



بررسی میزان ریشه‌زایی و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های رقم کوکر-۳۱۲ در شرایط درون شیشه‌ای

فاطمه مرادزاده*^۱، کمال قاسمی بزدی^۲، غلامرضا بخشی خانیکی^۳

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور کرج، ایران و کارشناس مسئول آمار و

اطلاعات سازمان جهاد کشاورزی استان گلستان

۲- عضو هیات عملی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی خراسان رضوی، مشهد

۳- عضو هیات علمی دانشگاه پیام نور واحد کرج

1- Moradzadeh55@yahoo.com

2- K.ghasemi@areeo.ac.ir

3- Moradzadeh55@yahoo.com

چکیده:

پنبه که به حق طلای سفید نام گرفته بی‌اغراق یکی از قدیمی‌ترین و مهم‌ترین گیاهان لیفی به‌شمار می‌رود. الیاف پنبه دارای خصوصیات منحصر به فردی است که هیچ ماده مصنوعی نمی‌تواند با آن رقابت کند. به خاطر طبیعت ریکالسیترانت اغلب ارقام پنبه در کشت بافت، در سیستم‌های بازرایی با محدودیت مواجه است؛ در نتیجه یک سیستم بازرایی مناسب و کارآمد و همچنین رفع موانع و عوامل محدودکننده پیش روی آن جهت گسترش روش‌های مهندسی ژنتیک در پنبه ضروری است. این تحقیق که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت مؤسسه تحقیقات پنبه کشور واقع در شهرستان گرگان انجام شد؛ ریزنمونه‌های مختلف حاصل از گیاهچه‌های هفت روزه پنبه رقم کوکر-۳۱۲ بر روی محیط کشت MS حاوی ۵ ترکیب متفاوت از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی NAA و Kin در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس درصد ریشه‌زایی و شیشه‌ای شدن تحت تأثیر نوع ریزنمونه، ترکیبات هورمونی و اثرات متقابل آنها در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار شد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، محور زیر لپه و برگ لپه‌ای بالاترین ریشه‌زایی و جوانه‌انتهایی و محور زیر لپه بیشترین شیشه‌ای شدن را نشان داد. ریزنمونه محور زیرلپه در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین بیشترین عدم زنده‌مانی و شیشه‌ای شدن را نشان داد. نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی و اثرات متقابل آنها بر روی درصد آلودگی تأثیری نداشتند. این نتایج از جنبه رفع عوامل محدودکننده کشت بافت در شرایط درون شیشه‌ای، به عنوان پیش زمینه مناسب برای هدف‌های اصلاحی گیاه پنبه اهمیت دارد.

کلمات کلیدی: پنبه، کشت بافت، شیشه‌ای شدن، ریشه‌زایی، عدم زنده‌مانی، آلودگی.

۱-مقدمه:

پنبه که به حق طلای سفید نام گرفته بی‌اغراق یکی از قدیمی‌ترین و مهم‌ترین گیاهان لیفی به‌شمار می‌رود و از نظر صنعت نساجی و غذایی بسیار حائز اهمیت است. قدمت پنبه به زمان‌های بسیار دور برمی‌گردد [۱]. پنبه یکی از مهم‌ترین محصولات استراتژیک کشاورزی و صنعتی به‌شمار می‌آید که در بیش از هفتاد کشور جهان مورد کشت و کار قرار می‌گیرد [۲]. از آنجا که روش‌های معمول اصلاح نباتات قادر به کوتاه کردن مسیرهای اصلاحی نمی‌باشد و همچنین به علت فقدان تنوع ژنتیکی برای مقاومت به آفات، بیماری‌ها و سایر صفات پرارزش در پنبه روش‌های کشت درون شیشه‌ای می‌تواند زمینه مناسبی برای این منظور و انتقال ژن‌های مفید به این گیاه زراعی را فراهم آورد (شکل ۱).



شکل ۱: گیاه پنبه رقم کوکر-۳۱۲ حاصل از کشت بافت.

پنبه به عنوان یک گیاه ریکالسیترانت در سیستم‌های بازرایی به طریق درون شیشه‌ای شناخته می‌شود [۳]. و کشت بافت و بازرایی از آن دشوار بوده و درصد موفقیت به دست آمده تاکنون در بازرایی ارقام تجاری پنبه ایران خیلی بالا نبوده است. گسترش روش‌های مهندسی ژنتیک در پنبه به خاطر طبیعت ریکالسیترانت اغلب ارقام پنبه الیت در کشت بافت، با محدودیت مواجه است. یک سیستم بازرایی مناسب جهت گسترش روش‌های مهندسی ژنتیک در پنبه ضروری است [۴].

عقیده بر این است که فاکتورهای مختلفی بر روی کالوس‌زایی و بازرایی پنبه، شامل منبع ریزنمونه، انواع محیط کشت، مقادیر، انواع و ترکیبات مختلف هورمون‌ها یا تنظیم‌کننده‌های رشد، درجه حرارت، شدت نور و شرایط تاریکی و غیره تاثیر گذارند [۵،۶،۷،۸،۹].

تعدادی از پروتوکول‌های بازرایی در پنبه با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف و از طریق دست‌ورزی‌های ترکیبات مختلف محیط کشت گسترش یافته‌اند. انواع مختلفی از ریزنمونه‌ها برای ارزیابی پتانسیل بازرایی به کار برده شده‌اند، شامل محور زیر لپه، برگ لپه‌ای، ساقه، قطعات برگ، دم‌برگ، ریشه، جنین و مریستم و غیره استفاده شده است [۳،۵،۷،۸،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶] و محققان بر اساس هدف تحقیق خود، ریزنمونه مورد نظر را انتخاب می‌نمایند. تحقیقات متعددی در رابطه با کشت بافت پنبه و دیگر گیاهان در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شده است که به تعدادی از آنها اشاره می‌شود.

با وجود موفقیت‌های تجاری در پنبه‌های تراریخته، انتقال ژن* و بازرایی[□] در پنبه هنوز نسبت به گونه‌های گیاهی دیگر یک مشکل اساسی محسوب می‌شود. کارآیی جنین‌زایی سوماتیکی[□] و تنوع سوماکلونال نیز از مشکلات موجود در بازرایی پنبه می‌باشد [۱۷]. اغلب مطالعات مربوط به بازرایی‌های موفق بر روی واریته کوکر-۳۱۲ و لاین‌های وابسته به آن انجام گردیده است [۴].

Zapata و همکاران [۱۸] قطعاتی از مریستم رأس ساقه به اندازه دو تا سه میلی‌متر از ۳ رقم پنبه کوکر-۳۱۲ و Sphinex و MAR-CUBQHRPIS را در ۱۸ محیط کشت مختلف MS و نصف نمک‌های MS به اضافه ویتامین‌ها

1- Transformation
2- Regeneration
3- Somatic embryogenesis



و ترکیبی از غلظت‌های ۰/۱ و یک میلی گرم بر لیتر NAA و BA* کشت دادند. قطعات جدا کشت، بدون تولید کالوس رشد کرده، تولید ریشه و بخش هوایی نمودند و هیچ گونه اختلاف معنی داری میان ارقام زراعی مشاهده نشد. ۵۸ درصد نمونه‌ها در محیط MS کامل به اضافه ویتامین‌ها و بدون هورمون طی ۶ هفته ریشه و ساقه تولید کردند. تمامی گیاهان حالت طبیعی داشتند.

تعدادی از گونه‌های *G. hirsutum* بر روی محیط کشت پایه MS ساده با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف، بخصوص جنین‌ها و گره‌های مریستمی به گیاه کامل تبدیل می‌شوند [۱۹].

Jin و همکاران [۱۴] از محور زیر لپه ارقام YZ-1، کوکر-۳۱۲ و کوکر-۲۰۱ پنبه *G. hirsutum* بر روی محیط کشت القای کالوس MS استفاده نمودند. بر اساس نتایج آنها رقم YZ-1 پتانسیل باززایی خیلی بالایی نشان داد که حدود ۸۲ درصد اکسپلنت‌های قرار داده شده بر روی این محیط کشت در عرض ۸ تا ۱۰ هفته به کالوس‌های جنین‌زا تمایز یافتند. همچنین کالوس رقم YZ-1 به طور مشخص فراوانی باززایی گیاه را پس از واکنش‌های متوالی حفظ نمود. استرس ایجاد شده در اثر روند ترانسفورماسیون بر روی جنین‌زایی سوماتیکی تأثیر زیادی گذاشت، به طوری که رقم کوکر-۲۰۱ تقریباً قابلیت جنین‌زایی سوماتیکی و باززایی گیاه را از دست داد، ولی رقم YZ-1 حداقل کاهش تولنایی باززایی را در مقایسه با ارقام دیگر داشت.

بررسی روی گیاه یونجه (*Medicago sativa*)، بیشترین باززایی ساقه چندگانه از ریزنمونه مریستم انتهایی در محیط پایه MS به همراه ۰/۰۵ میلی گرم بر لیتر NAA در ترکیب با ۱/۵ میلی گرم بر لیتر TDZ بود [۲۰].

باززایی شاخساره یونجه (*M. sativa L.*) با استفاده از ریزنمونه گره ساقه، در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی گرم بر لیتر TDZ به همراه ۳ میلی گرم بر لیتر $AgNO_3$ و ریشه‌زایی گیاهچه‌ها در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی گرم بر لیتر NAA در ترکیب با ۱ میلی گرم بر لیتر IBA گزارش شده است [۲۱].

کشت درون شیشه‌ای دو رقم کلزا با ریزنمونه‌های لپه‌ای (کوتیلدون) نشان داده که محیط MS با غلظت ۳/۵ میلی گرم بر لیتر BAP بیشترین باززایی را دارد ولی با افزایش غلظت BAP میزان کالوس‌زایی در انتهای دمبرگ افزایش یافته است [۲۲].

ریزنمونه‌های نوک ساقه توت فرنگی در محیط کشت MS تغییر یافته دارای ۲ میلی گرم بر لیتر BAP و ۲ میلی گرم بر لیتر IAA بیشترین میزان باززایی را داشتند [۲۳].

با توجه به اینکه موفقیت در بسیاری از زمینه‌های بیوتکنولوژی پنبه، مبتنی بر کشت بافت و یک سیستم باززایی کارآمد و همچنین رفع موانع پیش روی آن بوده، لذا به دست آوردن این دانش و عوامل محدودکننده آن برای توسعه روش‌های جدید کشت بافت از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است.

ریشه‌زایی: معمولاً ریزنمونه‌هایی که در ابتدا تولید ریشه می‌کنند به تیمارهای تولید ساقه به سختی جواب می‌دهند، پس تولید ریشه ریزنمونه‌ها در ابتدا بر روی محیط کشت یک صفت نامطلوب از نظر باززایی می‌باشد و باید آن را به حداقل برسانیم.

آلودگی: اساساً چهار منبع آلودگی وجود دارد: گیاه (آلودگی داخلی و خارجی)، محیط کشت (به اندازه کافی ضدعفونی نشده باشد)، هوا و عدم دقت محقق. مهم‌ترین این‌ها، خود گیاه است که مواد گیاهی بایستی به خوبی قبل از قرار گرفتن در محیط کشت، ضدعفونی شوند. ممکن است آلودگی داخلی و یا خارجی مثل: بی‌دقتی در کار (نشستن دست‌ها،

۴- 6-Benzyl Amino Purine (BA)



استفاده نکردن از ماسک و دستکش و...)، ضدعفونی نکردن میز کار با الکل ۹۶ درصد، استریل نبودن چاقو، پنس، پتری دیش‌ها، ورقه‌های درپوش، محیط کشت، کثیف بودن لباس کار و غیره باشد.

شیشه‌ای شدن*: شیشه‌ای شدن یک ناهنجاری فیزیولوژیکی است در نتیجه آن برگ‌ها پهن، ضخیم و نیمه شفاف شده و به حالت چین خورده و شکننده در می‌آیند. این ناهنجاری به طور معمول رشد ریزنمونه‌ها یا گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۴]. بررسی‌های چندی نشان داده که شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و گیاهچه‌ها (حالت‌های نیمه شفاف و آب‌گیری زیاد بافت‌های گیاهی کشت شده در محیط کشت) در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر عامل‌های مختلف مانند ژنوتیپ گیاه مادری، غلظت و نوع آگار مورد استفاده، غلظت و نوع سیتوکینین مورد استفاده و ... قرار می‌گیرد [۲۴، ۲۵، ۲۶]. در غلظت بالای سایتوکینین‌ها، نبود رشد مناسب طولی، شیشه‌ای شدن گیاهچه‌ها [۲۷، ۲۸] و بدون ریشه‌زایی [۲۱، ۲۹] به وجود می‌آید.

عدم زنده‌مانی: عدم زنده‌مانی ریزنمونه‌های پنبه نیز صفت نامطلوب دیگری است که به حداقل رساندن آنها از نظر باززایی بسیار مهم است. پس اولین قدم در باززایی مناسب دست یافتن به کالوس‌زایی مناسب با راندمان و سرعت بالا و به حداقل رساندن عوامل محدود کننده آن می‌باشد.

۲- مواد و روشها:

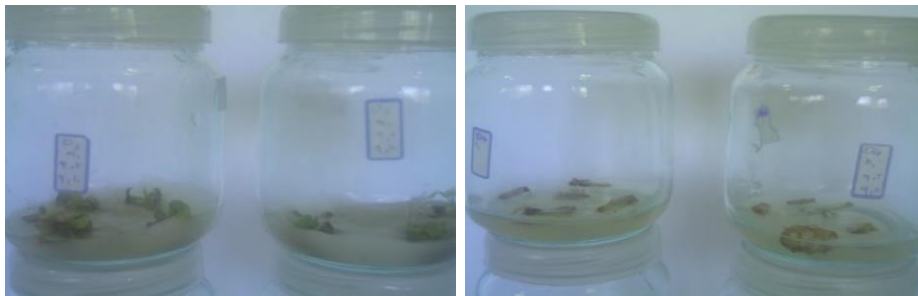
این تحقیق که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت مؤسسه تحقیقات پنبه کشور واقع در شهرستان گرگان انجام شد از ریزنمونه‌های رقم پنبه کوکر-۳۱۲ در محیط کشت MS حاوی ترکیبات مختلفی از هورمون‌های نفتالین استیک اسید (NAA) به میزان ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر و کینتین (Kin) به میزان ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر استفاده شد. اهداف پروژه شامل بررسی میزان ریشه‌زایی (نمونه‌هایی که بر روی محیط کشت در ابتدا فقط ریشه‌زایی داشت)، آلودگی، عدم زنده‌مانی (نمونه‌هایی که بدون هیچ آلودگی بر روی محیط کشت از بین رفت) و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های پنبه با استفاده از ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، جهت محدود کردن و یا به حداقل رساندن عوامل ایجاد کننده آنها، از اهداف این تحقیق می‌باشد.

جهت حذف لینت‌ها (الیاف سلولزی موجود در روی بذر پنبه)، ابتدا بذور به مدت چند ثانیه داخل اسید سولفوریک غلیظ تا حل شدن کامل الیاف قرار می‌گرفتند و پس از شست و شوی کامل اسید با آب، و پس از خشک شدن کامل بذور، جهت ضدعفونی، با غوطه‌ور شدن در اتانول ۷۰ درصد و تکان دادن به مدت ۵ دقیقه، استریل سطحی شده و پس از شست و شو با آب مقطر استریل، حدود ۲۰ دقیقه درون محلول هیپوکلریت سدیم تجاری ۳۰ درصد غوطه‌ور می‌شدند. پس از سه بار شست و شو به مدت زمان‌های ۳، ۵ و ۱۰ دقیقه توسط آب مقطر استریل، بذور در زیر لامینار فلو بر روی کاغذهای صافی استریل شده قرار می‌گرفتند تا آب اضافی آنها گرفته شود. محیط کشت بذور شامل محیط کشت MS بدون ویتامین و هورمون و حاوی ۰/۵ درصد منبع قندی ساکارز بود. پس از انتقال بذور ضدعفونی شده به روی محیط کشت، شیشه‌ها در اتاقک‌های رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار می‌گرفتند. گیاهچه‌های ۷ روزه پنبه رقم کوکر-۳۱۲ در شرایط کاملاً استریل از درون شیشه‌های کشت خارج شده و ریزنمونه‌های مورد بررسی در تحقیق شامل برگ لپه‌ای، محور زیر لپه و جوانه انتهایی از گیاه مادری جدا می‌شدند و به

۱- Vitrification or Glassiness



محیط کشت‌های حاوی تیمار هورمونی منتقل می‌شدند (شکل ۲). و پس از ثبت مشخصات ریزنمونه، تیمار هورمونی و تاریخ کشت، ظروف کشت شده به اتاقک رشد منتقل می‌شدند.



شکل ۲: کشت ریزنمونه‌های رقم کوکر-۳۱۲ بر روی محیط کشت

پس از کشت ریزنمونه‌های ارقام مورد بررسی بر روی محیط کشت‌های با تیمارهای هورمونی متفاوت، درصد ریشه‌زایی، آلودگی، عدم زنده‌مانی و درصد شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها یادداشت‌برداری می‌گردیدند. نتایج به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزارهای MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. همچنین مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

۳- بحث:

بنا بر نتایج تجزیه واریانس این تحقیق نشان داد درصد ریشه‌زایی و شیشه‌ای شدن در سطح ۱ و ۵ درصد به طور معنی‌داری تحت تاثیر نوع ریزنمونه، ترکیبات هورمونی محیط کشت و اثر متقابل بین آنها در طی کشت قرار گرفت؛ در صورتیکه درصد آلودگی ریزنمونه‌ها تحت تاثیر هیچ کدام از اثرات ساده و متقابل آنها قرار گرفته نشد و در انواع ریزنمونه‌ها تفاوتی از نظر عدم زنده‌مانی مشاهده نگردید. نتایج این مطالعه نشان دهنده این است که آلودگی و عدم زنده‌مانی به نوع ریزنمونه بستگی ندارد در صورتیکه در بین ترکیبات هورمونی و نوع ریزنمونه * ترکیبات هورمونی اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد از نظر درصد عدم زنده‌مانی مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس تاثیر نوع ریزنمونه، ترکیبات هورمونی مختلف موجود در محیط کشت و اثرات متقابل آنها بر درصد ریشه‌زایی، آلودگی، عدم زنده‌مانی و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های رقم پنبه کوکر-۳۱۲.

میانگین مربعات (MS)				درجه	منبع تغییرات (S.O.V)
درصد شیشه‌ای شدن	درصد عدم زنده‌مانی ^۲	درصد آلودگی	درصد ریشه‌زایی ^۱	آزادی (df)	
۱۵۵۷/۳**	۱۴۶/۲ ^{ns}	۳۵۸/۲ ^{ns}	۷۹۴۴**	۲	ریزنمونه (E)
۴۰۸/۳**	۶۱۶/۹**	۲۹۰/۲ ^{ns}	۱۸۶۹/۴**	۴	ترکیبات هورمونی محیط کشت (M)
۳۰۶/۳*	۳۴۹/۲*	۲۳۹/۲ ^{ns}	۱۰۶۲/۱**	۸	ریزنمونه * ترکیبات هورمونی (E*M)



۹۷/۴	۱۱۱/۴	۱۱۷/۱	۹۸/۱	۳۰	اشتباه
۱۷/۸	۲۲/۹	۴/۱	۲۶/۳	-	کل
۵۵/۱	۴۵/۹	۲۶۲	۳۷/۵	-	ضریب تغییرات (C.V.)
*: معنی دار سطح ۵ درصد					^{ns} : غیر معنی دار
**: معنی دار در					سطح ۱ درصد

^۱ ریشه‌زایی: ریزنمونه‌هایی که بر روی محیط کشت یا فقط ریشه‌زایی داشته‌اند و یا اینکه ابتدا ریشه‌زایی آنها القا شده است.

^۲ عدم زنده‌مانی: ریزنمونه‌هایی که بدون مشاهده هیچ گونه آلودگی بر روی محیط کشت نتوانستند قابلیت زنده‌مانی خود را حفظ کنند و از بین رفته‌اند.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و محور زیر لپه با اختلاف معنی‌داری از جوانه انتهایی درصد ریشه‌زایی بالاتری نشان دادند؛ در صورتیکه جوانه انتهایی و محور زیر لپه با اختلاف زیاد از برگ لپه‌ای شیشه‌ای شدن بیشتر در آن دیده شد. نتایج نشان داد که درصد آلودگی ربطی به نوع ریزنمونه نداشته است و همچنین عدم زنده‌مانی در بین ریزنمونه‌ها تقریباً به یک اندازه اتفاق افتاد و این نشان می‌دهد، بین انواع ریزنمونه اختلاف معنی‌داری از نظر عدم زنده‌مانی وجود ندارد (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج مقایسه میانگین اثر نوع ریزنمونه بر بر درصد ریشه‌زایی، آلودگی، عدم زنده‌مانی و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های رقم پنبه کوکر-۳۱۲ به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

ردیف	منبع ریزنمونه	ریشه‌زایی (درصد)	آلودگی (درصد)	عدم زنده‌مانی (درصد)	شیشه‌ای شدن (درصد)
۱	جوانه انتهایی	b .	b .	a ۲۱/۸	a ۲۲/۳
۲	برگ لپه‌ای	a ۴۲/۴	ab ۲/۸	a ۲۰/۵	b ۶/۲
۳	محور زیر لپه	a ۳۶/۷	a ۹/۵	a ۲۶/۵	a ۲۶/۵

- میانگین‌هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند، از نظر آماری اختلاف معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) ندارند.

از بین تیمارهای مورد استفاده بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت بدون هورمون مشاهده شد؛ که با نتایج Honarmand و همکاران [۳۰]، Voisey و همکاران [۳۱]، Madani و همکاران [۲۳]، Li و همکاران [۲۸] و Gulati و [۳۲] Jaiwal مبنی بر اینکه بین تیمارهای مورد استفاده بیشترین درصد ریشه‌زایی در محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مشاهده شد؛ مطابقت دارد. به عبارت دیگر محیط MS بدون هورمون نیز این امکان را به گیاه می‌دهد که خود، تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد نیاز برای ریشه‌زایی را ایجاد کند. بنابراین برای تحریک ریشه‌دهی، محیط مناسب و مقرون بصرفه‌تری است [۲۳]. در محیط کشت شماره ۶ با ۱۹ درصد که حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر NAA می‌باشند بیشترین میزان شیشه‌ای شدن مشاهده شد. تمامی محیط کشت‌ها درصدهایی از عدم زنده‌مانی در دامنه بین ۳۳-۱۰ درصد را نشان دادند و در محیط کشت پایه که هیچ ترکیب هورمونی در آن وجود نداشت ریزنمونه‌ها بیشترین میزان زنده‌مانی را نشان داد. نتایج مطالعه نشان داد میزان آلودگی ربطی به ترکیب هورمونی محیط کشت نداشت؛ و ممکن بوده به دلیل آلودگی‌های حاصل از ریزنمونه و یا کنترل عوامل محیط خارجی و ... باشد. (جدول ۳).



جدول ۳: نتایج مقایسه میانگین اثر نوع ترکیب هورمونی محیط کشت بر درصد ریشه‌زایی، آلودگی، عدم زنده‌مانی و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های رقم پنبه کوکر-۳۱۲ به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

شیشه‌ای شدن (درصد)	عدم زنده‌مانی (درصد)	آلودگی (درصد)	ریشه‌زایی (درصد)	ترکیبات هورمونی محیط کشت (mg/l)	کدمحیط کشت
b ۱۴/۶	a ۱۰/۱	b ۰	a ۴۵/۳	MS	۱
a ۲۹	ab ۲۳/۹	b ۰	b ۲۹/۴	MS+NAA(1)	۶
b ۱۷/۹	b ۲۱/۸	ab ۹/۵	b ۳۰/۹	MS+NAA(2)	۱۱
b ۱۶/۶	a ۳۲/۹	b ۰	c ۱۹/۶	MS+Kin(2)	۳
b ۱۱/۱	ab ۲۵/۹	a ۱۱/۱	d ۶/۴	MS+Kin(4)	۵

- میانگین‌هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند، از نظر آماری اختلاف معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) ندارند.

براساس داده‌های حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل دوگانه نشان داد، ریزنمونه محور زیر لپه در محیط کشت پایه بیشترین درصد ریشه‌زایی، و در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین بیشترین شیشه‌ای شدند و کمتر زنده ماندند. که این با نظریه Rojas-Martinez و همکاران [۲۴]، Bhojwahi و Razdan [۲۵] و Ziv [۲۶] مبنی بر اینکه شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای تحت تاثیر عوامل مختلف مانند ژنوتیپ گیاه مادری، غلظت و نوع آگار مورد استفاده، غلظت و نوع سیتوکینین مورد استفاده و .. قرار می‌گیرد، مطابقت دارد (جدول ۴).

جدول ۴: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه * ترکیب هورمونی محیط کشت بر درصد ریشه‌زایی، آلودگی، عدم زنده‌مانی و شیشه‌ای شدن ریزنمونه‌های رقم پنبه کوکر-۳۱۲ به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

ردی ف	کدمحیط کشت	نوع ریزنمونه	ریشه‌زایی (درصد)	آلودگی (درصد)	عدم زنده‌مانی (درصد)	شیشه‌ای شدن (درصد)
1	۱	جوانه انتهایی	e 0	c 0	de 3/7	c-f 16/6
2	۶	جوانه انتهایی	e 0	c 0	a-c 29/1	a-d 30/5
3	۱۱	جوانه انتهایی	e 0	c 0	a-c 29/1	a-c 33/3
4	۳	جوانه انتهایی	e 0	c 0	ab 33/3	ef 11/1
5	۵	جوانه انتهایی	e ۰	c 0	b-e 14	b-e 20
6	۱	برگ لپه‌ای	b ۵۷/۹	c 0	e 0	f 0
7	۶	برگ لپه‌ای	c ۳۶/۱	c 0	a-c 30/5	a-e 20/8
8	۱۱	برگ لپه‌ای	bc ۴۵/۲	b ۱۴/۲	b-e 15	ef 10/3



f 0	a-c 26/6	c 0	bc ۵۳/۳	برگ لپه‌ای	۳	9
f 0	a-c 30/5	c 0	d ۱۹/۴	برگ لپه‌ای	۵	10
a-e 27/3	a-c 26/8	c 0	a ۷۸	محور زیر لپه	۱	11
ab 35/6	c-e 12	c 0	bc ۵۲/۳	محور زیر لپه	۶	12
ef 10/3	a-d 21/4	b ۱۴/۲	bc ۴۷/۶	محور زیر لپه	۱۱	13
a 38/8	a 38/8	c 0	de ۵/۵	محور زیر لپه	۳	14
d-f 13/3	ab 33/3	a ۳۳/۳	e ۰	محور زیر لپه	۵	15

- میانگین هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند، از نظر آماری اختلاف معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) ندارند.

۴- نتیجه گیری:

بطور کلی براساس نتایج تجربه واریانس این تحقیق نشان داد درصد ریشه‌زایی، شیشه‌ای شدن به طور معنی‌داری تحت تاثیر نوع ریزنمونه، ترکیبات هورمونی محیط کشت و اثر متقابل بین آنها در طی کشت قرار گرفت؛ بطوریکه، درصد ریشه‌زایی ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و محور زیر لپه بطور معنی‌داری از جوانه انتهایی و درصد شیشه‌ای شدن جوانه انتهایی و محور زیر لپه از برگ لپه‌ای بیشتر بود. افزون بر این، محور زیر لپه در محیط کشت بدون هورمون بیشترین درصد ریشه‌زایی و در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم بر لیتر کینتین بالاترین درصد شیشه‌ای شدن و عدم زنده مانی مشاهده شد. نتایج نشان داد میزان آلودگی ربطی به نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی و اثرات متقابل آنها ندارد و احتمالا بدلیل ریزنمونه‌های مورد استفاده و یا محیط کشت یا شرایط کشت بوده است. در کل در این تحقیق عوامل بازدارنده و محدود کننده کشت بافت پنبه در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی با رفع این موانع به کشت بافت مطلوب و بهینه دست یافت.

مراجع:

۱. خداینده، ن. (۱۳۷۶). زراعت گیاهان صنعتی. انتشارات مرکز نشر سپهر.
2. Zhang, B.H., Li, u. Yao, C.B. (2000). Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 60: 89-94.
3. Ouma, J.P., Young, M.M., Reichert, N.A. (2004). Optimization of in vitro regeneration of multiple shoots from hypocotyl sections of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African J. Biotech.* 3(3): 169-173.
4. Syed Sarfraz, H., Husnain, T., Riazuddin, S. (2005). In-ovule Embryo Culture: A Novel Method of Cotton Transformation. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 8(2): 297-301.
5. Gupta, S.K., Srivastava, A.K., Singh, P.K., Tuli, R. (2004). *In vitro* proliferation of shoots and regeneration of cotton. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 51: 149-152.



6. Singh, N.D., Sahoo, L., Bhalla, N., Jaiwal, P.K. (2003). Effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpeas (*Cajanus Cajan* L. Millsp). Plant Sci. 164: 341.
7. Mishra, R., Wang, H.Y., Yadav, N., Wilkins, T.A. (2003). Development of highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* L.) – A step towards genotype-independent regeneration. Plant Cell Tiss Org Cult. 73: 21-35.
8. Ghasemi, M., Majd, A., Fallahian, F., and Ghasemi Bezdi, K. (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(15): 2915-2922. (In Persian)
9. Ikram, U.H. (2005). Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African Journal of Biotechnology. 4(2): 206-209.
10. Hamid, R., Ghorbanzadeh, Z., Marashi, H., Malekzadeh Shafaroudi, S. (2024). Regeneration Optimization of Cotton commercial cultivars using meristem apex culture. *Research Journal of Genetic Engineering and Biosafety*, 12(2), 195-202.
11. Ghasemi Bezdi, K., Aidin, B. (2012). Study of Callus Formation and Salinity Tolerance in Different Explants of Cotton (*Gossypium* Sp.) Cultivars in Vitro. 4(10): 94-108. (In Persian)
12. Ghasemi Bezdi, K., Karlov, G.I. and Ahmadikhah, A. (2007). Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica nupus* L.) shoot in vitro organogenesis. Afr. J. Biotechnol. 6(7): 861-867.
13. Rao, A.Q., Hussain, S.S., Shahzad, M.S., Bokhari, S.Y.A., Raza, M.H., Rakha, A., Majeed, A., Shahid, A.A., Saleem, Z., Husnain, T., Riazuddin, S. (2006). Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* Spp.). J Zhejiang Univ Sci B. 7(4): 291-298.
14. Jin, S., Zhang, X., Nie, Y., Guo, X., Liang, S., Zhu, H. (2006). Identification of a novel elite genotype for *in vitro* culture and genetic transformation of cotton. Biologia Plantarum. 50(4): 519-524.
15. Mashayekhi, M., Shakib, A.M., Ahmad-Raji, M. and Ghasemi Bezdi, K. (2008). Gene transformation Potential of commercial canola (*Brassica nupus* L.) cultivars using cotyledon and hypocotyl explants. Afr. J. Biotechnol. 7(24): 4459-4463.
16. Syed Sarfraz, H., Husnain, T., Riazuddin, S. (2005). Recurrent Somatic Embryogenesis and Twin Embryo Production in Cotton. Pakistan Journal of Biological Sciences. 8(1): 141-145.
17. Wilkins, T.A., Mishra, R., Trolinder, N.L. (2004). Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of cotton. J Food Agric Environ. 2: 179-187.
18. Zapata, C., Srivatanakul, M., Park, S.H. (1999). Improvements in shoot apex regenation of two fiber crops; cotton and kenaf. Plant Cell Tiss Org. Cult. 56: 185-191.
19. Majeed, A., Husnain, T., Riazuddin, S. (2000). Transformation of virus – resistant genotype of *Gossypium hirsutum* L. with pesticidal gene. Plant Biotech. 17: 105-110.
20. Sobhanian, N., Habashy, A.A., Farshad Far, E. & Tohid Far, M. (2012). Optimizing regeneration and reporter gene (*Gus*) transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Annals of Biological Research*, 3, 2419-2427.



21. Malekiband, S., Jafari, M., Ghadimzadeh, M. & Bernosi, E. (2013). Plant Regeneration via direct organogenesis in three alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars using stem nodal explant. *Seed and Plant Improvement Institute*, 1, 65-80.
22. Goleyjani Moghaddaam, R., Motallebi, M., Zamani, M. R. & Rezanejad, H. (2012). Optimization of regeneration and transformation of canola Hyola 308 and RGS003 lines. *Journal of plant Biology*, 11, 47-61.
23. Madani, G., Ghobadi, S., Seyed-Tabatabaei, B.E., Talebi, M. & Yamchi, V. (2013). Effect of plant growth regulators and explant types on regeneration and micropropagation of a commercial strawberry cultivar (*Fragaria×ananassa* cv. Selva). *Journal of science and Technology of Greenhouse culture*, 15, 111-122. (In Farsi).
24. Rojas-Martinez, L., Visser, R.G.F. & Klerk, G.J. (2010). The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants*, 10, 169-175.
25. Bhojwahi, S.S. & Razdan, M.K. (199۶). *Plant tissue culture: theory and paractice*. Amsterdam, Elsevier.
26. Ziv, M. (1991). *Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants*. In: Micropropagation Technology and Applications. In: P.C. Debergh & R.H. Zimmerman. Kluwer Academic publisher, Dordrecht, (PP. 45-69).
27. Tatari Varnousfaderani, M., mousavi, S.A. & Bouzari, N. (2012). Micropropagation of some clonal rootstocks of stone fruits. *Seed and plant Improvement Journal*, 28, 53-66 (in Farsi).
28. Li, J.J., Wu, Y.M., Wang, T. & Liu, J.X. (2009). *In vitro* direct organogenesis and regeneration of *Medicago sativa* L. *Biologia Plantarum*, 53, 325-328.
29. Mahdavian, M., Bouzari, N. & Abdollahi, h. (2010). Effects of culture media and growth regulators on proliferation and rooting of a vegetative mahlab rootstock (SL-64). *Seed and Plant Improvement Journal*, 26, 15-26. (In Farsi).
30. Honarmand, L., Zare, N., Asghari-ZaKaria, R., & Sheikhzade-Mosadegh, P. (2016). *In vitro* regeneration of sainfoin (*Onobrychis sativa*) via shoot apex explant. *Iranian Journal of Filed Crop Science*, 47(2). 315-328.
31. Voisey, C.R., White, D.W., Dudas, B., Appleby, R.D., Ealing, P.M. & Scott, A.G. (1994). *Agrobacterium*-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. *Plant Cell Reports*, 13, 301-314.
32. Gulati, A. & Jaiwal, P.K. (1994). Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna radiate* (L.) Wilczek). *Plant Cell Reports*, 13, 523-527.