مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد اول، شماره دوم، ۱۳۹۲
۱-۱۳
www.jcri.ir

تاثیر غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم بر رشد نسبی کالوس ارقام پنبه

خجسته مهدویان[۱]، کمال قاسمی بزدی*[۲] و حسین عباسپور[۳]
[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
[۲]عضو هیات علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان
[۳]عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۸

چکیده

بیماری ورتیسیلیومی از مهم‌ترین بیماری‌های پنبه کشور است که منجر به محدودیت کشت و کاهش عملکرد می‌شود. در تحقیق حاضر، از توکسین قارچ ورتسیلیوم (*Verticillium dahliae*) به عنوان عامل گزینش سلول‌های بافت کالوس ارقام پنبه جهت تحمل به این بیماری استفاده شد. ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های سترون ۷ روزه تهیه شدند و در محیط‌کشت MS به همراه دو میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های NAA و BAP کشت شدند. پس از توزین اولیه، کالوس‌های حاصله به محیط‌کشت جدید با غلظت ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های NAA و BAP به همراه غلظت‌های صفر (شاهد)، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد توکسین قارچ ورتیسیلیوم منتقل شدند و پس از سه هفته، رشد نسبی کالوس‌ها محاسبه شد. بیشترین میزان رشد نسبی کالوس‌ها در محیط‌کشت بدون توکسین و کمترین میزان رشد در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد توکسین بود. رشد نسبی کالوس در رقم پنبه گلستان در محیط کشت بدون توکسین و در غلظت توکسین ۵ درصد به ترتیب با ۱۱۵/۲ و ۱۰۰ درصد بالاترین میزان بود و در مورد رقم ساحل، در غلظت‌های توکسین ۲۰ و ۳۰ درصد به ترتیب با ۲۴/۵ و ۸ درصد کمترین میزان رشد نسبی مشاهده شد. تغییر رنگ کالوس‌های ارقام گلستان، کوکر-۱۰۰ ویلت و ساحل که به رنگ سبز متمایل به سفید بودند در غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد خیلی محسوس نبود اما با افزایش غلظت توکسین تا ۳۰ درصد به رنگ شیری متمایل به قهوه‌ای درآمدند. در رقم بومی‌هاشم‌آباد، کالوس‌ها کرم رنگ بودند و با افزایش درصد توکسین از ۵ تا ۳۰ درصد به دامنه‌ای از قهوه‌ای تغییر رنگ دادند که نشان دهنده تاثیر توکسین بر روی خصوصیات ظاهری کالوس‌ها بود. لذا در شرایط درون شیشه‌ای با انتخاب کالوس‌های مناسب‌تر، می‌توان غربال گیاهان متحمل را تسریع نمود.

واژگان کلیدی : بیماری، پنبه، تحمل، درون شیشه‌ای، ریزنمونه، محیط کشت

*نویسنده مسئول: kghasemibezdi@yahoo.com

مقدمه

پنبه یکی از گیاهان مهم زراعی ایران محسوب می‌شود که به لحاظ مصارف لیفی و روغنی در عرصه تجارت جهانی از جایگاهی ویژه برخوردار است. بیماری پژمردگی آوندی، مهم‌ترین بیماری پنبه محسوب شده که توسط قارچ *Verticillium dahliae* kleb ایجاد می‌شود و سالانه خسارت فراوانی به تولید این محصول وارد می‌کند (محمدی و همکاران، ۲۰۱۲). توکسین پروتئینی حاصل از این قارچ (VD)، عامل اصلی بیماری‌زایی پنبه می‌باشد (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۳). یکی از مهم‌ترین راهکارها در کنترل و کاهش خسارت، استفاده از فناوری‌های نوینی از نظیر بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در تولید ارقام پنبه متحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است (قاسمی بزدی، ۲۰۱۲c). در سال‌های اخیر تکنیک کشت‌بافت به ابزاری مناسب در اصلاح و تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است. دستیابی به روش‌های کم‌هزینه و کوتاه‌مدت جهت دسترسی به لاین‌های متحمل به تنش‌های محیطی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهی از کاربردهای مهم کشت‌بافت می‌باشد (قاسمی بزدی، ۲۰۱۲b). در نتیجه، بهترین گزینه برای مبارزه با این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل می‌باشد (کلپ و همکاران، ۱۹۹۲). برای گزینش[1] سلول‌های متحمل پنبه به این بیماری، افزودن ماده گزینشگر VD توکسین به محیط‌های رشد و تکثیر سلول‌ها، استقرار یک سیستم مناسب تولید کالوس‌های رویان‌زا و یا اندام‌زا با رشد مناسب و قابلیت واکشت‌های مکرر مورد نیاز است (چمن‌دوستی، ۲۰۱۳). غربال‌گری و انتخاب درون شیشه‌ای بافت‌های گیاهی برای مقاومت به توکسین‌های قارچی یا عصاره‌های کشت برای چندین گونه موفق بوده است (ماسانوری و همکاران، ۱۹۹۳). روش انتخاب درون شیشه‌ای امکان باززایی گیاهچه کامل از سلول‌های منفرد که در محیط کشت تحت تاثیر عامل غربال‌گر قرار گرفته‌اند را فراهم می‌کند. عامل غربال‌گر سبب ایجاد جهش و به دنبال آن انتخاب جهش‌یافته‌های مطلوب و یا سوماکلونال‌های متحمل در برابر بیماری می‌شود (چاندرا و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به اهمیت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه در مناطق پنبه‌خیز دنیا و خسارات وارده این بیماری به زراعت پنبه، از آنجا که شدت بیماری در سال‌های مختلف متفاوت بوده و ممکن است نژاد جدیدی از بیماری در هر منطقه پیدا شود (اشناتهورس، ۱۹۸۱)، لازم است هر ساله ارقام تجاری و امیدبخش در مقابل جدایه‌های برگ‌ریز و غیربرگ‌ریز بیماری و میزان تحمل و عملکرد ارقام در ارتباط با شدت بیماری در هر منطقه مورد مقایسه و ارزیابی قرار گیرند (نصراله‌نژاد و همکاران، ۲۰۰۷). لذا تحقیق حاضر با هدف غربال‌گری درون شیشه‌ای کالوس‌های تعدادی از ارقام پنبه ایران نسبت به غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم صورت گرفت.

1- *In vitro* selection

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، مکان و زمان تحقیق: در این تحقیق که در آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی و کشت بافت موسسه تحقیقات پنبه کشور واقع در شهرستان گرگان، از تیرماه ۱۳۹۱ تا تیرماه ۱۳۹۲ انجام شد، از ۴ ژنوتیپ مختلف پنبه از گونه‌های *G.hirsutum* و *G.herbaceum* شامل ارقام گلستان، کوکر- ۱۰۰ ویلت، ساحل و بومی هاشم‌آباد استفاده شد.

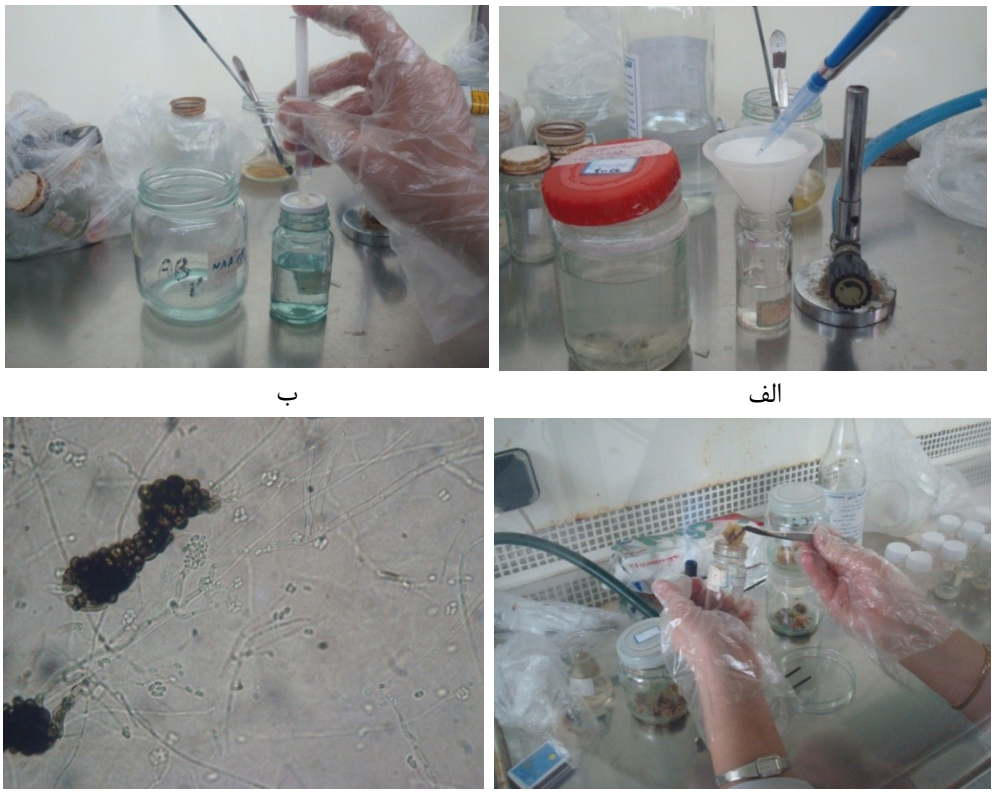
تهیه کالوس از ریزنمونه‌های پنبه: جهت حذف لینترها (الیاف سلولزی موجود در روی بذر پنبه)، ابتدا بذور به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه داخل اسید سولفوریک غلیظ تا حل شدن کامل الیاف قرار گرفتند و پس از شست و شوی کامل اسید با آب، به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد قرار داده شدند تا کاملا خشک شوند. جهت سترون‌سازی بذور مورد استفاده، پس از استریل سطحی آنها با غوطه‌ور شدن در اتانول ۹۶ درصد به مدت یک الی دو دقیقه و شستشو با آب مقطر، به مدت ۲۰ دقیقه درون محلول هیپوکلریت سدیم تجاری ۴۰ درصد قرار گرفتند. بذور سترون شده سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند و بر روی پل‌های کاغذی تعبیه شده در محیط‌کشت‌های MS مایع کشت شدند و شیشه‌ها به اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با منتقل شدند. نور مورد استفاده از نوع فلورسنت سفید سرد بود.

گیاهچه‌های ۷ روزه پنبه در شرایط کاملا استریل از درون شیشه‌های کشت مایع خارج شدند و ریزنمونه‌های مورد بررسی شامل برگ‌های لپه‌ای، محور زیرلپه و جوانه انتهایی به وسیله پنس و اسکالپل استریل از گیاه مادری جدا شدند و به محیط‌کشت‌های حاوی تیمار هورمونی انتقال یافتند. جهت کالوس‌زایی، از محیط کشت MS (موراشیک و اسکوگ، ۱۹۶۲) به‌همراه ویتامین‌های B_5 (گامبورگ و همکاران، ۱۹۶۸) حاوی ترکیبی از ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هر یک از هورمون‌های نفتالین استیک اسید (NAA) و ۶- بنزیل آمینوپورین (BAP) استفاده شد.

جداسازی قارچ *Verticillium dahliae* از بوته‌های آلوده پنبه: جهت جداسازی عامل پژمردگی ورتیسیلیومی از نمونه‌های بیمار، قسمت‌هایی از ساقه یا شاخه‌های گیاه انتخاب شدند و پس از ضدعفونی توسط هیپوکلریت سدیم و اتانول و جداسازی پوست، از مقطع عرضی و طولی برش یافتند و بر روی محیط‌کشت‌های جامد کشت شدند و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت دو الی سه روز، از نوک هیف قارچ مربوطه به میزان دو میلی‌متر برداشت شد و در محیط‌کشت مالت آگار برای بار دوم کشت گردید و در تاریکی قرار داده شد تا ایزوله خالص قارچ جدا شود (ماسانوری و همکاران، ۱۹۹۳).

تهیه و استخراج توکسین قارچ ورتیسیلیوم: پس از گذشت ۵ تا ۷ روز از رشد قارچ، سه قطعه‌ی یک سانتی‌متر مربعی از محیط‌کشت همراه با ریسه‌ی آن در شرایط کاملا استریل در شیشه‌های محیط

کشت زاپک قرار داده شدند و به مدت ۴ هفته بر روی شیکر با سرعت g ۹۰ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (ماسانوری و همکاران، ۱۹۹۳). سپس محیط‌کشت مایع زاپک حاوی توکسین قارچ در شرایط کاملا استریل از کاغذ صافی عبور داده شد و مایع حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برداشته شد و با کاغذ صافی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد و در شیشه‌هایی کوچک به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک کشت، به منظور اطمینان از عدم رشد ریسه‌های قارچ، نگهداری شد (ماسانوری، ۱۹۹۳) (شکل ۱).



شکل ۱- تهیه و استخراج توکسین قارچ ورتیسیلیوم؛ الف) تکثیر قارچ ورتیسیلیوم؛ ب) صاف کردن توکسین با استفاده از کاغذ واتمن؛ ج) استخراج توکسین قارچ از فیلتر کاغذی؛ د) انتقال کالوس‌های بدست‌آمده به محیط‌کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف توکسین ورتیسیلیوم.

تهیه محیط‌کشت‌های حاوی توکسین قارچ ورتیسیلیوم: برای تهیه محیط‌کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف توکسین، از ترکیب جدید هورمونی حاوی ۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۰/۵

میلی‌گرم بر لیتر BAP در محیط‌کشت استفاده شد. سپس از توکسین قارچ به مقادیر صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد به محیط کشت‌های تهیه شده اضافه شد و در شیشه‌های کوچک توزیع شد. کالوس‌های تولید شده ابتدا وزن شدند، رنگ آنها یادداشت شد و سپس به محیط‌کشت‌های جدید انتقال یافتند. بعد از گذشت سه هفته، مجددا کالوس‌ها وزن شدند، تغییر رنگ ناشی از اثر توکسین نیز مورد بررسی قرار گرفت و رشد نسبی آنها از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد رشد نسبی کالوس} = \frac{\text{وزن اولیه کالوس} - \text{وزن کالوس رشد یافته}}{\text{وزن اولیه کالوس}} \times ۱۰۰$$

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده نرم‌افزار آماری MSTATC صورت گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تاثیر رقم، غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم و اثر متقابل این عوامل بر میزان رشد نسبی کالوس‌های ارقام پنبه گلستان، کوکر-۱۰۰ویلت، بومی هاشم‌آباد و ساحل در محیط‌کشت MS حاوی هورمون‌های NAA(0.3)+BAP(0.5) در جدول شماره یک نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصله، اختلاف معنی‌داری میان ارقام و غلظت‌های مختلف توکسین قارچی در سطح ۵ درصد مشاهده شد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس حاصل از بررسی تاثیر رقم، غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم و اثرات متقابل این عوامل بر درصد رشد نسبی کالوس‌های ارقام پنبه

منبع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
رقم	۳	۰/۳۴۷ *
توکسین ورتیسیلیوم	۴	۰/۵۵۳ *
رقم × توکسین	۱۲	۰/۰۸۲ n.s
اشتباه	۴۰	
ضریب تغییرات (CV) (درصد)		۱۵/۳

* : معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد ns : غیر معنی‌دار

بر اساس نتایج مقایسه میانگین اثر نوع رقم پنبه در تمام غلظت‌های توکسین قارچ ورتیسیلیوم، از نظر درصد رشد نسبی کالوس، ارقام در دو گروه قرار گرفتند (جدول ۲). رقم گلستان با ۷۵/۲ درصد،

بالاترین میزان رشد نسبی کالوس را در غلظت‌های مختلف توکسین داشت و به همراه رقم کوکر-۱۰۰ ویلت با ۶۳/۴ درصد در گروه اول قرار گرفت. کمترین میزان رشد نسبی کالوس در رقم بومی هاشم‌آباد با ۳۱/۴ درصد مشاهده شد. رقم ساحل نیز با ۵۱/۹ درصد، بعد از رقم کوکر-۱۰۰ ویلت و در رده متوسط از نظر میزان رشد نسبی کالوس قرار گرفت.

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین رشد نسبی کالوس ارقام پنبه در غلظت‌های توکسین قارچ ورتیسیلیوم به روش آزمون LSD

ردیف	رقم پنبه	درصد رشد نسبی کالوس
۱	گلستان	۷۵/۲ a
۲	کوکر-۱۰۰ ویلت	۶۳/۴ a
۳	بومی هاشم‌آباد	۳۱/۴ b
۴	ساحل	۵۱/۹ ab

- میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری (در سطح ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.

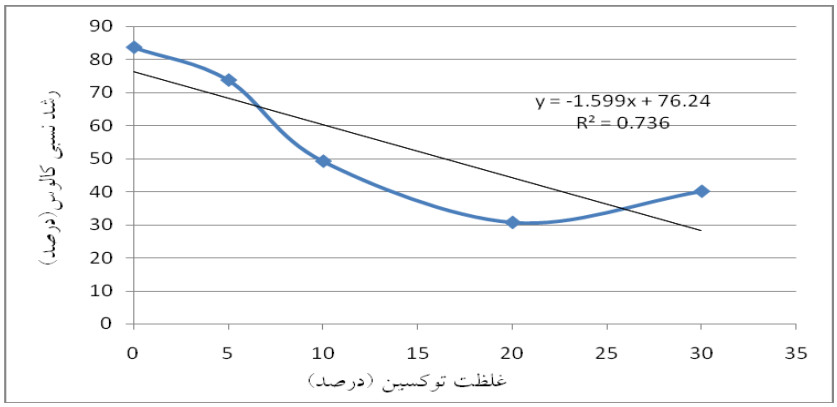
بر اساس نتایج جدول ۲ مشاهده می‌شود که با وجود این که رقم ساحل به‌عنوان یکی از ارقام پنبه متحمل به بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی طی دهه‌های گذشته معرفی و سال‌ها با این هدف مورد سلکسیون قرار گرفته است و همچنین رقم کوکر-۱۰۰ ویلت که به‌عنوان والد دهنده ژن تحمل به ورتیسیلیوم در تلاقی با لاین ۳۴۹ جهت معرفی رقم ساحل مورد استفاده قرار گرفته است (قاسمی بزدی، ۲۰۱۲a) و در این تحقیق از آنها به عنوان ارقام شاهد از نظر تحمل به ورتیسیلیوم استفاده شد، نتوانستند آن طور که انتظار می‌رفت میزان رشد نسبی کالوس بیشتر یا برابر با رقم گلستان داشته باشند. رقم گلستان که یکی از ارقام معرفی شده جدید پنبه در ایران می‌باشد، به طور معنی‌داری توانست رشد نسبی کالوس بالاتری داشته باشد. به نظر می‌رسد که با توجه به مولتی‌ژن بودن این بیماری (کلوسترمن و همکاران، ۲۰۰۹)، رشد نسبی بیشتر در این رقم در اثر فعالیت ژن‌های تحمل به بیماری باشد. در رقم بومی هاشم‌آباد نیز، پایین بودن نرخ رشد نسبی کالوس می‌تواند به‌دلایل متفاوت بودن گونه این رقم (*G. herbaceum*) نسبت به سه گونه دیگر و دیپلویید بودن این رقم بستگی داشته باشد (قاسمی بزدی و خندان، ۲۰۱۳).

نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم در محیط کشت بر میزان رشد نسبی کالوس‌ها نیز آنها را در گروه‌های مختلفی قرار داد (جدول ۳). کالوس‌ها در غلظت بدون توکسین (شاهد) با ۸۳/۶ درصد بیشترین میزان رشد را نشان دادند. با افزایش غلظت توکسین، از میزان رشد نسبی کالوس‌ها کاسته شد (شکل ۲)، به‌طوری‌که در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد به‌ترتیب با ۳۰/۷ و ۴۰/۱ درصد، کمترین رشد نسبی کالوس‌ها مشاهده شد. همچنین در غلظت‌های توکسین ۵ و ۱۰ درصد نیز به ترتیب میزان رشد نسبی کالوس ۷۳/۷ و ۴۹/۲ درصد مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین اثر غلظت‌های توکسین قارچ ورتیسیلیوم برمیزان رشد نسبی کالوس‌های ارقام پنبه به روش آزمون LSD

ردیف	غلظت توکسین (درصد)	درصد رشد نسبی کالوس
۱	صفر (شاهد)	۸۳/۶ a
۲	۵	۷۳/۷ ab
۳	۱۰	۴۹/۲ bc
۴	۲۰	۳۰/۷ c
۵	۳۰	۴۰/۱ c

- میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری (در سطح ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.



شکل ۲- بررسی روند میزان رشد نسبی کالوس‌های ارقام پنبه در غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم در محیط کشت.

نتایج شکل ۲ نشان داد که یک همبستگی منفی بین غلظت توکسین در محیط کشت و میزان رشد نسبی کالوس‌ها وجود دارد. با توجه به مولتی‌ژن بودن تحمل به بیماری ورتیسیلیوم در پنبه (کلوسترمن و همکاران، ۲۰۰۹)، این کاهش نرخ رشد در غلظت‌های بالاتر توکسین به‌طور خطی مشاهده شد. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج ممقانی و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت که افزایش غلظت عصاره قارچی اثر بازدارندگی بر روی میزان رشد کالوس دارد.

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم در غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم بر میزان رشد نسبی کالوس‌ها (جدول ۴)، نشان داد که تغییرات رشد نسبی کالوس‌های این ارقام در غلظت‌های متفاوت یکسان می‌باشد.

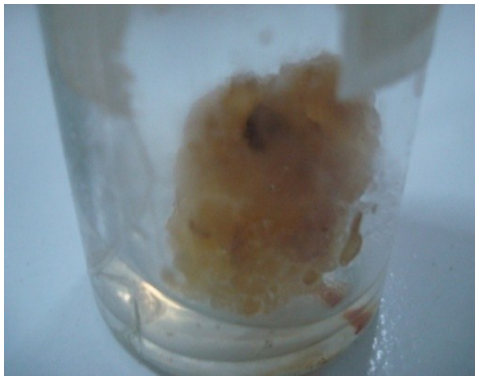
جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رقم در غلظت‌های توکسین قارچ ورتیسیلیوم برمیزان رشد نسبی کالوس‌های ارقام پنبه به روش آزمون LSD

رقم	غلظت‌های مختلف توکسین (درصد)				
	۰ (شاهد)	۵	۱۰	۲۰	۳۰
گلستان	۱۱۵/۲ a	۱۰۰/۰ ab	۸۶/۲ a-c	۳۱/۰ c-e	۴۴/۰ b-e
کوکر-۱۰۰ویلت	۸۳/۶ a-d	۶۴/۲ a-e	۴۰/۸ b-e	۳۸/۸ b-e	۸۹/۷ a-c
بومی هاشم‌آباد	۴۸/۸ a-e	۳۱/۶ c-e	۲۹/۰ c-e	۲۸/۲ c-e	۱۹/۵ de
ساحل	۸۶/۸ a-c	۹۹/۱ ab	۴۰/۸ b-e	۲۴/۵ c-e	۸/۰ e

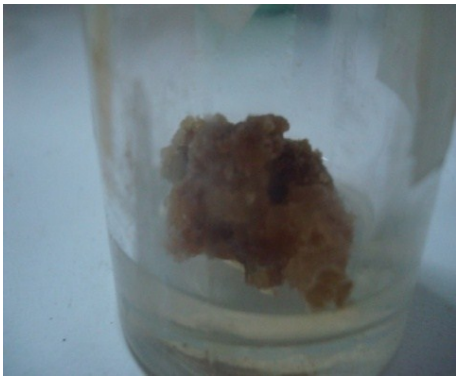
- میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری (در سطح ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.

با توجه به نتایج این آزمایش و مقایسه آن با نتایج ژانگ و همکاران (۲۰۰۳) می‌توان گفت که سلول‌های متحمل در حضور یک ترکیب بازدارنده در جمعیت سلولی بزرگ به منظور گزینش، قادر به رشد می‌باشند در حالی که سلول‌های حساس از چنین توانایی برخوردار نیستند.

همچنین بر اساس مشاهدات و یادداشت برداری‌های مورفولوژیکی، پس از استقرار کالوس‌های حاصل از ارقام مختلف در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف توکسین قارچ مشاهده شد که رنگ کالوس، میزان کالوس‌زایی و حجم کالوس به وجود آمده با توجه به نوع رقم و غلظت توکسین متفاوت است. بر این اساس در رقم بومی هاشم‌آباد، کالوس‌ها که به رنگ کرم تا زرد مشاهده شدند در توکسین ۵ درصد به رنگ کرم متمایل به قهوه‌ای درآمدند و این روند تغییر رنگ در توکسین‌های ۱۰ و ۲۰ درصد نیز مشاهده شد و در توکسین ۳۰ درصد به رنگ قهوه‌ای کامل درآمد (شکل ۳).



الف



ب

شکل ۳- تغییر رنگ کالوس‌های رقم پنبه بومی هاشم آباد بر روی الف) محیط‌کشت بدون توکسین و ب) محیط‌کشت حاوی ۵ درصد توکسین قارچ ورتیسیلیوم.

بر طبق مشاهدات، افزودن عصاره قارچ بیماری‌زای *Verticillium dahliae* یا VD توکسین به کالوس‌ها سبب تیرگی آنها شد که با نتایج چمن‌دوستی (۲۰۱۳) همخوانی داشت مبنی بر اینکه افزودن عصاره قارچ، باعث تیرگی و مرگ کالوس‌ها شد. همچنین ژانگ و همکاران (۲۰۰۳) خاطر نشان کردند که بعد از افزودن VD توکسین به محیط‌کشت کالوس‌های پنبه، علائم آشکاری از قهوه‌ای شدن و پژمردگی در سلول‌ها آشکار می‌شود که مقدار آن برای ایجاد این علایم بستگی به رقم پنبه‌ی استفاده شده دارد.

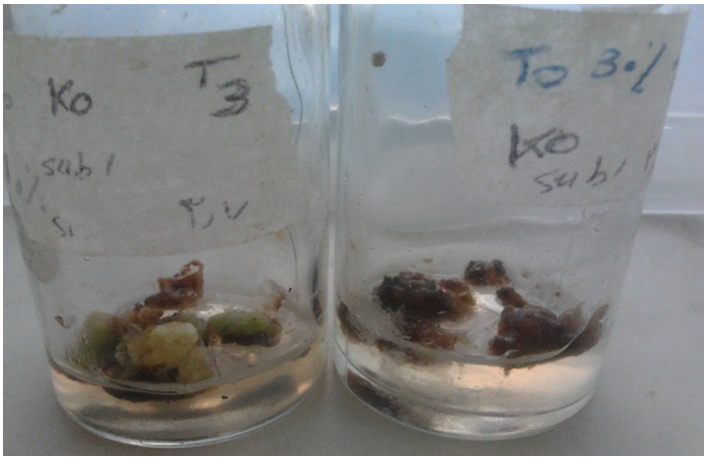
در رقم گلستان نیز مشاهده شد که کالوس‌ها در محیط‌کشت بدون توکسین به رنگ سفید و سبز متمایل به صورتی بودند که این رنگ در توکسین ۵ و ۱۰ درصد نیز همچنان باقی ماند. با افزایش غلظت توکسین، کالوس‌ها به‌ترتیب به رنگ‌های سبز متمایل به سفید و شیری متمایل به قهوه‌ای تغییر یافتند (شکل ۴).

شکل ۴- تغییر رنگ کالوس‌های رقم پنبه گلستان بر روی محیط‌کشت‌های حاوی غلظت‌های توکسین ۳۰ درصد (سمت راست) و ۵ درصد (سمت چپ)

در رقم ساحل، کالوس‌ها در محیط‌کشت بدون توکسین به رنگ سبز بودند که پس از قرار گرفتن در توکسین ۵ و ۱۰ درصد به رنگ سبز متمایل به کرم درآمدند اما در توکسین ۲۰ درصد به سمت رنگ شیری و در محیط‌کشت حاوی توکسین ۳۰ درصد به رنگ قهوه‌ای متمایل شدند (شکل ۵).

شکل ۵ - تغییر رنگ کالوس‌های حاصل از رقم پنبه ساحل در محیط‌کشت‌های با غلظت ۳۰ درصد توکسین ورتیسیلیوم (سمت راست)، غلظت ۲۰ درصد توکسین (وسط) و بدون توکسین (سمت چپ).

در رقم کوکر-۱۰۰ویلت، رنگ کالوس‌ها که در محیط‌کشت بدون توکسین و حاوی توکسین ۵ درصد به رنگ سبز متمایل به صورتی بودند، به تدریج در محیط‌کشت با غلظت‌های توکسین بالاتر ۱۰ و ۲۰ درصد به ترتیب به رنگ‌های سبز متمایل به شیری و شیری رنگ درآمدند و در نهایت در توکسین ۳۰ درصد به شیری متمایل به قهوه‌ای تبدیل شدند (شکل ۶).



شکل ۶- تغییر رنگ کالوس‌های حاصل از پنبه رقم کوکر-۱۰۰ ویلت در محیط‌کشت‌های با توکسین ورتیسیلیوم ۳۰ درصد (سمت راست) و توکسین ۱۰ درصد (سمت چپ).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، پس از تولید کالوس از ریزنمونه‌های مختلف ارقام پنبه، رشد نسبی کالوس‌ها در غلظت‌های مختلف توکسین قارچ *Verticillium dahliae* بررسی شد. بر اساس نتایج مشاهده شد که بیشترین رشد نسبی کالوس در غلظت‌های مختلف توکسین قارچ ورتیسیلیوم مربوط به ارقام گلستان و کوکر-۱۰۰ ویلت بود. رقم ساحل نیز با اختلاف کمی در این گروه قرار گرفت که نشان‌دهنده تحمل این ارقام در عصاره توکسین قارچ بود. در غلظت‌های مختلف توکسین نیز بیشترین رشد نسبی کالوس در محیط‌کشت بدون توکسین و کمترین میزان رشد نیز در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ درصد توکسین بود. همچنین با افزایش غلظت توکسین، رنگ کالوس‌ها تیره‌تر شد که نشان‌دهنده تاثیر غلظت بالاتر توکسین بود. نتایج نشان داد که در حضور توکسین عامل بیماری ورتیسیلیوم، میزان تحمل و زنده‌مانی کالوس رقم گلستان بیشتر از سایر ارقام بود.

منابع

Chaman Doosti, F. 2013. Effect of cotton *Verticillium dahliae* pathogenic fungal toxin on callus. 8th Conference of Biotechnology and the Fourth Conference on Biosafety. July 15-17. Tehran University. Code 137.

Chandra, R., Bajpai, A., Gupta, S. and Tiwari, R.K. 2004. Embryogenesis and plant regeneration from mesocarp of *psidium guajava* L. Indian. J. Biotechnol. 3: 246-248.

Culp, T.W., and Green, C.C. 1992. Comparative Performance of obsolete and current cultivars and PD germplasm lines of cotton extrafiber strength. Crop Sci; 32: 35-41.

Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Results. 50: 105-116.

Ghasemi Bezdi, K. 2012a. Evaluation of improvement in qualitative and quantitative characteristics of commercial cotton cultivar of Sahel during three years selection. The first international conference on science, industry and trade of cotton. Oct. 2-4, p: 187.

Ghasemi Bezdi, K. 2012b. Factors affecting success in cotton (*Gossypium* sp.) tissue culture. The first international conference on science, industry and trade of cotton. Oct. 2-4, p: 195.

Ghasemi Bezdi, K. 2012c. Reasons, reducing the area under cotton cultivation in Iran and necessary solutions for reducing the problems. The first international conference on science, industry and trade of cotton. Oct. 2-4, p: 161.

Ghasemi Bezdi, K. and Khandan, V. 2013. The effect of cold pre-treatment and hormonal agents on ovule callus formation in some cotton (*Gossypium* sp.) cultivars *in vitro*. J. Plant Production, 20(1): 89-106.

Mamaghani, M., Rahnama, K., Mashayekhi, K. and Haghighi, H. 2012. Application of culture filtrates of *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi* under *in vitro* condition as a bioassay to screen for disease tolerant *Ulmus parvifolia* and *Ulmus campestris*. J. Plant Production, 19(4): 117-136.

Masanori, K., Takanori, M., Yukiyoshi, K., Yoshimiki, A. And Tohru, S. 1993. Use of culture filtrates of verticillium dahliae as a bioassay for screening of disease tolerant eggplant. Plant Tissue culture Letters, 10(1): 71-74.

Mohammadi, Z.S., Davarian, T., Alishah, E., and Taheri, A.H. 2012. Evaluation of four commercial cotton cultivars reduction to vascular wilting disease (*Verticillium dahliae*). The first international conference on science, industry and trade of cotton. Oct. 2-4, p: 62.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Nasrollanejad, S., Mahmood Janloo, H. and Rahnama, K. 2007. Study on susceptible and resistance of commercial and advanced cotton cultivars to *Verticillium* wilt. J. Agric. Sci. Natur. Resour. Vol. 13(6), Feb-Mar.

Schnathorst, W.C. 1981. Life cycle and epidemiology of verticillium in: Fungal Wilt Diseases of Plants. M. E. Mace, A. A. Bell and C.H. Beckman. Academic Press. New York. 81-111.

Klosterman, J.S., Atallah, K.Z., Vallad, E.G. and Subbarao, V.K. 2009. Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. Annu. Rev. Phytopathol. 47: 39-62.

Zhang, L.Y., Zheng, X.H., Tang, H.L., Zhu, J.W. and Yang, J.M. 2003. Increase of beta 1,3 glucanase and citinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahliae*. Acta Botanica Sinica 45(7): 802-808.

Iranian Journal of Cotton Researches
Vol. 1, No. 2, 2014
www.jcri.ir

The influence of different concentrations of toxin fungus *Verticillium* on relative growth rate of callus in cotton cultivars

Kh. Mahdavian[1], K. Ghasemi Bezdi[*2] and H. Abbaspour[3]
[1]Graduated in Agricultural Biotechnology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
[2]Ph.D. in Agricultural Biotechnology, Cotton Research Institute of Iran (CRII),
[3]Ph.D. in Plant Physiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran.
Received: 2013/11/23 Accepted: 2014/3/9

Abstract

Verticillium disease is one of the most important cotton diseases which led to limitations in cultivation and yeild reduction. The study was used fungal toxin *Verticillium* as selection agent of cotton callus cells resistant. The explants were prepared from sterilized 7-days old cotton seedling and were cultured on MS medium with 2 mg/l of each growth regulators NAA and BAP in order to produce callus. Following the initial weighing , the resulting callus were transferred to the new media mid 0.5 mg/l of NAA and BAP concentrations with zero (control), 5, 10, 20, and 30 percent pathogen toxins, and after 3 weeks their relative growth was calculated. The highest relative callus growth was in non-toxin medium and the lowest one was in pathogen toxin concentrations of 20 and 30 percent. Golestan made more relative callus growth rate in non-toxin medium and the 5 percent toxin concentration, respectively, with 115.2, and 100 percent. Toxin concentrations of 20 and 30 percent showed the lowest relative growth rate of callus with 24.5 and 8 percent, respectively in Sahel cultivar. Golestan, Coker-100 wilt and Sahel calli that were green-white colored, didn't change in 5 and 10 percent of toxin concentrations but discolored to brown with concentration increasing. Callus of Hashemabad Native cultivar that was cream, discolored to brown in the range of toxins from 5 to 30 percent. In general, this color change indicates the effect of the toxin on the quality of calli. So this method can be accelerate the screening of tolerance plant with selection of suitable calli.

***Keywords*:** Cotton, Disease, Explant, *In vitro*, Nutrient medium, Tolerant.

Corresponding author; kghasemibezdi@yahoo.com