دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی کالوس زایی و جنین زایی سوماتیکی در پنبه

ل. فهمیده[۱]، غ. ع. رنجبر[۲]، ع. عالیشاه[۳] و ن. ع. بابائیان جلودار[۴]

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکترای، دانشیار و استاد دانشگاه علم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار مؤسسه تحقیقات پنبه کشور گرگان

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۷

چکیده

بهینه سازی روش های باززایی در پنبه با استفاده از تکنیک کشت بافت در اصلاح و تولید موفق ارقام پنبه های تراریخت ضروری به نظر می رسد. جهت بررسی کال زایی در پنبه، ۳ ژنوتیپ (۳۴۹، 4-S-4 و C1211) به همراه ژنوتیپ شاهد (کوکر ۳۱۲) انتخاب گردید و آزمایشی با استفاده از آزمایش فاکتوریل بر مبنای طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در مؤسسه تحقیقات پنبه گرگان در سال ۱۳۸۹ انجام شد. ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی این ژنوتیپ ها به دو نوع محیط کشت MSB (شامل نمک های MS و ویتامین های B5)، MSB_1 همراه با 2,4-D ($0/1\ mgl^{-1}$)، کینتین ($0/1\ mgl^{-1}$) و کلرید منیزیم ($0/75\ gl^{-1}$) و MSB_2 به اضافه NAA ($1\ mgl^{-1}$) منتقل شدند. کشت ها به اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲±۲۸ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس به منظور القای کال زایی منتقل شدند. در محیط کشت دارای 2,4-D و کینتین ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی ژنوتیپ 4-S-4 زودتر از سایر ژنوتیپ ها شروع به کال زایی کردند. درصد کال زایی ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ 4-S-4 در هر دو محیط بیشتر از سایر ژنوتیپ ها بود. کال های تولید شده کلیه ژنوتیپ ها، از ریزنمونه هیپوکوتیل در هر دو محیط و برگ کوتیلدونی در محیط MSB_1، عمدتاً جنین زا بودند. ریزنمونه های برگ کوتیلدونی تمامی ژنوتیپ ها در محیط MSB_2 شروع به ریشه زایی کرده ولی کالوسی تولید نکردند. کال های تولید شده جهت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها به محیط MSB به اضافه کلریدمنیزیم ($0/75\ gl^{-1}$) و نیترات پتاسیم ($1/9\ gl^{-1}$) انتقال یافتند. سپس جنین های سوماتیکی بدست آمده به محیط باززایی منتقل و از ژنوتیپ های 4-S-4، ۳۴۹ و کوکر۳۱۲، گیاهچه باززا شده دارای ریشه تولید گردید.

واژه های کلیدی: پنبه، کشت بافت، ریزنمونه، کالوس، جنین سوماتیکی

مقدمه

پنبه گیاهی است که باززایی بیشتر ژنوتیپ های تجاری آن از طریق جنین زایی سوماتیکی یا سوسپانسیون سلولی، نسبت به سایر گیاهان مشکل است و قابلیت باززایی آن توسط جنین زایی سوماتیکی به مقدار زیادی وابسته به ژنوتیپ می باشد (۴ و ۱۵). در پنبه، باززایی در تعداد معدودی از ژنوتیپ ها مانند

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

کوکر ۳۱۲ گزارش گردیده و در ژنوتیپ‌های مختلف نیز تنوع زیادی از لحاظ باززایی دیده شده است (۲۲). اولین مشاهده جنین سوماتیکی پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) توسط پرایس و اسمیت (۱۵) در کشت سوسپانسیون سلولی یک گونه وحشی پنبه گزارش گردیده است. جنین‌ها پس از یک پیش کشت کالوس در محیط محتوی ۲-ip تشکیل شدند. جنین‌های کوچک تولید ریشه و برگ‌های کوچک کردند، ولی گیاه باززایی شده‌ای گزارش نگردید. دیویدونیس و همیلتون (۳) اولین باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی را از کال‌های دوساله رقم کوکر ۳۱۰ در محیط کشت بدون هورمون گزارش کردند.

ژانگ و همکاران (۲۲) در آنالیز ژنتیکی هیبریدهای پنبه دریافتند که ژنوتیپ اثر معنی‌داری روی کال‌زایی ندارد، ولی تأثیر بسیار معنی‌داری روی قابلیت جنین‌زایی و باززایی ایفاء می‌کند. فیروزآبادی و دبوئر (۵) در بررسی قابلیت باززایی ژنوتیپ‌های مختلف پنبه به این نتیجه رسیدند که رقم کوکر ۳۱۲ که قابلیت کال‌زایی و باززایی مناسبی دارد، امکان تولید گیاهچه در طی ۸-۷ ماه وجود دارد در حالیکه در برخی دیگر از ژنوتیپ های پنبه امکان تولید گیاهچه از طریق واکشت‌های مختلف و در طی ۱۱-۱۰ ماه امکان‌پذیر خواهد بود. ماندش‌وار (۱۲) در بررسی قابلیت باززایی ژنوتیپ‌های مختلف کوکر به این نتیجه رسید که قابلیت باززایی بین ریزنمونه‌های مختلف و همچنین ارقام مختلف متفاوت است. به علاوه اینکه حتی زمان انتخاب ریزنمونه از گیاهچه‌های مختلف نیز در باززایی گیاهان مؤثر می‌باشد. کومار و پانتال (۹) نیز با استفاده از هیپوکوتیل به عنوان ریزنمونه نتایج خوبی گرفته و اعلام داشتند در بین ارقام زراعی اختلافات زیادی از نقطه نظر قابلیت کال‌زایی و باززایی دیده می‌شود و در گیاهانی که هر دو قابلیت دیده می‌شود، امکان تولید گیاهچه در طی مدت ۷-۶ ماه وجود خواهد داشت.

رستگاری و حسینی‌نژاد (۱۶) با بررسی ریزنمونه‌های مختلف در ۴ رقم از پنبه‌های زراعی ایران گزارش کردند که ریزنمونه ریشه هیچگونه کالوسی تولید نکرده و مقدار کال تولید شده از کناره‌های برگ نیز بسیار کم بود و تنها کشت هیپوکوتیل مقدار قابل توجهی کال تولید کرد. این محققین تنوع مورفوتیپی در بافت‌های سوماکلون و اختلاف احتمالی از نظر باززایی در ژنوتیپ‌های پنبه ایران را نیز گزارش نمودند. گروسی و همکاران (۶) کال‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی را در تعدادی از ارقام پنبه بررسی کردند. آنها ریزنمونه هیپوکوتیل ارقام ساحل، ورامین و کوکر ۳۱۲ را در دو نوع محیط کشت MS (۱۳) کشت کردند و صفاتی چون شروع کال‌زایی، حجم کال و درصد کال‌زایی، تعداد جنین‌های سوماتیکی تولید شده و جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی ارقام را با یکدیگر مقایسه نمودند.

شیدایی و همکاران (۱۷) سه رقم پنبه تتراپلوئید را در شرایط درون شیشه کشت و پس از باززایی گیاهان و انجام بررسی‌ها، تفاوت‌های معنی‌داری در خصوصیات مورفولوژیکی چون طول جوانه و تعداد برگ‌ها مشاهده نمودند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

از آنجا که اغلب مطالعات باززایی موفق در پنبه روی رقم کوکر۳۱۲ و لاین های وابسته به آن انجام گرفته است، لذا جهت گسترش پنبه‌های ترانسژنتیک و استفاده از دست ورزی‌های ژنتیکی در این گیاه، ضرورت بهینه سازی شرایط کشت بافت و افزایش قابلیت باززایی مستقل از ژنوتیپ، در ارقام پنبه ایران احساس می شود. در این مطالعه قابلیت کال‌زایی و رفتار کال‌های تولید شده در شرایط درون شیشه و در سطح محیط کشت‌های مختلف چندین ژنوتیپ برتر پنبه کشور، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی، ضدعفونی و کشت بذر

در این مطالعه از رقم کوکر ۳۱۲ و ژنوتیپ های ۳۴۹، C1211 و 4-S-4 که بذر آنها از مؤسسه تحقیقات پنبه گرگان تهیه شده بود، استفاده شد.

بذرها پس از الیاف‌زدایی، ابتدا با اتانل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و سپس در محلول هیپوکلریدسدیم ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد از ضدعفونی سطحی، بذرها ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو و درون ظروف شیشه‌ای استریل دارای درب محکم و حاوی آب مقطر استریل به مدت دو روز نگهداری و سپس در محیط 1/2MS با PH: ۵/۶-۵/۸ کشت شدند. کشت‌ها درون اتاقک رشد در دمای۲±۲۸ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

کشت ریزنمونه ها و روش مورد استفاده

هفت تا چهارده روز بعد از کشت بذر روی محیط 1/2MS، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (۵-۴ میلی‌متر) و برگ کوتیلدونی (۵-۳ میلی‌متر) تهیه و جهت کال زایی روی دو نوع محیط کشت مختلف MSB (محیط کشتMSB، محیط کشت حاوی نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین های گروه B5: تیامین(mgl^{-1} ۱۰)، نیکوتینیک اسید (mgl^{-1} ۱)، پیریدوکسین (mgl^{-1} ۱) و میواینوزیتول (mgl^{-1} ۱۰۰) می باشد) کشت شدند. محیط کشت MSB_1 (محیط کشت حاوی نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین های گروه B5) حاوی هورمون‌های توفوردی (mgl^{-1} ۰/۱) و کینتین (mgl^{-1} ۰/۱) و کلرید منیزیم (gl^{-1} ۰/۷۵)، ساکارز (gl^{-1} ۳۰) و آگار (gl^{-1} ۷) با pH=۵/۸ بود (۱۹) و محیط کشت MSB_2 (محیط کشت حاوی نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین‌های گروه B5) حاوی هورمون نفتالین استیک اسید (mgl^{-1} ۱)، ساکارز (gl^{-1} ۳۰) و آگار (gl^{-1} ۷) با pH=۵/۸ بود.

بدین ترتیب، اثر سه عامل: ژنوتیپ (۴ ژنوتیپ: کوکر۳۱۲، ۳۴۹، C1211 و 4-S-4)، نوع ریزنمونه (دو نوع ریزنمونه: هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی) و ترکیب محیط کشت (دو ترکیب محیط: MSB_1 و MSB_2) بر تولید و رشد کالوس به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در مؤسسه تحقیقات پنبه گرگان در سال ۱۳۸۹ مورد بررسی قرار گرفت. هر واحد آزمایشی عبارت از یک پتری دیش حاوی ۸-۵ ریزنمونه بود و کشت ها درون اتاقک رشد با دمای

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

عبارت از یک پتری دیش حاوی ۸-۵ ریزنمونه بود و کشت ها درون اتاقک رشد با دمای ۲±۲۸ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. واکشت ها تقریباً ۳۰-۲۱ روز یکبار انجام گردید.

کال ها بعد از ۱۲ هفته قرار گرفتن در محیط کشت MSB_1 و MSB، جهت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها، به محیط کشت MS_{1a} (شامل نمک های محیط MS به همراه ویتامین های گروه B5) حاوی نیترات پتاسیم ($1/9\ gl^{-1}$)، کلرید منیزیم ($0/75\ gl^{-1}$)، ساکارز ($30\ gl^{-1}$) و آگار ($7\ gl^{-1}$) با pH=۵/۸ (۱۹) به مدت ۷ هفته منتقل و هر ۳۰-۲۱ روز یکبار واکشت شدند. کال های جنینی بعد از قرار گرفتن در محیط کشت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها به محیط کشت جوانه زنی جنین های سوماتیکی، محیط MS_{2a} (شامل نمک های محیط MS به همراه ویتامین های گروه B5) حاوی هورمون زآتین ($0/1\ mgl^{-1}$)، ساکارز ($30\ gl^{-1}$) و آگار ($7\ gl^{-1}$) با pH=۵/۸ تغییر یافته محیط منتقل شدند و بعد از جوانه‌زنی جنین‌ها و تولید گیاهچه، گیاهچه‌های باز زاشده به خاک سبک و استریل منتقل گردیدند (۲۱).

صفات مورد بررسی در این مطالعه، شامل: شروع کال‌زایی (تعداد روز سپری شده تا مشاهده اولین علائم تولید کالوس)، درصد کال‌زایی (تعداد ریزنمونه به کالوس تبدیل شده در هر تکرار) و درصد کال جنین‌زا (تعداد کالوس‌های جنین‌زا در هر تکرار) شمارش و یادداشت برداری شد. با توجه به اینکه اکثر داده‌ها براساس درصد بود، برای اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده جذری $X_1= \sqrt{X\ 2}$ استفاده شد. در مواردی که صفر وجود داشت از تبدیل $X_1= \sqrt{X\ 2 + 0.5}$ استفاده گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزارهای کامپیوتری EXCEL و SAS انجام شد و تجزیه واریانس بر مبنای طرح فاکتوریل با دو فاکتور (ژنوتیپ و محیط کشت) برای هر ریزنمونه و همچنین طرح فاکتوریل با سه فاکتور (ژنوتیپ، محیط کشت و ریزنمونه) انجام شد و مقایسه میانگین به روش دانکن انجام گردید.

نتایج و بحث

کال زایی و تولید کال های جنین زای ریزنمونه هیپوکوتیل

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در محیط کشت MSB_1 بعد از گذشت ۲۰-۷ روز و در محیط کشت MSB_2 بعد از گذشت ۲۷-۱۷ روز شروع به کال‌زایی کردند (جدول ۱). براساس نتایج جدول تجزیه واریانس صفت زمان شروع کال دهی ریزنمونه هیپوکوتیل، عکس العمل ژنوتیپ های مورد بررسی معنی دار ولی اثر محیط کشت و همچنین اثر متقابل محیط کشت در ژنوتیپ اختلاف معنی داری نشان نداده است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین برای صفت زمان شروع کال دهی در محیط MSB_1، نشان داد که ژنوتیپ 4-S-4 (۷/۶ روز) به همراه کوکر ۳۱۲ (۱۰ روز) و ۳۴۹ (۱۱ روز) از لحاظ آماری اختلاف معنی داری

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

نداشتند و به طور معنی‌داری زودتر از C1211 (۲۰ روز) تولید کال نمودند. در محیط MSB_2 نیز، ژنوتیپ 4-S-4 (۱۷/۶ روز) زودتر از کوکر ۳۱۲ (۱۹ روز) و ۳۴۹ (۲۲/۶ روز) و C1211 (۲۶ روز) شروع به کال‌دهی نمودند.

جدول ۱- میانگین داده های حاصل از کشت ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی ژنوتیپ های مختلف در ۲ محیط کشت

محیط کشت	ژنوتیپ	شروع کال زایی (روز) هیپوکوتیل	شروع کال زایی (روز) برگ کوتیلدونی	کال زایی (٪) هیپوکوتیل	کال زایی (٪) برگ کوتیلدونی	جنین زایی (٪) هیپوکوتیل	جنین زایی (٪) برگ کوتیلدونی	ریشه زایی (٪) هیپوکوتیل	ریشه زایی (٪) برگ کوتیلدونی
محیط MSB_1	کوکر ۳۱۲	۱۱	۲۸/۳۳	۳۳/۳۳	۷۳/۳۳	۷۱	۸۸/۳۳	-	-
	۳۴۹	۱۰	۲۲/۳۳	۴۶/۶۶	۸۶/۶۶	۶۸/۳۳	۸۶/۶۶	-	-
	C1211	۲۰	۲۳/۳۳	۳۳/۳۳	۲۰/۸۳	۵۵	۳۳/۳۳	-	-
	4-S-4	۷/۶۶	۱۶/۳۳	۷۳/۳۳	۹۳/۳۳	۷۷	۹۷/۶۶	-	-
محیط MSB_2	کوکر۳۱۲	۱۹	-	۶۶/۶۶	۸۰	-	۵۲/۶۶	۱۳/۱۳	۵۸/۳۳
	۳۴۹	۲۲/۶۶	۲۰	۱۶/۳۳	۸۶/۶۶	-	۶۸/۳۳	-	۳۳
	C1211	۲۶	-	-	۴۰	-	۷۵	۶/۶۶	۵۸/۳۳
	4-S-4	۱۷/۶۶	۲۲	۱۶/۳۳	۸۰	-	۷۵	-	۶۶/۶۶

درصد کال‌زایی در بین ژنوتیپ‌ها معنی‌دار نبوده ولی در ۲ محیط کشت مورد بررسی اختلاف معنی‌دار نشان داده است (جدول ۲). با انجام مقایسه میانگین به روش دانکن مشخص شد که در محیط MSB_1، ژنوتیپ 4-S-4 (۹۳/۳۳ درصد) به همراه ۳۴۹ (۸۶/۶۶ درصد) وکوکر ۳۱۲ (۷۳/۳۳ درصد) از برتری معنی‌دار نسبت به C1211 (۲۰/۸۳ درصد) برخوردار بوده است و در محیط MSB_2 نیز ژنوتیپ ۳۴۹ (۸۶/۶۶ درصد) و 4-S-4 (۸۰ درصد) برتر از کوکر۳۱۲ (۶۶/۶۶ درصد) و همچنین برتر از C1211 (۴۰ درصد) بودند (جدول ۳). با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی بین ۴ ژنوتیپ در ۲ محیط کشت مورد مطالعه، ژنوتیپ C1211 هم از شروع کال‌زایی دیرتر و هم از درصد کال‌زایی کمتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برخوردار است.

جدول ۲- تجزیه واریانس فاکتوریل با ۲ فاکتور ژنوتیپ (۴ سطح) و محیط کشت (۲ نوع) در ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی پنبه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS) شروع کال زایی (روز) هیپوکوتیل	شروع کال زایی (روز) برگ کوتیلدونی	کال زایی (٪) هیپوکوتیل	کال زایی (٪) برگ کوتیلدونی	جنین زایی (٪) هیپوکوتیل	جنین زایی (٪) برگ کوتیلدونی	ریشه زایی (٪) هیپوکوتیل	ریشه زایی (٪) برگ کوتیلدونی
ژنوتیپ	۳	۲۰/۷۴**	۱۱۵/۳۷^{ns}	۱۱۷/۹۴^{ns}	۱۲/۱۵**	۷/۵۳^{ns}	۰/۵۱^{ns}	۲/۲۳^{ns}	۱/۷۹^{ns}
محیط کشت	۱	۰/۱۴^{ns}	۸۷۶/۰۴**	۵۰۴/۱۶*	۱۲۵/۴**	۰/۱۸^{ns}	۳۳۱/۸**	۲/۴۷^{ns}	۲۵۴**
ژنوتیپ × محیط کشت	۳	۱/۶۹^{ns}	۴۰۰/۳۷**	۱۲/۱۶^{ns}	۱/۱۱^{ns}	۱۱/۲۷*	۰/۵۱^{ns}	۲/۲۳^{ns}	۱/۷۹^{ns}
خطا	۱۶	۱/۱۶	۴۱/۹۱	۶۶/۷۵	۲/۲۴	۳/۲۵	۰/۸۶	۱/۲۱	۰/۸۶

ns، * و**: به ترتیب عدم معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

کال‌ها براساس رنگ و کیفیت به گروه جنینی (کال‌های دانه‌دار و شل که دارای رنگ کرم خاکستری و ترد و شکننده و با رشد سریعتر بودند) و غیرجنینی (کال‌های که متراکم و فشرده به رنگ سفید، سبز تیره یا قهوه‌ای و دارای رشد کمتری بودند) تقسیم‌بندی شدند. کال‌ها تا مدت ۱۲ هفته در محیط اولیه برای تکمیل و تکثیر کال‌دهی واکشت گردیدند.

نتایج مقایسه میانگین برای صفت درصد تولید کال‌های جنین‌زا در محیط MSB_1، حاکی از برتری معنی‌دار ژنوتیپ‌های 4-S-4، کوکر ۳۱۲ و ۳۴۹ (به ترتیب با ۹۷/۶۶، ۸۸/۳۳ و ۸۶/۶۶ درصد) نسبت به ژنوتیپ C1211 (۳۳/۳۳ درصد) می‌باشد. در محیط MSB_2، نتایج از وجود عدم اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها و محیط کشت‌ها دلالت دارد و درصد تولید کال‌های جنین‌زا در ژنوتیپ‌های 4-S-4 و C1211 (۷۵ درصد) و در ۳۴۹ و کوکر ۳۱۲ به ترتیب با ۶۸/۳۳ و ۵۲/۶۶ درصد بوده است که براساس مقایسه میانگین در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین (روش دانکن) درصد کال دهی ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی۴ ژنوتیپ پنبه

محیط کشت / ژنوتیپ	MSB_1		MSB_2	
	هیپوکوتیل	برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل	برگ کوتیلدونی
کوکر ۳۱۲	۷۳/۳۳^{a}	۳۳/۳۳^{b}	۶۶/۶۶^{ab}	.^{a}
۳۴۹	۸۶/۶۶^{a}	۴۶/۶۶^{ab}	۸۶/۶۶^{a}	۱۶/۳۳^{a}
C1211	۲۰/۸۳^{b}	۳۳/۳۳^{b}	۴۰^{b}	.^{a}
4-S-4	۹۳/۳۳^{a}	۷۳/۳۳^{a}	۸۰^{a}	۱۶/۳۳^{a}

میانگین هایی که دارای حرف یا حروف مشابه هستند از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند.

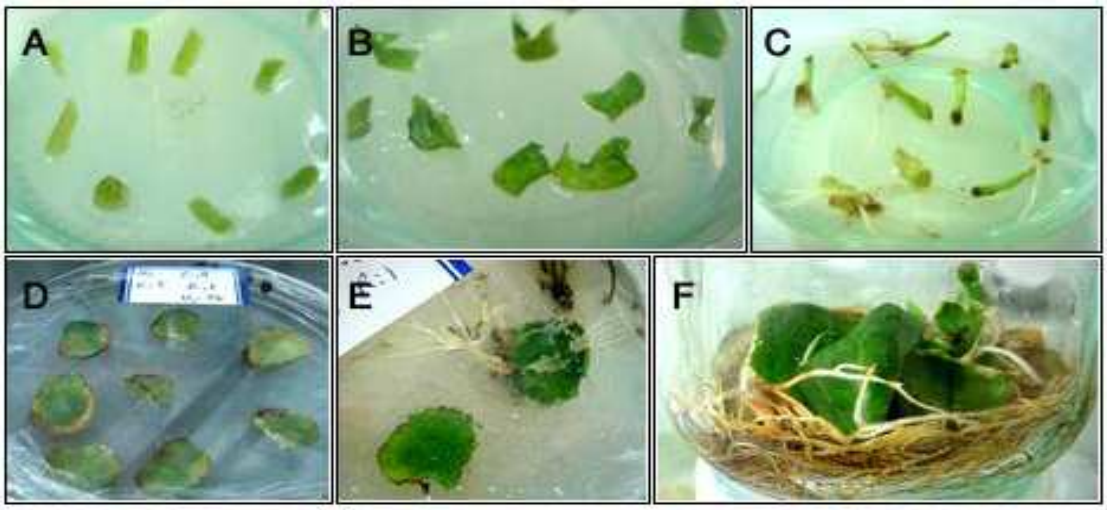
نتایج بدست آمده برای ریزنمونه هیپوکوتیل در ۲ محیط مورد مطالعه، بیانگر آن است که اختلاف بین ژنوتیپ‌ها برای درصد کال‌زایی و تولید کال‌های جنین‌زا معنی‌دار نبوده و عکس‌العمل تمامی ژنوتیپ‌ها تقریباً یکسان می‌باشد. ولی بین محیط‌ها تفاوت معنی‌داری در تولید کال مشاهده شد. برای درصد کال‌های جنینی نیز بین ژنوتیپ‌ها و محیط‌ها اختلاف معنی‌دار وجود نداشته است. لذا می‌توان نتیجه گرفت که محیط MSB_1 بهترین محیط برای تمامی ژنوتیپ‌ها با ریزنمونه هیپوکوتیل‌شان از نظر تولید کال و تولید کال‌های جنین‌زا می‌باشد. همچنین عکس‌العمل تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به استثناء ژنوتیپ C1211 مناسب بود.

کال زایی و تولید کال های جنین زای ریزنمونه برگ کوتیلدونی

در محیط کشت MSB_1، ریزنمونه برگ کوتیلدونی بعد از گذشت ۲۸-۱۶ روز و در محیط MSB_2، فقط برخی از ژنوتیپ‌ها بعد از گذشت ۲۲-۲۰ روز شروع به تولید سلول‌های کالوسی نمودند. که نتایج جدول تجزیه واریانس حاکی از اختلاف معنی‌دار بین محیط کشت‌ها و همچنین اثر متقابل ژنوتیپ × محیط کشت می‌باشد (جدول ۲). نکته قابل توجه در این مطالعه، مشاهده افزایش سطح نمونه برگ

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

در این محیط در روزهای اولیه کشت و سپس شروع تولید ریشه از ریزنمونه برگ کوتیلدونی به جای تولید کالوس در محیط MSB_2 می‌باشد. زمان تولید ریشه از هفته اول آغاز و با گذشت زمان، فقط به تعداد و طول ریشه‌های تولیدی افزوده شد (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج بدست آمده از کشت ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی در محیط MSB_2.

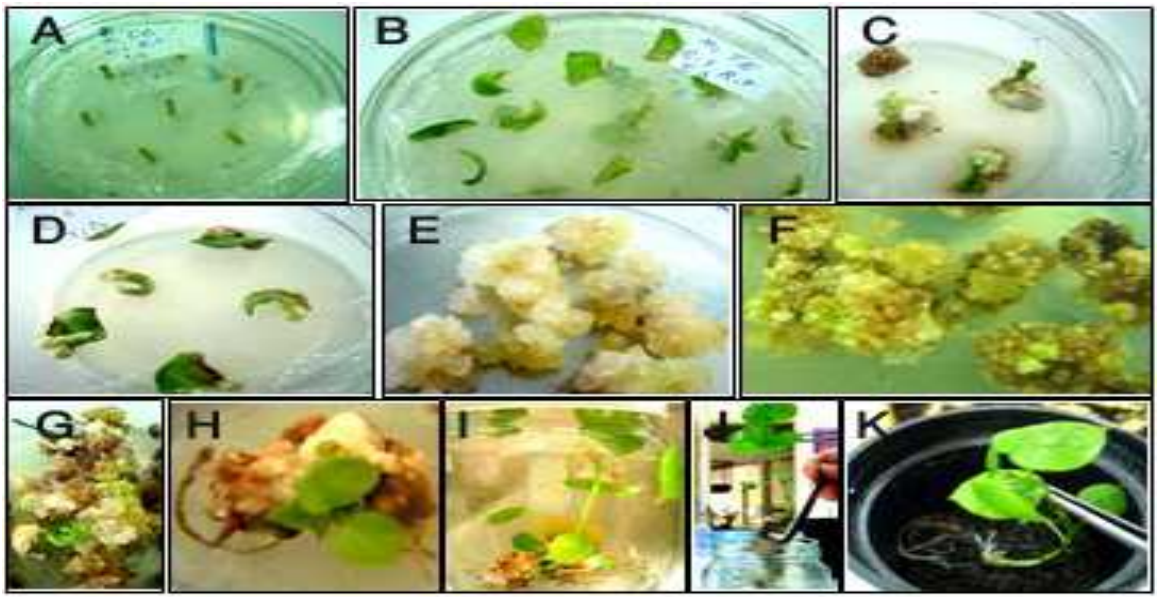
A: کشت ریزنمونه هیپوکوتیل رقم کوکر ۳۱۲ در محیط MSB_2، B: کشت ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ ۳۴۹ در محیط MSB_2، C: ریشه زایی به جای تشکیل کال ریزنمونه هیپوکوتیل رقم کوکر۳۱۲ در محیط MSB_2، D: افزایش سطح ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ C1211 در محیط، MSB_2، E: ریشه زایی به جای تشکیل کال ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ ۳۴۹ در محیط MSB_2، F: تولید ریشه های فراوان ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ 4-S-4 و عدم تشکیل ساقه در محیط MSB_2.

در محیط MSB_1 ژنوتیپ ها فقط تولید سلول های کالوسی نموده و ریشه زایی مشاهده نشد (شکل ۲). درصد کال زایی در بین ژنوتیپ ها متفاوت بوده و از ۳۳/۳۳-۷۳/۳۳ درصد متغیر بوده است که بیشترین درصد کال دهی مربوط به ژنوتیپ 4-S-4 (۷۳/۳۳ درصد) و سپس ۳۴۹ (۴۶/۶۶ درصد) و در نهایت کوکر۳۱۲ و C1211 (هر دو با ۳۳/۳۳ درصد) بوده است. نتایج بررسی ها در محیط MSB_2، حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین ژنوتیپ ها و محیط کشت ها می باشد که کال زایی فقط در ۲ ژنوتیپ 4-S-4 و ۳۴۹ آن هم ناچیز (۱۶/۳۳ درصد) مشاهده شد. ولی همه ژنوتیپ ها شروع به تولید تعداد زیادی ریشه در این محیط نمودند که مقدار ریشه زایی از ۶۶/۶۶ درصد (ژنوتیپ 4-S-4) تا ۳۳ درصد (ژنوتیپ ۳۴۹) متغیر بوده است (جدول ۲).

مقایسه میانگین درصد تولید کال‌های جنین زا در محیط MSB_1، نشان داد که باز هم ژنوتیپ 4-S-4 (۷۷ درصد) در رتبه نخست و ژنوتیپ های کوکر ۳۱۲ و ۳۴۹ و C1211

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

(به ترتیب با ۷۱، ۶۸/۳۳ و ۵۵ درصد) در گروه بعدی قرار گرفتند. در محیط MSB_2 نیز که تولید کال ناچیزی مشاهده شده بود کال های جنینی تولید نشد.



شکل ۲- مراحل انجام شده برای باززایی ژنوتیپ های پنبه از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی در محیط MSB_1.
A: کشت ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ ۳۴۹ در محیط MSB_1، B: کشت ریزنمونه برگ کوتیلدونی رقم کوکر۳۱۲ در محیط MSB_1، C: تحریک و شروع کال دهی ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ 4-S-4، D: تحریک و شروع کال دهی ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ ۳۴۹، E: کال جنین زا در ژنوتیپ 4-S-4، F: شروع تولید جنین از کال های جنین زا ژنوتیپ ۳۴۹، G: مراحل جنین زایی در ژنوتیپ 4-S-4، H: جوانه زنی جنین های سوماتیکی ژنوتیپ 4-S-4، I: رشد گیاهچه جوانه زده ژنوتیپ ۳۴۹، K و J: انتقال گیاهچه های باززا شده از محیط کشت به خاک سبک و استریل شده.

در نتیجه این بررسی می توان گزارش داد که محیط MSB_2 برای تولید کال از ریزنمونه برگ کوتیلدونی نامناسب بوده و تمامی ژنوتیپ ها در این محیط قادر به تولید کال و کال جنین زا نبوده و فقط ۲ ژنوتیپ مقدار ناچیزی کال غیرجنین زا تولید نمودند. لذا این محیط برای محیط کال زایی توصیه نمی گردد. برای ریزنمونه برگ کوتیلدونی نیز محیط MSB_1 بهترین محیط شناخته شده است.

تعیین بهترین محیط کشت، ریزنمونه و ژنوتیپ برای کال زایی

با توجه به نتایج بدست آمده (جدول ۴) بین ژنوتیپ ها، ریزنمونه ها و محیط ها برای کال دهی و تولید کال جنین زا از نظر آماری اختلاف معنی داری (در سطح ۱ درصد) مشاهده شد. در این تحقیق محیط مناسب برای تولید کال و کال جنین زا هم برای ریزنمونه هیپوکوتیل و هم برگ کوتیلدونی محیط MSB_1 می باشد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

جدول ۴- تجزیه واریانس فاکتوریل با ۳ فاکتور ژنوتیپ (۴سطح)، محیط کشت (۲ نوع) و ریزنمونه (۲ نوع) در پنبه

	میانگین مربعات (MS)				
منابع تغییرات	درجه آزادی	شروع کال دهی (روز)	کال زایی (٪)	جنین زایی (٪)	ریشه زایی (٪)
ژنوتیپ	۳	۳۸/۷۴^{ns}	۲۸/۰۷**	۵/۹۴^{ns}	۲/۷۵^{ns}
ریزنمونه	۱	۰/۵۲^{ns}	۱۶۱/۷**	۱۷۲/۹**	۹۲/۴**
محیط کشت	۱	۲۵/۵۲^{ns}	۵۸/۵۷**	۱۷۳/۷**	۱۶۷/۰۲**
ژنوتیپ × ریزنمونه	۳	۱۹۴/۵*	۴/۸۳^{ns}	۲/۱۰^{ns}	۱/۲۷^{ns}
ژنوتیپ × محیط کشت	۳	۲۵۸/۰۲**	۱/۳۶^{ns}	۷/۹۶*	۲/۷۵^{ns}
ریزنمونه × محیط کشت	۱	۱۳۵۴/۶**	۶۶/۹۹**	۱۵۸/۲**	۹۲/۴۵**
ژنوتیپ × ریزنمونه × محیط کشت	۳	۱۵۴/۵^{ns}	۱/۴۴^{ns}	۳/۸۱*	۱/۲۷^{ns}
خطا	۳۲	۵۴/۳۳	۱/۷۰	۲/۰۹	۱/۰۴

ns، * و**: به ترتیب عدم معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

بهترین ریزنمونه هیپوکوتیل می باشد که از برگ کوتیلدونی در هر ۲ محیط نتایج بهتری نشان داده است ولی با توجه به اینکه تعداد نمونه های برگ کوتیلدونی که از جوانه زنی بذر (به عنوان منبع ریزنمونه) بدست می آید نسبت به هیپوکوتیل بیشتر است و همچنین پاسخ ریزنمونه برگ کوتیلدونی به کال زایی نیز مناسب می باشد و در مقایسه سرعت تکثیر کال بین ریزنمونه ها، سرعت تکثیر ریزنمونه برگ کوتیلدونی در ژنوتیپ های 4-S-4 و ۳۴۹ از ریزنمونه هیپوکوتیل بیشتر و کال های جنینی خوبی نیز تولید نمودند، لذا می توان از برگ کوتیلدونی هم به عنوان ریزنمونه فقط در محیط MSB_1 استفاده نمود.

در بین ژنوتیپ های مورد بررسی، می توان ژنوتیپ های 4-S-4 و ۳۴۹ و سپس کوکر ۳۱۲ را به عنوان بهترین ژنوتیپ ها معرفی نمود. به عبارت دیگر می توان گفت که ریزنمونه هیپوکوتیل ژنوتیپ 4-S-4 در محیط MSB_1 بهترین نتیجه را نشان داده است. ولی در ژنوتیپ ۳۴۹ ریزنمونه هیپوکوتیل هم در محیط MSB_1 و هم در محیط MSB_2 نتایج یکسان و خوبی نشان داده است. و در بین این دو ژنوتیپ، 4-S-4 با هر دو نوع ریزنمونه عملکرد بهتری داشته است، و عکس العمل آن از کوکر ۳۱۲ که تاکنون بهترین پاسخ را به مطالعات کشت بافتی پنبه نشان داده است، نیز بهتر می باشد. بعد از آنها ژنوتیپ کوکر ۳۱۲ بهتر بوده است و ژنوتیپ C1211 برای مطالعات کشت بافتی (تولید کال) در این ۲ محیط مورد مطالعه، توصیه نمی شود.

تحریک جنین زایی و جوانه زنی جنین های سوماتیکی

کال های جنین زا بعد از ۱۲ هفته قرار گرفتن در محیط کال دهی (MSB_1 و MSB_2) وارد محیط تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها (MS_{1a}) شدند. کال ها به مدت ۷ هفته در این محیط قرار گرفته و هر ۲۸-۲۱ روز یکبار واکشت گردیدند. نکته قابل توجه در این محیط، قهوه ای شدن و عدم رشد اغلب تکرارهای کالوسی بعد از واکشت در این محیط بود. که به نظر مدت زمان ماندن در این محیط می بایست از ۷ هفته کمتر شود. لذا یکسری از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

تکرارهای کالوسی واکشت نشده و فقط به مدت یک ماه در محیط MS_{1a} قرار گرفتند که علائم جوانه زنی ژنوتیپ های 4-S-4 و ۳۴۹ در این محیط اتفاق افتاد و بلافاصله جوانه ها و کال های جنینی از این محیط به محیط جوانه زنی MS_{2a} وارد شدند. بعد از انتقال به محیط جوانه زنی، جوانه ها شروع به رشد نموده و بعد از گذر از مرحله کوتیلدونی، تولید ساقه و برگ های بیشتر و همچنین برخی از آنها همزمان شروع به تولید ریشه نمودند. بعد از ۲-۱ بار واکشت، گیاهچه ها کامل و آماده انتقال به خاک گردیدند. اما اغلب کال هایی که از مرحله قبلی به این محیط وارد شده بودند یا جنین زایی نداشته و یا در مراحل اولیه جنین زایی (کروی) باقی ماندند که می تواند به علت عدم وجود شرایط مناسب جهت پیشرفت مراحل جنین زایی از جمله قرار گرفتن طولانی مدت در محیط تحریک جنین زایی (MS_{1a}) و یا نامناسب بودن میزان نور، نوع هورمون های مورد استفاده و یا سایر موارد همچون خصوصیات ژنتیکی کال های مربوط به هر ژنوتیپ باشد (۸). اغلب این جنین های سوماتیکی نابالغ شروع به تولید سلول های کالوسی سبز رنگ نمودند که باز هم بعد از گذشت زمان رشد آنها متوقف شده و جوانه زنی صورت نگرفت.

باززایی

در این مطالعه، باززایی و تولید گیاهچه از ریزنمونه ها تفاوتی نداشته و در کل تعداد گیاهچه های باززایی شده نسبتاً اندک بوده است که در بین ژنوتیپ ها، ژنوتیپ 4-S-4 و ۳۴۹ و سپس کوکر۳۱۲ موفق به تولید تعدادی گیاهچه شدند. از ژنوتیپ C1211 گیاهچه ای تولید نشد. تعدادی از گیاهچه ها در محیط MS_{2a} تولید ریشه نموده و آن دسته از گیاهچه هایی که ریشه زایی اندک و یا هیچ ریشه ای تولید نکرده بودند، برای ریشه زایی به محیط MSB حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر از هورمون IBA وارد شدند و ریشه دار گردیدند. گیتا و همکاران (۷) بهترین تیمار جهت ریشه زایی لوبیای سودانی و یورانبی و همکاران (۲۰) بالاترین ریشه زایی در شبدر ایرانی و افشاری (۱) بهترین تیمار برای ریشه زایی شنبلیله را استفاده از هورمون IBA (با غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر) در محیط MS معرفی نمودند. گیاهچه های حاوی ریشه به خاک سبک و استریل منتقل و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت قرار گرفتند و جهت حفظ رطوبت زیر پوشش شفاف نگهداری شدند.

نتایج این بررسی نشان داد که شروع کال دهی در پنبه صفتی است که تا حدود زیادی وابسته به ژنوتیپ می باشد که در بین ژنوتیپ های مورد بررسی در این مطالعه ژنوتیپ 4-S-4 زودترین شروع کال دهی را هم با ریزنمونه هیپوکوتیل و هم با برگ کوتیلدونی نسبت به سایر ژنوتیپ ها دارا بوده است. در بررسی توحیدفر و همکاران (۱۹) رقم کوکر ۳۱۲ زودتر از ارقام ساحل و در بررسی گروسی و همکاران (۶) رقم کوکر ۳۱۲ زودتر از ارقام ساحل و سپس ورامین شروع به کال دهی کرده بودند. درصد کال دهی علاوه بر نوع ریزنمونه، به نظر ژنتیکی- محیطی نیز می باشد و تفاوت مشاهده شده بین ژنوتیپ ها

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

ممکن است به خاطر واکنش بهتر ژنوتیپ های برتر با محیط کشت کال دهی و همچنین نشان دهنده برتری توان ژنتیکی آنها نیز باشد (۶). درصد کال دهی بالا می تواند صفت با ارزشی محسوب گردد، زیرا در صورتی که در محیط کشت معینی کال های ایجاد شده به کال های جنین‌زا تبدیل شوند با بالا رفتن فراوانی آنها احتمال دست یابی به جنین های سوماتیکی بیشتر شده و احتمال تولید گیاهچه نیز افزایش می یابد. همچنان که تولید کال اندک ژنوتیپ C1211 در نهایت منجر به عدم تولید گیاهچه از آن در این مطالعه گردیده است.

تنظیم کننده های رشد نقش مهمی در ایجاد کالوس دارند. برخی قطعات گیاهی کشت شده برای تولید کالوس فقط به اکسین و برخی فقط به سیتوکینین و اکثر کشت ها به هر دو نیاز دارند. بای و همکاران (۲) با ریزنمونه کوتیلدون ارقام ساحل و سای اکرا در محیط کشت بدون سیتوکنیین و ۲ میلی گرم بر لیتر NAA و هیبرید کوکر۳۱۲ × کوکر ۳۴۹ در محیط حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر NAA بهترین کال زایی را داشتند. ژانگ و همکاران (۲۱) وقتی از 2,4-D برای تحریک و تکثیر کال پنبه رقم Simian-3 استفاده کردند کال های یکسانی گرفتند که سبز رنگ و متراکم بود. شنگوی و جینگسان (۱۸) با استفاده از کینتین و IBA در پنبه رقم Xinluzao کال هایی تولید کردند که جنین زا و غیرجنین زا بودند ولی کومریا و همکاران (۱۰) با استفاده از 2,4-D، کینتین و ریزنمونه هیپوکوتیل توانستند کال های بسیار ترد بدست آوردند. نتایج بدست آمده در بررسی حاضر و با ژنوتیپ های مورد استفاده (به جزء ژنوتیپ C1211) مشابه با نتایج لیلاواتی و همکاران (۱۱) بود که با استفاده از 2,4-D، کینتین، کال های بسیار ترد از ریزنمونه هیپوکوتیل و کوتیلدون پنبه رقم کوکر ۳۱۰ بدست آوردند. نتایج این تحقیق همچنین مشابه با نتایج گروسی و همکاران (۶) می باشد که با استفاده از هورمون 2,4-D و کینتین (با غلظت هایی مشابه با این تحقیق) درصد کال دهی نسبتاً بالایی را از ریزنمونه هیپوکوتیل در ارقام ساحل (۸۸ درصد) و کوکر ۳۱۲ (۷۵ درصد) و ورامین (۵۷ درصد) گزارش نمودند.

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 کال ها از محیط دارای 2,4-D به محیط کشت فاقد آن باعث تحریک جنین زایی می شود و استفاده از نیترات پتاسیم درصد جنین زایی را افزایش می دهد. آنیون نیترات در ترکیب با نیترات پتاسیم با تحریک شروع جنین‌زایی و نیز نمو جنین ها باعث افزایش درصد جنین زایی می شود. در این بررسی از زآتین جهت تحریک جوانه زنی سوماتیکی استفاده شد. ژانگ و همکاران (۲۱) و گروسی و همکاران (۶) نیز با استفاده از زآتین به نتایج مشابهی دست یافته‌اند. غلظت کم زآتین (۰/۱ میلی گرم بر لیتر) عامل کلیدی در تحریک کال جنین زا بوده و محیط کشت بدون هورمون برای جوانه زنی جنین های سوماتیکی کفایت نمی کند (۲۱).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

پنبه گیاهی است که درصد باززایی آن پایین و گیاهچه های باززایی شده از آن دارای رشد کم می باشند (۱۸). در این مطالعه نیز باززایی گیاهچه در پنبه نسبتاً اندک بوده و پیشنهاد می شود از محیط های دیگری برای تحریک و بلوغ جنین ها و همچنین جوانه‌زنی جنین ها استفاده شود تا بتوان به تعداد گیاهچه های باززا شده بیشتری دست یافت.

منابع

1. Afshari, A. 2009. Tissue culture study and investigation of cytogenetic variation induced by colchicines and trifluralin in fenugreek (Trigonella Foenum-graecum L.). M.S. Thesis in Mazandaran Univ. 118 pp.
2. Bay, Z., K. Ghasemi bezdi and R. Bozorgi poor. 2008. Study of some critical parameters in regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars in Invitro conditions. The10th Iranian Congress of Crop Sciences. Karaj, Iran. 519 pp.
3. Davidonis, G.H. and R.H. Hamilton. 1983. Plant regeneration from callus tissue of (*Gossypium hirsutum* L.) Plant Sci Lett. 32: 89-93.
4. Finer, J.J. 1988. Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Rep., 7: 399-402.
5. Firoozabady, E. and D.L. DeBoer. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypim hirsutum* L.). In Vitro Cell Dev Biol Plant. 29: 166-173.
6. Garousi, Sh., M. Tohidfar, K. Kazemi Tabar, H. Rahimian and Gh. Nematzadeh. 2007. Somatic embryogenesis in three cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. Iranian J of Agric Sci., 9(4): 302-314.
7. Geetha, N., P. Venkatachalam, V. Prakash and L. Sita. 1998. High frequency induction of multiple shoots and plant regeneration from seedling explants of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Current Science. 75(10):1036-1041.
8. Karami, A., A. Deljo and A. Mahmodi Por. 2008. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in *Dianthus caryophyllus* L. Journal of Agric. Sci. Nature. Resource. 12(43). pp: 11-17.
9. Kumar, S. and D. Pantal. 1998. Regeneration of Indian cotton variety MCU-5 through somatic embryogenesis. Current Sci., 74(6): 538-540.
10. Kumria, R., V.G. Sunnichan, D.K. Das, S.K. Gupta, V.S. Reddy, R.K. Bhatnagar and S. Leellavathi. 2003. High frequency somatic embryo production and maturation in normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through metabolic stress. Plant Cell Rep., 21: 635-639.
11. Leellavathi, S., V.G. 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.
12. Mundeshvar, S.B. 1995. Regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) from shoot tip culture. Plant Sci., 8(1): 89-94.
13. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 173-197.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

14. Ouma. J., PM.M. Young and N.M. Reichert. 2004. Optimization on in vitro regeneration of multiple shoots from hypocotyle section of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). African J. Biotech. 3: 169-173.
15. Price, H.J. and R.H. Smith. 1979. Somatic embryogenesis in suspension culture of *Gossypium* klotzschiaanum Anderss. Planta. 145: 305-307.
16. Rastegar, J. and Z. Hosseini Nejad. 1998. Callus produce and cell culture in four cotton cultivars in suspension media. The5th Iranian Congress of Crop Sciences. 579 pp.
17. Sheidai, M., F. Yahyazadeh, F. Farahanei and Z. Noormohammadi. 2008. Genetic and morphological variations induced by tissue culture in tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Acta Biologica Szegediensis. 52(1): 33-38.
18. Shengwei, Zh. and S. Jingsan. 2000. Rapid plant regeneration from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Chinese Science Bulletin. 45(19): 1771-1774.
19. 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.
20. Uranbey, S., C.S. Sevimay and S. Ozcan. 2005. Development of high frequency multiple shoot formation in Persian clover. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 80: 229-232.
21. 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.
22. Zhang, XL., J.M. Zhang., M.J. Yiao, J.Z. Sun and J.L. Liu. 1993. Studies on somatic cell culture and its application in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) improvement. J Huazhong Agri Univ., 12: 421-426.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]

Study of Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Cotton

L. Fahmideh[1], G.A. Ranjbar[2], O. Alishah[3] and N.A. Babaeian Jelodar[4]

1, 2 and 4- Ph.D. Student, Associate Professor and Professor of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

3- Assistant Professor of Cotton Research Institute, Gorgan

Abstract

Optimization of regeneration methods in cotton is necessary to improve and Successful production of transgenic cotton cultivars by tissue culture technique. This study was conducted to determine the genotypic effect on callus induction in cotton using 3 genotypes (Coker349, 4-S-4 and C1211) and Coker 312 selected and a study was carried out in Cotton Research Institute of Gorgan using a factorial experiment based on completely randomized design with three replications in 2011. Explants of hypocotyls and cotyledons of these genotypes were isolated and placed on two cotton callus media MSB (MS medium with Gamborg vitamins-B5), MSB1 medium supplemented with 0.1 mgl^{-1} 2,4-D, 0.1 mgl^{-1} kinetin, 0.75 gl^{-1} $MgCl_2$ and MSB2 medium supplemented with 1 mgl^{-1} NAA. Cultures incubated at 28±2ºc under a light intensity of approximately 2000 lx with 16/8 light/darkness photoperiod for callus induction. In medium containing 2,4-D and Kinetin, 4-S-4 explants of hypocotyls and cotyledons produced callus earlier than Coker349, Coker312 and C1211. The percentage of callus production for 4-S-4 cultivar in two callus media was higher than other genotypes. Callus production from hypocotyls in two media and cotyledon in MSB1 medium for all genotypes showed the highest size of calli most of which were embryogenic. Explants of cotyledon for all genotypes were produced root and no produce callus. For embryogenesis induction and maturation of embryos, produced calli were transferred onto MSB medium supplemented with 0.75 gl^{-1} $MgCl_2$ and 1.9 gl^{-1} KNo_3. Induced Somatic embryos were transferred on embryo germination medium and plantlets produced for 4-S-4, Coker 349 and Coker 312 genotypes.

Keywords: Cotton, Tissue culture, Explants, Callus, Somatic embryo

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-16]