اثر ژنوتیپ، ریزنمونه و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر اندام‌زایی درون شیشه‌ای آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)

فهیمه میرزایی، ابراهیم دورانی* و علی بنده حق

تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی،گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

چکیده

در این پژوهش به منظور دستیابی به باززایی با فراوانی بالا در آفتابگردان، تأثیر پنج ژنوتیپ (رکورد، پروگرس، گابور، AF_{81}-196 A line وCMS19 A line)، بخش ابتدایی و انتهایی لپه و ۱۰ ترکیب تنظیم کننده رشد در اندام‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. بذور بدون پوسته ضدعفونی سطحی شد و روی محیط کشت ۱/۲MS بدون هورمون جوانه زد. هر لپه گیاهچه دو روزه از وسط بریده شد و سه ریزنمونه از هر بخش به محیط باززایی منتقل شد. محیط باززایی شامل محیط کشت MS غنی شده با دو سطح BAP (یک و دو میلی گرم در لیتر) در ترکیب با سه سطح از تنظیم کننده‌های NAA و IAA (صفر، نیم و یک میلی گرم در لیتر) بود. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه آماری نشان داد تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ، ریزنمونه و تیمارهای هورمونی برای دو شاخص اندام‌زایی شامل درصد باززایی و متوسط تعداد شاخساره در هر ریزنمونه وجود دارد. نتایج نشان داد که باززایی در آفتابگردان وابسته به ژنوتیپ است و بخش ابتدایی لپه پتانسیل بیشتری برای شاخه‌زایی داشت. ژنوتیپهای CMS19 و پروگرس با درصد شاخه‌زایی به ترتیب ۵۲/۲۱ و ۴۲/۲۱ درصد بهترین ژنوتیپهای پاسخ دهنده به کشت درون شیشه‌ای بودند و ترکیب دو میلی گرم در لیتر BAP با یک میلی گرم در لیتر IAA بیشترین میزان شاخه‌زایی را داشت.

واژه های کلیدی: آفتابگردان، اندام‌زایی، تنظیم کننده های رشد گیاهی، ریزنمونه، ژنوتیپ

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۳۹۲۰۳۱-۰۴۱ ، پست الکترونیکی: uliaie@yahoo.com

مقدمه

با وجود افزایش تولید مواد غذایی هنوز نزدیک به یک میلیارد نفر از جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه دچار سوءتغذیه هستند (۱۷). پیش بینی می‌شود برای پاسخگویی به تقاضای روزافزون جمعیت تا سال ۲۰۵۰، تولید جهانی مواد غذایی باید تا ۷۰ درصد افزایش یابد (۱۸). رشد سریع جمعیت جهان تأمین امنیت غذایی را با چالشهای فزآینده‌ای روبرو کرده است. تأمین امنیت غذایی برای این جمعیت در حال رشد تنها از طریق کشاورزی سنتی غیر ممکن خواهد بود و بیوتکنولوژی گیاهی در کنار سایر روشهای به نژادی و به زراعی پتانسیل قابل توجهی برای تحقق بخشیدن به این هدف را ارائه می‌دهد (۱۴).

آفتابگردان از خانواده کمپوزیته است که در میان گیاهان صنعتی با محتوای روغن بالا، دارای اهمیت زیادی است. روغن آفتابگردان نسبت به سایر روغنهای گیاهی حاوی درصد بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشد و به دلیل کیفیت بالا و غنی بودن از اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک و همچنین ویتامین E و ۲۰ درصد پروتئین به عنوان روغن غذایی مورد پذیرش همگان است (۱۲). علاوه بر آن به عنوان ماده خام در تولید روغن بیودیزل

مفید است. تبدیل روغن آفتابگردان به روغن بیودیزل اخیراً توسعه یافته است در نتیجه ضرورت دسترسی به روغن آفتابگردان با کیفیت خوب در حال افزایش است (۱۹). کارآیی اکسیداتیو بالای اسید اولئیک و محتوای بسیار پایین اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه همراه با محتوای پایین اسید استئاریک آن را برای اهداف صنعتی از قبیل ساخت لوازم آرایشی، دارو، مواد شوینده، گریس در فلزکاریها مناسب کرده است (۱ و ۱۱).

افزایش روغن، بهبود کیفیت تغذیه‌ای آن، مقاومت به بیماریها و آفات هدف اصلی برنامه‌های اصلاحی آفتابگردان از طریق دست ورزی ژنتیکی می‌باشد (۷). صفات مهم مقاومت به آفات و بیماریها و همچنین تحمل به شوری و خشکی موجود در خویشاوندان آفتابگردان می‌تواند به عنوان منبع با ارزشی برای اصلاح ارقام زراعی محسوب شود. متأسفانه استفاده از ژنهای مفید گونه‌های وحشی به دلیل وجود موانع طبیعی تلاقی محدود شده است (۲۳).

برای اصلاح ژنتیکی صفات مختلف آفتابگردان می‌توان از روشهای بیوتکنولوژی گیاهی از جمله امتزاج پروتوپلاست ها یا روشهای مختلف انتقال ژن، به عنوان مکمل روشهای کلاسیک استفاده نمود. کارآیی تمام این روشها مشروط به باززایی کارآمد درون شیشه‌ای گیاه است. بنابراین در راستای توسعه به کارگیری روشهای بیوتکنولوژی در آفتابگردان، توانایی باززایی گیاه از بخشی از سلولها حائز اهمیت است (۲۴). متاسفانه گزارشات نشان داده‌اند که بسیاری از ژنوتیپهای آفتابگردان در باززایی مشکل دارند (۶). گزینش ژنوتیپهای پاسخ‌دهنده به کشت بافت از راهبردهای عملی برای حل این مشکل است.

در سالهای اخیر روشهای باززایی مناسبی برای آفتابگردان ایجاد شده است. دو روش باززایی اصلی برای آفتابگردان اندام‌زایی (۵) و جنین‌زایی سوماتیکی (۱۶) است. از بین ریز نمونه های مورد استفاده برای اندام زایی در آفتابگردان، استفاده از ریزنمونه های لپه و زیر لپه پاسخ بهتری را می‌دهد (۶). از عوامل دیگر تعیین کننده در موفقیت کشت بافت آفتابگردان نوع و میزان هورمونهای گیاهی می‌باشد. دو هورمون NAA و BAP برای اندام‌زایی از کوتیلدون‌های بالغ و نابالغ آفتابگردان استفاده می‌کند (۶). غلظت خاص تنظیم کننده‌های گیاهی مورد نیاز برای تشکیل کالوس از ژنوتیپی به ژنوتیپ دیگر متفاوت و حتی می‌تواند وابسته به منبع ریزنمونه نیز باشد (۸).

برای به دست آوردن یک روش قابل تکرار در جهت رسیدن به گیاه کامل از طریق کشت بافت در آفتابگردان عواملی از قبیل ژنوتیپ، غلظت و نوع تنظیم کننده‌های رشد، مواد تکمیل کننده آلی و همچنین مواد آنتی اکسیدانت دخیل می‌باشد. اصلاح فاکتورهای محیطی در آزمایشگاه مثل تنظیم کننده رشد می‌تواند پتانسیل باززایی گیاه را در ژنوتیپها بهبود بخشد. هدف از این پژوهش انتخاب ژنوتیپ و ریزنمونه مناسب و بررسی انواع غلظتهای مختلف تنظیم کننده‌های رشد در بهینه سازی کشت بافت آفتابگردان می‌باشد.

مواد و روشها

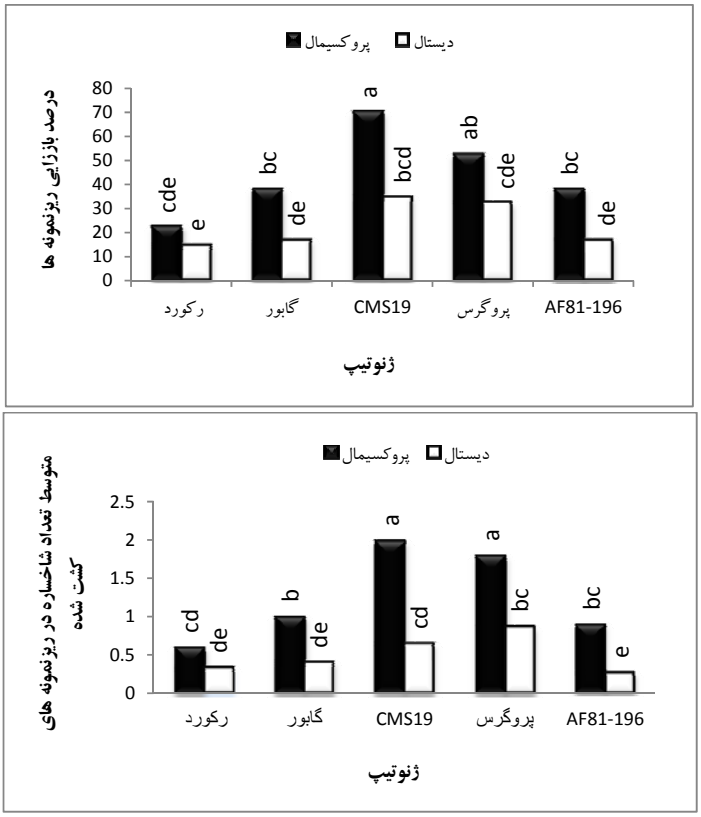
در این تحقیق بذور سه رقم روغنی آفتابگردان شامل رکورد، پروگرس و گابور و دو لاین والد هیبرید شامل AF_{81}-196 A line و CMS19 A line از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. جهت ضد عفونی سطحی بذور، پریکارپ بذور حذف شد. بذور در داخل ظروف استریل به مدت سه دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفت و بعد از یک بار شستشو با آب مقطر استریل از هیپوکلریت سدیم سه درصد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. پس از این زمان بذور با استفاده از آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شد. مراحل شستشو و ضدعفونی بذور تماماً زیر هود انجام گردید. برای تهیه ریزنمونه هر بذر جوانه زده از دو محل عمود بر محور طولی بریده شد. نخستین برش تقریباً در فاصله دو میلی

متری از انتهای ابتدایی با حذف کامل رویان انجام شد برش دوم در وسط کوتیلدون‌ها به طور عرضی صورت گرفت و در هر پتری‌دیش سه ریزنمونه بخش ابتدایی لپه (Proximal) و سه ریزنمونه بخش انتهایی لپه (Distal) در محیط کشت MS غنی شده با دو سطح BAP (یک و دو میلی گرم در لیتر) در ترکیب با سه سطح از تنظیم کننده-های NAA و IAA (صفر، نیم و یک میلی گرم در لیتر) قرار داده شد. به منظور بررسی اثر عوامل مؤثر در اندام-زایی، آزمایشی در قالب آزمایش فاکتوریل سه عاملی (ژنوتیپ، ریزنمونه و ترکیب تنظیم کننده رشد) در سه تکرار پیاده شد. پس از یک ماه درصد باززایی و متوسط تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های کشت شده یادداشت شد. تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن و LSD بر حسب مورد به وسیله نرم افزار SPSS16 انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ژنوتیپ، ریزنمونه و ترکیب تنظیم کننده‌های رشد بر روی صفات مورد اندازه گیری معنی‌دار بود. علاوه بر آن اکثر اثرات متقابل نیز برای حداقل یکی از صفات مرتبط با اندام‌زایی معنی‌دار بودند.

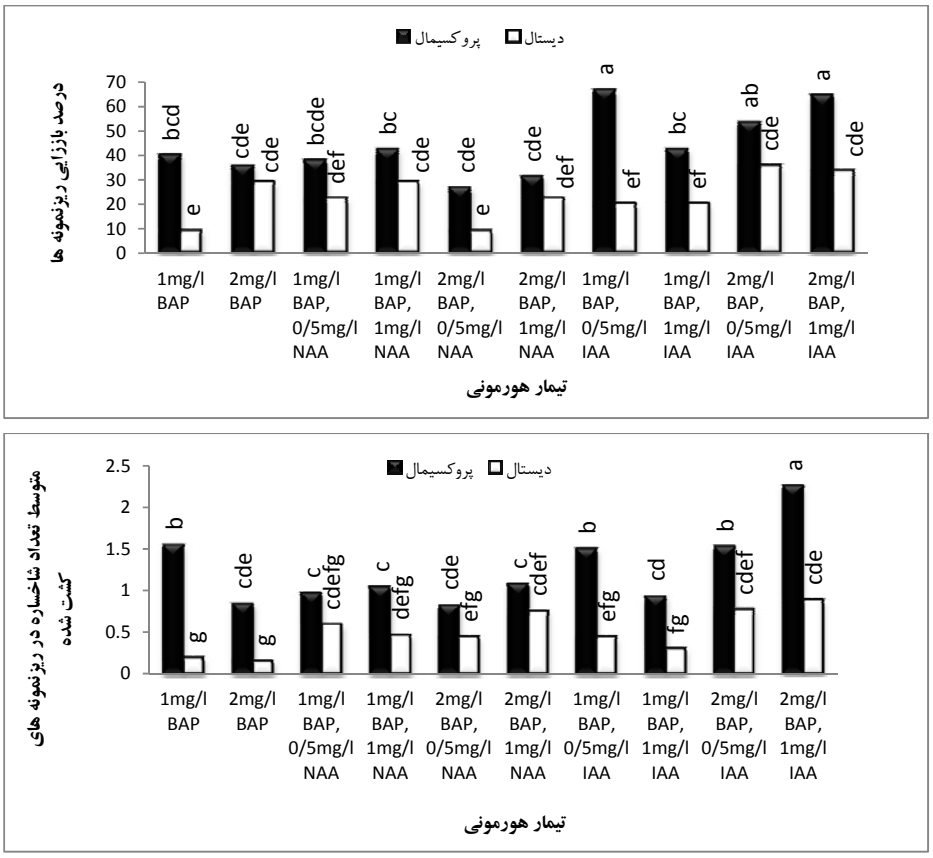
بررسی ترکیبات تیماری ژنوتیپ در ریزنمونه برای صفت درصد باززایی (شکل ۱) نشان داد که در همه ارقام به جز رقم رکورد میزان باززایی در دو ریزنمونه متفاوت و بخش ابتدایی لپه بهتر از بخش انتهایی لپه بود.



شکل ۱- تأثیر نوع ریزنمونه و ژنوتیپ بر درصد باززایی و متوسط تعداد شاخساره در کشت درون شیشه‌ای آفتابگردان.
حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن با سطح احتمال ۰/۰۵ می باشد.

در حالت کلی بیشترین درصد باززایی از دو رقم CMS19 و پروگرس با استفاده از بخش ابتدایی لپه و کمترین درصد باززایی نیز از بخش انتهایی لپه در ژنوتیپهای دیگر به دست آمد. مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ژنوتیپ در ریزنمونه برای صفت متوسط تعداد شاخساره نشان داد که به جز رقم رکورد تعداد شاخساره بین دو نوع ریزنمونه متفاوت بود و بخش ابتدایی لپه تعداد شاخساره بیشتری تولید کرد (شکل ۱). در حالت کلی بالاترین میزان شاخه‌زایی مربوط به ژنوتیپ CMS19 و پروگرس با استفاده از بخش ابتدایی لپه و کمترین میزان آن نیز مربوط به بخش انتهایی لپه در سایر ژنوتیپها بود.

مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ریزنمونه با تیمار هورمونی (اثر متقابل ریزنمونه در تیمار هورمونی) برای صفت درصد باززایی (شکل ۲) نشان داد که در داخل تیمارهای تنظیم کننده رشدی BAP در ترکیب با NAA دو بخش ابتدایی و انتهایی لپه اختلافی با هم نداشتند، ولی در ترکیب BAP با IAA بین دو نوع ریز نمونه اختلاف معنی داری وجود داشت و بخش ابتدایی لپه بهتر بود.



شکل ۲- درصد باززایی و متوسط تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های کشت شده تحت تیمارهای هورمونی مختلف در آفتابگردان.

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن با سطح احتمال ۰/۰۵ می باشد.

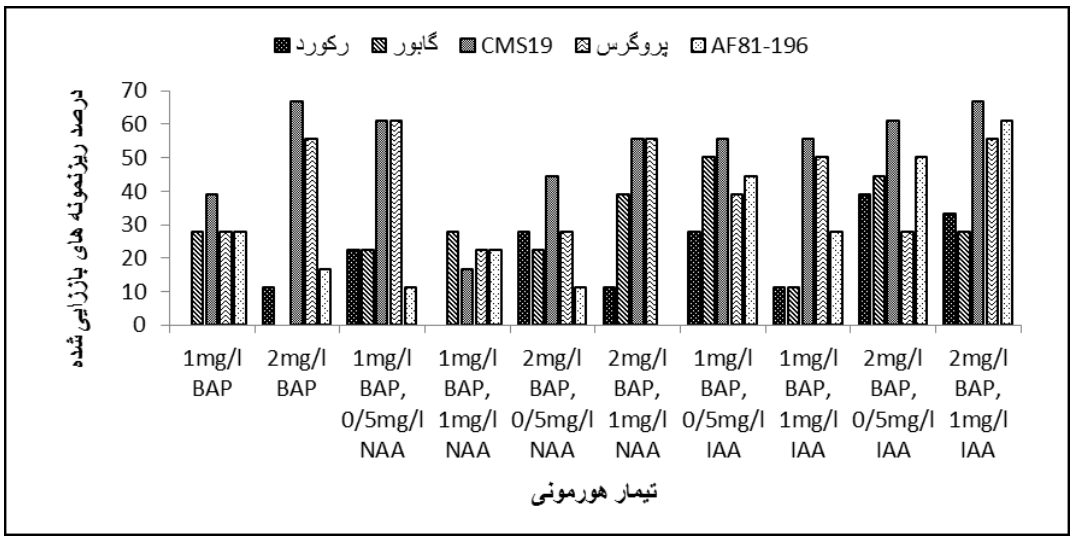
ترکیب NAA با BAP در مقایسه با استفاده از آن به تنهایی اثر معنی داری در درصد شاخه زایی ارقام مورد استفاده نداشت. ولی ترکیب اکسین IAA با BAP درصد شاخه زایی و همچنین تعداد شاخساره از هر ریز نمونه را به ویژه در بخش ابتدایی لپه افزایش داد و در کل بیشترین درصد شاخه زایی از ترکیبات یک میلی گرم در لیترBAP با نیم میلی گرم در لیتر IAA و دو میلی گرم در لیتر BAP با یک میلی گرم در لیتر IAA به دست آمد. ریزنمونه‌های کشت شده در محیط کشت حاوی ترکیب BAP با NAA از نظر صفت متوسط تعداد شاخساره اختلاف معنی داری وجود

نداشت ولی استفاده از ترکیب BAP با IAA منجر به اختلاف معنی دار بین دو ریز نمونه از نظر تعداد شاخساره شد. بالاترین تعداد شاخساره مربوط به بخش ابتدایی لپه در تیمارهای هورمونی دو میلی گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی گرم در لیتر IAA بود. استفاده از یک میلی گرم در لیتر BAP نسبت به دو میلی گرم در لیتر آن چه در تیمار های مستقل و چه در تیمارهای ترکیب با اکسین بهتر بود. ترکیب یک به یک و یک به دوی BAP به NAA تفاوت معنی داری در درصد شاخه زایی و همچنین تعداد متوسط شاخه برای هر ریز نمونه نداشت، ولی ترکیب دو به یک آن با IAA برای هر دو شاخص اندام زایی در مقایسه با سایر ترکیبات بهترین نتایج را نشان داد (شکل ۲). علاوه بر اثر متفاوت تنظیم کننده های رشدی مختلف بر کمیت شاخه زایی، کیفیت شاخه های باززایی شده در ترکیبات مختلف نیز متفاوت بود. حضور NAA در محیط کشت موجب شیشه ای شدن بیشتر شاخساره های باززا شده گردید (شکل ۵- ج) ولی شاخسار های به دست آمده در حضور به تنهایی BAP یا در ترکیب باIAA ظاهری خشبی تر و سرحال تر داشتند ولی شاخساره های حاصل شده از محیط کشت تکمیل شده با BAP در ترکیب با IAA بسیار قوی تر بودند (شکل ۵- ب و د).

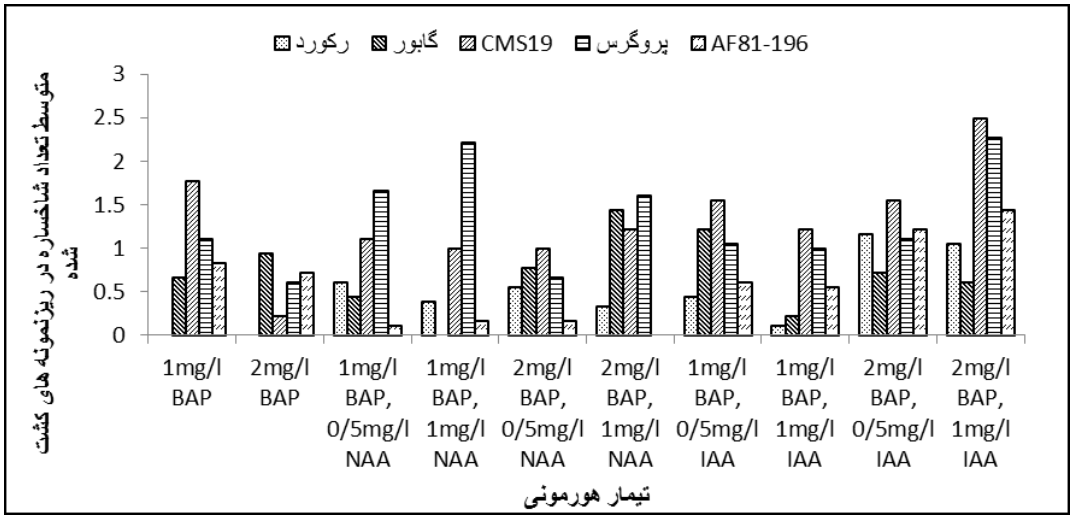
رفتار ارقام در ترکیبات متفاوت تنظیم کننده‌های رشد یکسان نبود و بین رقم و ترکیب محیط کشت اثرات متقابل وجود داشت. این اثرات تا حدی شدید بود که برخی رقمها در برخی ترکیبات قادر به اندام زایی نبودند. بیشترین درصد باززایی مربوط به ژنوتیپ CMS19 در تیمارهای دو میلی گرم در لیتر BAP و دو میلی گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی گرم در لیتر IAA بود. بیشترین تعداد شاخساره در رقم CMS19 در تیمار هورمونی دو میلی گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی گرم در لیتر IAA بود و رقم رکورد در اکثر ترکیبات تنظیم کننده رشد گیاهی کمترین پاسخ را داشت (شکل ۳).

بحث

در این مطالعه یک روش ساده و با تکرار پذیری بالا برای اندام‌زایی درون شیشه‌ای در آفتابگردان به دست آمد و گیاهان باروری از ریزنمونه لپه تولید شد (شکل ۴). اندام-زایی درون شیشه ای علاوه بر ژنوتیپ تحت تأثیر ماهیت و مرحله رشد و نمو ریزنمونه (۱۳)، تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (۲) و تعامل ژنوتیپ با ترکیب محیط کشت (۲ و ۲۴) نیز قرار می‌گیرد. فاکتورهای محیطی و فیزیولوژیکی مؤثر بر منبع ریزنمونه نیز در توانایی باززایی نقش دارند (۲۲).



شکل ۳- درصد باززایی ریزنمونه‌ها در پنج ژنوتیپ آفتابگردان تحت تیمارهای هورمونی مختلف LSD = ۳۱/۷۴



شکل ۴ – متوسط تعداد شاخساره در ریزنمونه‌های کشت شده در پنج ژنوتیپ آفتابگردان تحت تیمارهای هورمونی مختلف

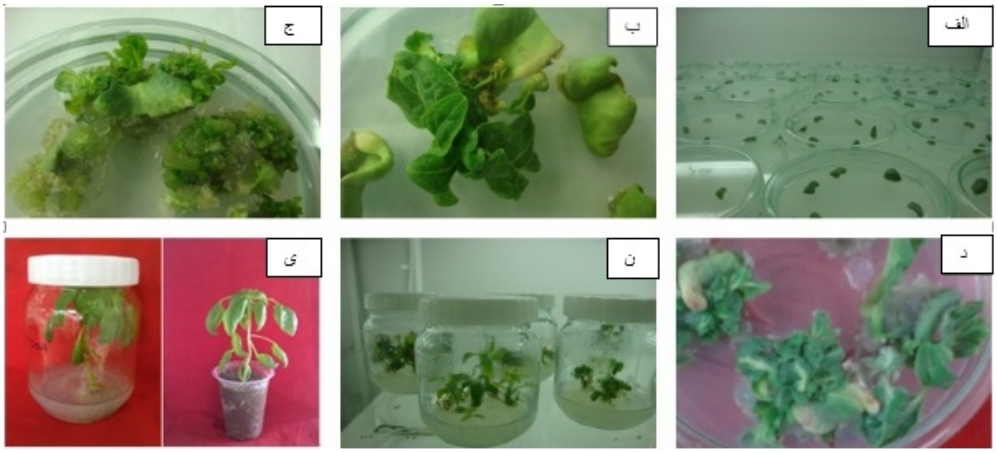
LSD = ۰/۸۵۵

نتایج تجزیه واریانس نشان داد تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپها از نظر درصد باززایی و متوسط تعداد شاخساره وجود داشت. باززایی در این ژنوتیپها از ۵۲/۲۱-۱۸/۳۳ درصد و متوسط تعداد شاخساره از ۱/۳۳- ۰/۴۶ عدد متغیر بود. در بین ژنوتیپها، CMS19 و پروگرس بیشترین تمایل را به باززایی داشتند که نشان می‌داد باززایی و تعداد شاخساره در آفتابگردان متغیر و وابسته به ژنوتیپ و تحت کنترل عوامل ژنی است. این نتیجه موافق با نتایج دیگر پژوهشگران است به عنوان مثال کرایبی و همکاران (۱۹۹۱) تفاوتهای ژنوتیپی را با فراوانی حداقل صفر برای ۱۵ رقم از ۳۰ رقم و حداکثر ۷۰ درصد برای یکی از هیبریدهای مورد مطالعه گزارش کردند (۹). پاور (۱۹۸۷) تفاوتهای ژنتیکی برای تولید شاخساره در ریزنمونه‌های لپه را با یک لاین اینبرد نر ناموفق در تولید ساقه و لاین اینبرد ماده با درصد باززایی ۵۰ تا ۷۰ درصد گزارش کرده است (۲۲). در مطالعات فلورس بریوس و همکاران (۱۹۹۹) تنوع ژنتیکی برای درصد باززایی و تعداد شاخساره در هر ریزنمونه در ۱۴ رقم مشاهده شد (۱۴). داقوستو و همکاران (۲۰۰۸) باززایی در پنج ژنوتیپ از هفت ژنوتیپ با فراوانی ۲۸/۶– ۲/۸ درصد را گزارش کردند (۱۰).

از عوامل تعیین کننده در کشت اینویترو گیاهان نوع ریز نمونه مورد استفاده می باشد (۱ و ۳). در میان ریزنمونه‌های مختلف آفتابگردان ریزنمونه لپه به خاطر در دسترس بودن آن در تمام طول سال، سهولت شروع و استقرار کشت، قابل استفاده در طیف وسیعی از ژنوتیپها مناسب ترین ریزنمونه محسوب می‌شود. نظر به اینکه سایر ریزنمونه ها در کشت درون شیشه ای در مطالعات انجام شده موفقیتی نداشت در این مطالعه از آنها استفاده نشد گزارشات فراوانی باززایی از بخش انتهایی لپه کم و ساقه‌های تولیدی از آنها کوچکتر از بخش ابتدایی لپه موجود است (۴و۶). در این مطالعه نیز درصد باززایی بخش ابتدایی لپه بهتر از بخش انتهایی لپه بود به طوری که میانگین باززایی در بخش ابتدایی لپه ۴۲/۹۹ و در بخش انتهایی ۲۲/۸۸ درصد بود.

در مطالعات قبلی تحریک ریخت‌زایی در آفتابگردان همواره از طریق مسیرهای اندام‌زایی یا جنین‌زایی با استفاده از BA به صورت جداگانه یا در ترکیب

با NAA موفقیت آمیز بوده است (۴، ۱۶، ۲۰ و ۲۱). استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی دیگر مانند Kin، IAA و گلوتأمین(۲۶)؛ Kin و IAA (۲۰)؛ فنیل استیک اسید و BA (۹)؛ BAP و IAA (۵) نیز در ریخت‌زایی مؤثر گزارش شده است. به همین دلیل در این پژوهش ترکیب BAP به صورت جداگانه و در ترکیب با NAA و IAA در غلظتهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت و تأثیر آنها بر باززایی و تولید شاخساره مطالعه شد تا تیمارهای هورمونی مؤثر مشخص شود. تولید تعداد زیاد شاخساره از جهت ایجاد چندین جایگاه هدف برای اهداف انتقال ژن مناسب است، چرا که به دنبال تراریختی و گزینش بر روی یک محیط انتخابی تعداد شاخساره در هر ریزنمونه کاهش خواهد یافت و در نتیجه رقابت میان شاخه‌های متمایز شده کم و رشد ساقه‌ها بهتر خواهد شد (۲۵). این پژوهش نشان داد BAP در ترکیب با IAA نسبت به NAA تأثیر بهتری در اندام‌زایی دارد و تیمار هورمونی دو میلی گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی گرم در لیتر IAA بیشترین تأثیر را نسبت به بقیه تیمارهای هومونی در اندام‌زایی نشان داد (شکل ۴).



شکل ۵- مراحل اندام‌زایی از ریزنمونه لپه آفتابگردان. الف) کشت کوتیلدون‌ها در محیط باززایی حاوی تیمارهای هورمونی مختلف؛ ب) باززایی در محیط حاوی BAP؛ ج) باززایی در محیط حاوی BAP در ترکیب با NAA؛ د) باززایی در محیط حاوی BAP در ترکیب با IAA؛ ن) انتقال ساقه‌های باززا شده به محیط ساقه‌زایی؛ ی) انتقال ساقه های طویل شده به محیط ریشه زایی و ساقه‌های ریشه دار شده به خاک.

منابع

۱ – اطرشی، م. و مرادی ک. ۱۳۹۳. بررسی کالوس زائی و اندام زائی غیرمستقیم گیاه فلفل دلمه ای (*Capsicum annuum* L.). در شرایط کشت درون شیشه ای. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۷. صفحات ۳۴۶– ۳۵۵

۲ – کرمزاد، ژ.، فرشادفر، م.، زبرجدی، ع. و ذوالنوریان، ح. ۱۳۹۴. بررسی اثر غلظتهای مختلف توفور دی و کینیتین بر کالزایی گیاه سیب زمینی واریته آگریا (*Solanum tuberosum* L.). مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد، ۲۸، شماره ۲: صفحات ۳۱۶–۳۲۵

۳ – گردکانه، م. و ارجی، ع. ۱۳۹۳. اثر NAA و ریزنمونه اندامهای مختلف بر جنین زایی ثانویه توت فرنگی. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۳: صفحات ۵۰۱ – ۵۱۰

4- Abdoli, M., Moieni, A. and Dehghani, H. 2003. Effects of genotype and cotyledon

section on organogenesis in sunflower. Iranian Journal of Biotechnology 1: 234-238.

5- Azadi, P., Moieni, A. and Ahmadi, M. R. 2002. Shoot organogenesis from cotyledons of sunflower. Helia 25: 19-26.

6- Baker, C. M., Munoz-Fernandez, N. and Carter, C. D. 1999. Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 39-49.

7- Cantamutto, M. and Poverene, M. 2007. Genetically modified sunflower release: Opportunities and risks. Field Crops Research 101: 133-144.

8- Chraibi, K. M. B., Castelle, J. C., Latche, A., Roustan, J. P. and Fallot, J. 1992. A genotype–independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) The role of ethylene. Plant Science 89: 215-221.

9- Chraibi, K. M. B., Latche, A., Roustan, J. P. and Fallot, J. 1991. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of Helianthus annuus by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. Plant Cell Reports 10: 204-207.

10- Dagustu, N., Fraser, P., Enfissi, E, and Bramley, P. 2008. Screening for high callus induction and Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Biotechnology and Biotechnological Equipment 22: 933-937.

11- Dorrell, D. G. and Vick, B. A. 1997. Properties and processing of oilseed sunflower. *In:* Schneiter, A. A. (ed), Sunflower technology and production. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp: 709-745.

12- Elavazhagan, T., Jayakumar, S., Chitravadivu, C. and Balakrishnan, V. 2009. In vitro Culture and Cytological Studies on *Helianthus annus* L. Botany Research International 2: 258-262.

13- Espinasse, A., Lay, C. and Volin, J. 1989. Effects of growth regulator concentrations and explant size on shoot organogenesis from callus derived from zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 17: 171-181.

14- Fedoroff, N. V. 2010. The past, present and future of crop genetic modification. New Biotechnology 27: 461-465.

15- Fick, M. and Miller, F. 1997. Sunflower breeding. In: Schneiter, A.A., (ed). Sunflower technology and production. Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp: 45-945.

16- Fiore, M. C., Trabace, T. and Sunseri, F. 1997. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 16: 295-298.

17- Godfray, H. C. J., Beddington, R. J., Crute I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir J. F., Pretty, J., Robinson, Sh., Thomas, S. M. and Toulmin, T. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. Science 327: 812-818.

18- Hazell, P. and Wood, S. 2008. Drivers of change in global agriculture. Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences 363: 495–515.

19- Ikeda, M. Matsumura, M. and Kamada, H. 2005. Suitability of small and branching sunflower varieties and theit transformation by *Agrobacterium* infection. Plant Biotechnology 22: 97-104.

20- Knittel, N., Escandon, A. S. and Hahne, G. 1991. Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. Plant Science 73: 219-229.

21- Paterson, K. E. and Everett, N. P. (1985) Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. Plant Science 42: 125-132.

22- Power, C. J. 1987. Organogenesis from *Helianthus annuus* inbreds and hybrids from the cotyledons of zygotic embryos. American Journal of Botany 74: 497-503.

23- Pugliesi, C., Cecconi, F., Mandolfo, A. and Baroncelli, S. 1991. Plant regeneration and genetic variability from tissue culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Breeding 106: 114-121.

24- Sarrafi, A., Bolandi, A. R., Serieys, H., Berville, A. and Alibert, G. 1996. Analysis of cotyledon culture to measure genetic variability for organogenesis parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Science 121: 213-219

25- Sujatha, M., Vijay, Sh., Vasavi, S., Sivaraj, N. and Rao, S. C. 2012. Combination of thidiazuron and 2-isopentenyladenine promote highly efficient adventitious shoot regeneration from cotyledons of mature sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 111: 359-372

26- Vega, T. A., Nestares, G. M., Pratta, G., Zorzoli, R., Gattuso, S. and Picardi, L. 2007. Biochemical and histological changes associated with in vitro responses in sunflower cotyledonary explants. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 43: 415-422.

Effect of genotype, explant and plant growth regulators on in-vitro organogenesis of sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Mirzai F., Dorani uliaie E. and Bandeh Hagh A.

Plant Breeding and Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

In this study in order to achieving high frequency regeneration of sunflower effect of genotype (Record, Progress, Gabor, AF81-196 A line and CMS19 A line), Proximal and Distal section of the cotyledon explant and 10 plant growth regulator combination have been investigated. Seeds without pericarps were surface sterilized and germinated on half strength MS basal medium. Cotyledons from 2-day old seedling were cut from the middle and three explants of each section were transferred to regeneration medium. Regeneration medium consisted of full strength MS medium supplemented with two levels of BAP (1 and 2 mg/l) in combination with three levels of NAA and IAA (0, 0/5 and 1 mg/l). Experiment was conducted in a factorial completely randomized design with three replications. Statistical analysis showed that there were significant differences among the genotypes, explant and plant growth regulator treatments on both organogenesis parameters including regeneration rate and the average number of shoots per explant. Our results showed that the shoot regeneration in sunflower is genotype-dependent, and proximal section of cotyledon explant was greater potential for shooting. CMS19 and Progress were the best responding genotypes with a regeneration rate of 51/21% and 41.21%, respectively. The highest rate of shoot regeneration was observed with 2 mg/l BAP in combination of l mg/l IAA.

Key words: Sunflower, organogenesis, plant growth regulators, explant, genotype