررسی در مقایسه با نتایج آگراوال و همکاران، محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA کمترین تأثیر در ریشه‌زایی را داشت(۲). هم‌چنین درصد ریشه‌زایی مشاهده شده در این غلظت (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IBA) با درصد ریشه‌زایی در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر که توسط ساتیواتی و همکاران (۲۰۰۲) (۱۷) ارائه گردید تقریباً مطابقت داشتند. از طرفی استفاده از تنظیم‌کننده رشد IBA در غلظت‌های بالاتر حدود ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر، برای دو رقم ساحل و ورامین نه تنها تأثیری در ریشه‌زایی نداشت، بلکه باعث ایجاد گیاهچه‌های غیر طبیعی می‌شد. بنابراین به نظر می‌رسد برای ریشه‌زایی دو رقم ساحل و ورامین محیط کشت حاوی۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشد IBA مطلوب است.

این بررسی با هدف انتقال ژن صورت گرفت. با توجه به این‌که فراوانی انتقال ژن نسبتاً پایین است، بالا بودن فراوانی گیاهان باززاشده طبیعی و مطلوب ضرورت می‌یابد تا در صورت موفقیت انتقال ژن به مریستم‌های ارقام مورد نظر، بتوان از آنها گیاهچه‌های تراریخته مطلوب و طبیعی با فراوانی بالا باززا کرد. نتایج حاصل از بهینه سازی باززایی ارقام تجارتی ساحل و ورامین از طریق مریستم انتهایی در این پژوهش می‌تواند برای انتقال ژن موفق در پژوهش‌های بعدی استفاده شود.

منابع مورد استفاده

۱. ناصری، ف. پنبه. ۱۳۷۴. مؤسسه چاپ وانتشار آستان قدس رضوی، مشهد.

2. Agrawal, D. C., A. K. Banerjee, R. R. Kolala, A. B. 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.
3. Firozabady, E., D. L. DeBoer. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesisin many cultivars of cotton (*Gossypium hirsurum* L.). *In Vitro* Cell Dev Biol. 29:166-173.
4. Gould, J. and R. H. Smith. 1988. Shoot tip culture as a potential transformation system. Proc BeltWide Cotton Prod, Conf Natl, Cotton Council New orleans, LA. 91P.
5. Gould, J., S. Banister, O. Hasegwa, M. Fahima and R. H. Smith. 1991. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and G. barbadense from shoot apex tissues for transformation. Plant Cell Rep. 10: 12-16.
6. Gould, J and M. Magallanes- CeDeno. 1998. A daptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium-mediated* transformation. Plant Molecular Biol. Rep.16: 1-10.
7. Hemphill, J. K., C. G. A. Maier and K. D. Chapman. 1998. Rapid *in vitro* plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep. 17:273-278.
8. Hirochika, H. 1993. Activation of tabacco regtrotransposons during tissue culture. EMBO. J. 12:251-258.
9. Kumar, S., P. Sharma and D. Penter. 1998. A genetic approach to *In vitro* regeneration of non-regeneration cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar. Plant Cell Rep. 18: 59-63.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]

10. Koonco, L., J. Dever, T. Burns, N.L. Trolinder. 1996. Progress towards genotype independent transformation. National Cotton Counicl of America, Tenn, 9-12 Jan, p1173.
11. McCabe, DE. and BJ. Martinell. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. Biotechnol. 11: 595-598.
12. McStewart, J. and C. Hsu. 1977. In ovulo embryo cultur and seedling development of cotton. (*Gossipium hirsutum L.*) Planta 137: 113-117.
13. Morel, G. and C. Martin. 1952. Guerison de Dahliad atteints d.une maladis a virus. C.R séance Acad Sci, Paris 233:1324-1325.
14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
15. Nick, J., Gawal and D. Robacker. 1990. Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotype on semi-solid versus liquid proliferatin media. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 23: 201-204
16. Norma, L., Trolinder and Xhlxlan. 1989. Genotype specificity of the somatic embryogenesis respone on cotton. Plant Cell Reports. 8: 133-136.
17. Satyavathi, V. V., V. Parssad, B. Gita Lakshmi and G. Lakshmi Sita. 2002. High effciency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens.* Plant Sci. 162: 215-223.
18. Stelly, D. M., D.W. Kohnel, T. S. Rangan and E. Commiskey. 1989. Cytogenetic abonormalities of cotton somaclones from callus cultures. Genome 32: 762-770.
19. Trolinder, N. L. and J. R. Goodin. 1987. Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*): 1- Effects of source of explant and hormone regim. Plant Cell Tissue and Organ Culture 12: 31-42.
20. Ulian, E., R. Smith, J. Gould and T. McKnight. 1988. Transformation of plants via the shoot apex. *In vitro* Cell Dev. Biol. 24: 951-954.
21. Zapata, C., S. H. Park, K. M. El-zik and R. H. Smith. 1999. Transformation of texas cotton cultivar by using Agrobacterium and the shoot apex. Theor. Appl. Genet. 98: 252-256.
22. 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.
23. Zhang, B. H., R. Feng. 1992. List of cotton tissue culture. Plant Physiol. Commun. 28: 308-314.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.2.12.5]