



## بررسی کالوس زایی و جنین زایی سوماتیکی در پنبه

ل. فهمیده<sup>۱</sup>, غ. ع. رنجبر<sup>۲</sup>, ع. عالیشاه<sup>۳</sup> و ن. ع. باباییان جلودار<sup>۴</sup>

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: ۹۰/۰۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۷

### چکیده

بهینه سازی روش های باز زایی 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 ژنتیپ (۳۴۹، ۴-S-4 و C1211) به همراه ژنتیپ 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 ژنتیپ ها به دو نوع محیط کشت MSB (شامل نمک های MS و ویتمین های B5)، MSB<sub>1</sub> همراه با 2,4-D (۰/۱ mgL<sup>-1</sup>)، کینتین (۰/۱ mgL<sup>-1</sup>) و کلرید منیزیم (۰/۷۵ gL<sup>-1</sup>) و MSB<sub>2</sub> به اضافه NAA (۱ mgL<sup>-1</sup>) منتقل شدند. کشت ها به اتفاق رشد با شرایط دمایی ۲۸±۲ 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 ژنتیپ 4-S-4 زودتر از سایر ژنتیپ ها شروع به کال زایی کردند. درصد کال زایی ریزنمونه هیپوکوتیل ژنتیپ 4-S-4 در هر دو محیط بیشتر از سایر ژنتیپ ها بود. کال های تولید شده کلیه ژنتیپ ها، از ریزنمونه هیپوکوتیل در هر دو محیط و برگ کوتیلدونی در محیط MSB<sub>1</sub>، عمدتاً جنین زا بودند. ریزنمونه های برگ کوتیلدونی تمامی ژنتیپ ها در محیط MSB<sub>2</sub> 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 کلرید منیزیم (۰/۷۵ gL<sup>-1</sup>) و نیترات پتابسیم (۱/۹ gL<sup>-1</sup>) انتقال یافتدند. سپس جنین های سوماتیکی بدست آمده به محیط باز زایی منتقل و از ژنتیپ های 4-S-4 و کوکر ۳۱۲، گیاهچه باززا شده دارای ریشه تولید گردید.

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

سایر گیاهان مشکل است و قابلیت باز زایی آن

مقدمه

توسط جنین زایی سوماتیکی به مقدار زیادی توانسته به ژنتیپ می باشد (۴ و ۱۵). در پنبه، باز زایی در تعداد محدودی از ژنتیپ ها مانند

پنبه گیاهی است که باز زایی بیشتر ژنتیپ های تجاری آن از طریق جنین زایی سوماتیکی یا سوسپانسیون سلولی، نسبت به

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 ۶-۷ ماه وجود خواهد داشت.

rstگاری و حسینی نژاد (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 مورفوتابی در بافت‌های سوماکلون و اختلاف احتمالی از نظر باززایی در ژنتیک پنبه ایران را نیز گزارش نمودند. گروسوی 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 تترالپلوزید 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.

کوکر ۳۱۲ گزارش گردیده و در ژنتیک‌های مختلف نیز تنوع زیادی از لحاظ باززایی دیده شده است (۲۲). اولین مشاهده جنین (*Gossypium hirsutum* L.) در کشت سوسپانسیون سلولی یک گونه وحشی پنبه گزارش گردیده است. جنین‌ها پس از یک ۲-ip کشت کالوس در محیط محتوى ۳۰ در تشكيل شدند. جنین‌های کوچک تولید ریشه و برگ‌های کوچک کردند، ولی گیاه باززایی شده‌ای گزارش نگردید. دیوبدونیس و همیلتون (۳) اولین باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی را از کالهای دوساله رقم کوکر ۳۱۰ در محیط کشت بدون هورمون گزارش کردند.

زانگ و همکاران (۲۲) در آنالیز ژنتیکی هیبریدهای پنبه دریافتند که ژنتیک اثر معنی‌داری روی کالزایی ندارد، ولی تأثیر بسیار معنی‌داری روی قابلیت جنین‌زایی و باززایی ایفاء می‌کند. فیروزآبادی و دبوئر (۵) در بررسی قابلیت باززایی ژنتیک‌های مختلف پنبه به این نتیجه رسیدند که رقم کوکر ۳۱۲ که قابلیت کالزایی و باززایی مناسبی دارد، امکان تولید گیاهچه در طی ۷-۸ ماه وجود دارد در حالیکه در برخی دیگر از ژنتیک‌های پنبه امکان تولید گیاهچه از طریق واکشت‌های مختلف و در طی ۱۰-۱۱ ماه امکان‌پذیر خواهد بود. ماندشوار (۱۲) در بررسی قابلیت باززایی ژنتیک‌های 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

هفت تا چهارده روز بعد از کشت بذر روی محیط ۱/۲MS، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل ۴-۵ میلی‌متر) و برگ کوتیلدونی (۳-۵ میلی‌متر) تهیه و جهت کال زایی روی دو نوع محیط کشت مختلف MSB (محیط کشت MSB)، محیط کشت حاوی نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین‌های گروه B5: تیامین ( $10 \text{ mg l}^{-1}$ )، نیکوتینیک اسید ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ )، پیریدوکسین ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) و میواینوزیتول ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) می‌باشد) کشت شدند. محیط کشت MSB<sub>1</sub> (محیط کشت حاوی نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین‌های گروه B5) حاوی هورمون‌های توفوردی ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) و کینتین ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) و کلرید منیزیم ( $0.75 \text{ g l}^{-1}$ )، ساکارز ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ) و آگار ( $7 \text{ g l}^{-1}$ ) با pH=۵/۸ بود (۱۹) و محیط کشت MSB<sub>2</sub> (محیط کشت حاوی نمک‌های B5) محیط MS به همراه ویتامین‌های گروه B5: تیامین ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ )، ساکارز ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ) و آگار ( $7 \text{ g l}^{-1}$ ) با pH=۵/۸ بود.

بدین ترتیب، اثر سه عامل: ژنوتیپ (۴)، ژنوتیپ: کوکر ۳۱۲، ۳۴۹، C1211 و ۴-S-4، نوع ریزنمونه (دو نوع ریزنمونه: هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی) و ترکیب محیط کشت (دو ترکیب محیط: MSB<sub>1</sub> و MSB<sub>2</sub>) بر تولید و رشد کالوس به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در مؤسسه تحقیقات پنیه گرگان در سال ۱۳۸۹ مورد بررسی قرار گرفت. هر واحد آزمایشی عبارت از یک پتری دیش حاوی ۵-۸ ریزنمونه بود و کشت‌ها درون اتفاق رشد با دمای

از آنجا که اغلب مطالعات باززایی موفق در پنبه روی رقم کوکر ۳۱۲ و لاین‌های وابسته به آن انجام گرفته است، لذا جهت گسترش پنبه‌های ترانس-ژنتیک 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 می‌شود. در این مطالعه قابلیت کال‌زایی و رفتار کال‌های تولید شده در شرایط درون‌شیشه و در سطح محیط کشت‌های مختلف چندین ژنوتیپ برتر پنبه کشور، مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

**مواد گیاهی، ضدغذوی و کشت بذر**  
در این مطالعه از رقم کوکر ۳۱۲ و ژنوتیپ‌های ۳۴۹، C1211 و ۴-S-4 که بذر آنها از مؤسسه تحقیقات پنیه گرگان تهیه شده بود، استفاده شد.

بذرها پس از الیافزدایی، ابتدا با آتانل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و سپس در محلول هیپوکلریدسیدیم ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدغذوی شدند. بعد از ضدغذوی 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 ۱/۲MS با pH: ۵/۶-۵/۸ کشت شدند. کشت‌ها درون اتفاق رشد در دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

**کشت ریزنمونه‌ها و روش مورد استفاده**

یادداشت برداری شد. با توجه به اینکه اکثر داده‌ها براساس درصد بود، برای اینکه داده‌ها دارای توزیع نرمال باشند، از تبدیل داده جذری  $\sqrt{X_1} = X_2$  استفاده شد. در مواردی که صفر وجود داشت از تبدیل  $\sqrt{X_2 + 0.5} = X_1$  استفاده گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزارهای کامپیوترا EXCEL و SAS انجام شد و تجزیه واریانس بر مبنای طرح فاکتوریل با دو فاکتور (زنوتیپ و محیط کشت) برای هر ریزنمونه و همچنین طرح فاکتوریل با سه فاکتور (زنوتیپ، محیط کشت و ریزنمونه) انجام شد و مقایسه میانگین به روش دانکن انجام گردید.

## نتایج و بحث

### کال زایی و تولید کال های جنین زایی ریزنمونه هیپوکوتیل

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در محیط کشت MSB<sub>1</sub> بعد از گذشت ۷-۲۰ روز و در محیط کشت MSB<sub>2</sub> بعد از گذشت ۱۷-۲۷ روز شروع به کال زایی کردند (جدول ۱). براساس نتایج جدول تجزیه واریانس صفت زمان شروع کال دهی ریزنمونه هیپوکوتیل، عکس العمل زنوتیپ‌های مورد بررسی معنی دار ولی اثر محیط کشت و همچنین اثر متقابل محیط کشت در زنوتیپ اختلاف معنی داری نشان نداده است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین برای صفت زمان شروع کال دهی در محیط MSB<sub>1</sub>، نشان داد که زنوتیپ 4-S-4 (۷/۶ روز) به همراه کوکر ۳۱۲ (۱۰ روز) و ۱۱ (۴۴۹ روز) از لحاظ آماری اختلاف معنی داری

عبارت از یک پتری دیش حاوی ۵-۸ ریزنمونه بود و کشت‌ها درون اتفاق رشد با دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. واکشت‌ها تقریباً ۲۱-۳۰ روز یکبار انجام گردید.

کال‌ها بعد از ۱۲ هفته قرار گرفتن در محیط کشت MSB<sub>1</sub> و MSB<sub>2</sub>، جهت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین‌ها، به محیط کشت جنین های MS<sub>1a</sub> (شامل نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین‌های گروه B5) حاوی نیترات پتاسیم ( $1/۹ \text{ g l}^{-1}$ )، کلرید منیزیم ( $۰/۷۵ \text{ g l}^{-1}$ )، ساکارز ( $۳۰ \text{ g l}^{-1}$ ) و آگار ( $۷ \text{ g l}^{-1}$ ) با  $\text{pH}=۵/۸$  در مدت ۷ هفته منتقل و هر ۲۱-۳۰ روز یکبار واکشت شدند. کال‌های جنینی بعد از قرار گرفتن در محیط کشت تحریک جنین زایی و بلوغ جنین‌ها به محیط کشت جوانه زنی جنین‌های سوماتیکی، محیط MS<sub>2a</sub> (شامل نمک‌های محیط MS به همراه ویتامین‌های گروه B5) حاوی هورمون زائین ( $۰/۱ \text{ mg l}^{-1}$ )، ساکارز ( $۳۰ \text{ g l}^{-1}$ ) و آگار ( $۷ \text{ g l}^{-1}$ ) با  $\text{pH}=۵/۸$  به تغییر یافته محیط منتقل شدند و بعد از جوانه‌زنی جنین‌ها و تولید گیاهچه، گیاهچه‌های باز زاشه به خاک سبک و استریل منتقل گردیدند (۲۱).

صفات مورد بررسی در این مطالعه، شامل: شروع کال زایی (تعداد روز سپری شده تا مشاهده اولین علائم تولید کالوس)، درصد کال زایی (تعداد ریزنمونه به کالوس تبدیل شده در هر تکرار) و درصد کال جنین‌زا (تعداد کالوس‌های جنین‌زا در هر تکرار) شمارش و

۳۱۲ C1211 (۳۴۹ روز) و ۳۱۲ (۱۹ روز) شروع به کالدهی نمودند.

نداشتند و به طور معنی‌داری زودتر از C1211 (۲۰ روز) تولید کال نمودند. در محیط MSB<sub>2</sub> نیز، ژنتیپ 4-S-4 (۱۷/۶ روز) زودتر از کوکر

جدول ۱- میانگین داده‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی ژنتیپ‌های مختلف در ۲ محیط کشت

محیط کشت	ژنتیپ	شروع کال زایی (روز)	کال زایی (%)	جنبن زایی (%)	ریشه زایی (%)	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی
کوکر	۳۱۲	۱۱	۲۸/۳۳	۷۲/۲۳	۳۲/۲۳	۷۱	۸۸/۳۳	۴۶/۶۶	-
محیط	۳۴۹	۱۰	۲۲/۳۳	۸۶/۶۶	۶۸/۳۳	۵۵	۳۲/۳۳	۳۲/۳۳	-
C1211	MSB <sub>1</sub>	۲۰	۲۳/۳۳	۲۰/۸۳	۷۷	۹۷/۶۶	۷۷/۲۳	۹۳/۲۳	-
کوکر	۳۱۲	۱۹	-	۵۲/۶۶	-	۵۸/۳۳	۱۲/۱۳	-	-
محیط	۳۴۹	۲۶	۲۲/۶۶	۸۶/۶۶	-	۳۳	-	۱۶/۲۳	-
C1211	MSB <sub>2</sub>	۲۶	-	۷۵	-	۵۸/۳۳	۶/۶۶	-	-
کوکر	۴-S-4	۱۷/۶۶	۲۲	۱۶/۲۳	۷۵	۶۶/۶۶	-	-	-

ژنتیپ ۴-S-4 (۳۴۹ روز) درصد ۸۶/۶۶ و ۴-S-4 (۳۱۲ روز) درصد ۶۶/۶۶ همچنین برتر از C1211 (۴۰ روز) بودند (جدول ۳). با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی بین ۴ ژنتیپ در ۲ محیط کشت مورد مطالعه، ژنتیپ C1211 هم از شروع کال‌زایی دیرتر و هم از درصد کال‌زایی کمتری نسبت به سایر ژنتیپ‌ها برخوردار است.

درصد کال‌زایی در بین ژنتیپ‌ها 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<sub>1</sub> MSB<sub>1</sub>، ژنتیپ ۸۶/۶۶ ۴-S-4 (۹۳/۳۳ روز) به همراه ۳۴۹ (۳۲/۳۳ روز) و کوکر ۳۱۲ (۷۳/۳۳ روز) از برتری معنی‌دار نسبت به C1211 (۲۰/۸۳ روز) برخوردار بوده است و در محیط<sub>2</sub> MSB<sub>2</sub> نیز

جدول ۲- تجزیه واریانس فاکتوریل با ۲ فاکتور ژنتیپ (۴ سطح) و محیط کشت (۲ نوع) در ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی پنیه

میانگین مریعات (MS)									
منابع تغییرات	درجه آزادی	شروع کال زایی (روز)	کال زایی (%)	جنبن زایی (%)	ریشه زایی (%)	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل برگ کوتیلدونی
ژنتیپ	۳	۲۰/۷۴**	۱۲/۱۵**	۷/۵۳ns	۰/۵۱ns	۲/۲۳ns	۱/۷۹ns	۲/۴۷ns	۲/۲۳ns
محیط کشت	۱	۰/۱۴ns	۱۲۵/۴**	۰/۱۸ns	۳۳۱/۸**	۰/۱۸ns	۲۵۴**	۰/۱۸ns	۰/۱۸ns
ژنتیپ × محیط کشت	۳	۱/۶۹ns	۱۲/۱۶ns	۱/۱۱ns	۱/۱۱ns*	۰/۵۱ns	۰/۵۱ns	۰/۵۱ns	۰/۵۱ns
خطا	۱۶	۱/۱۶	۴۱/۹۱	۶۶/۷۵	۲/۲۴	۰/۸۶	۳/۲۵	۰/۸۶	۱/۲۱

\* و \*\*: به ترتیب عدم معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

حاکی از برتری معنی دار ژنتیپ های 4-S-4، کوکر ۳۱۲ و ۳۴۹ (به ترتیب با ۹۷/۶۶، ۸۸/۳۳ و ۸۶/۶۶ درصد) نسبت به ژنتیپ C1211 (۳۳/۳۳ درصد) می باشد. در محیط MSB<sub>2</sub>، نتایج از وجود عدم اختلاف معنی دار بین ژنتیپ ها و محیط کشت ها دلالت دارد و درصد تولید کال های جنین زا در ژنتیپ های 4-S-4 و C1211 (۷۵ درصد) و در ۳۴۹ و ۳۱۲ به ترتیب با ۶۸/۳۳ و ۵۲/۶۶ درصد بوده است که براساس مقایسه میانگین در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۳).

کال ها براساس رنگ و کیفیت به گروه جنینی (کال های دانه دار و شل که دارای رنگ کرم خاکستری و ترد و شکننده و با رشد سریعتر بودند) و غیر جنینی (کال های که متراکم و فشرده به رنگ سفید، سبز تیره یا قهوه ای و دارای رشد کمتری بودند) تقسیم بندی شدند. کال ها تا مدت ۱۲ هفته در محیط اولیه برای تکمیل و تکثیر کال دهی واکنش گردیدند.

نتایج مقایسه میانگین برای صفت درصد تولید کال های جنین زا در محیط MSB<sub>1</sub>

جدول ۳- مقایسه میانگین (روش دانکن) درصد کال دهی ریزنمونه های هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی ۴ ژنتیپ پنبه

MSB <sub>2</sub>	محیط کشت		ژنتیپ
	برگ کوتیلدونی	هیپوکوتیل	
کوکر ۳۱۲	۷۳/۳۳ <sup>a</sup>	۶۶/۶۶ <sup>ab</sup>	۳۲/۳۳ <sup>b</sup>
۳۴۹	۸۶/۶۶ <sup>a</sup>	۴۶/۶۶ <sup>ab</sup>	۴۶/۶۶ <sup>ab</sup>
C1211	۲۰/۸۳ <sup>b</sup>	۴۰ <sup>b</sup>	۳۳/۳۳ <sup>b</sup>
4-S-4	۹۳/۳۳ <sup>a</sup>	۸۰ <sup>a</sup>	۷۳/۳۳ <sup>a</sup>

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

عكس العمل تمامی ژنتیپ های مورد مطالعه به استثناء ژنتیپ C1211 مناسب بود.

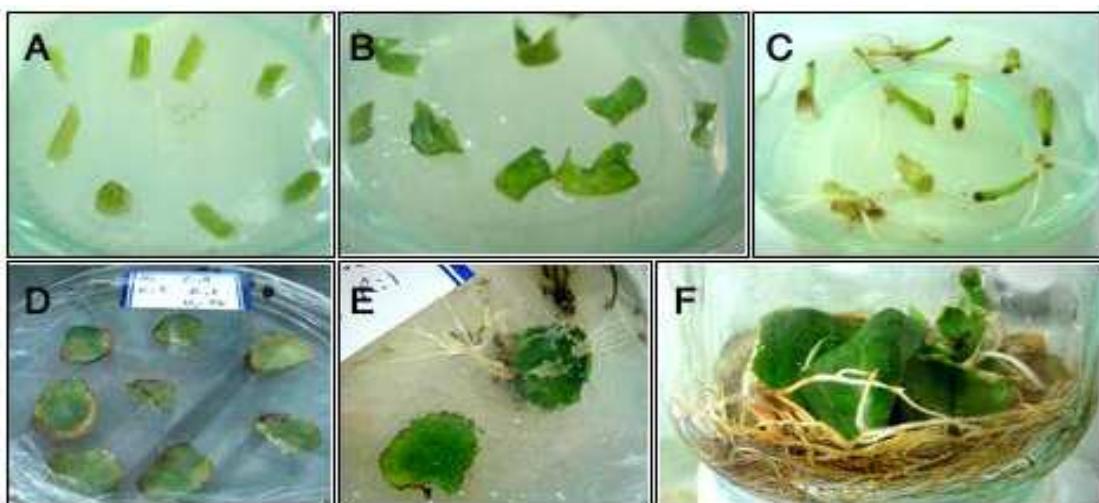
#### کال زایی و تولید کال های جنین زای ریزنمونه برگ کوتیلدونی

در محیط کشت MSB<sub>1</sub>، ریزنمونه برگ کوتیلدونی بعد از گذشت ۲۸-۲۸ روز و در محیط MSB<sub>2</sub>، فقط برخی از ژنتیپ ها بعد از گذشت ۲۲-۲۰ روز شروع به تولید سلول های کالوسی نمودند. که نتایج جدول تجزیه واریانس حاکی از اختلاف معنی دار بین محیط کشت ها و همچنین اثر متقابل ژنتیپ × محیط کشت می باشد (جدول ۲). نکته قابل توجه در این مطالعه، مشاهده افزایش سطح نمونه برگ

نتایج بدست آمده برای ریزنمونه هیپوکوتیل در ۲ محیط مورد مطالعه، بیانگر آن است که اختلاف بین ژنتیپ ها برای درصد کال زایی و تولید کال های جنین زا معنی دار نبوده و عکس العمل تمامی ژنتیپ ها تقریباً یکسان می باشد. ولی بین محیط ها تفاوت معنی داری در تولید کال مشاهده شد. برای درصد کال های جنینی نیز بین ژنتیپ ها و محیط ها اختلاف معنی دار وجود نداشته است. لذا می توان نتیجه گرفت که محیط MSB<sub>1</sub> بهترین محیط برای تمامی ژنتیپ ها با ریزنمونه هیپوکوتیل شان از نظر تولید کال و تولید کال های جنین زا می باشد. همچنین

می باشد. زمان تولید ریشه از هفته اول آغاز و با گذشت زمان، فقط به تعداد و طول ریشه های تولیدی افزوده شد (شکل ۱).

در این محیط در روزهای اولیه کشت و سپس شروع تولید ریشه از ریزنمونه برگ کوتیلدونی  $MSB_2$  به جای تولید کاللوس در محیط  $MSB_2$



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 کوکر ۳۱۲ در محیط  $MSB_2$ . D: افزایش سطح ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنوتیپ ۳۴۹ 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 ۴-S-4 و عدم تشکیل ساقه در محیط  $MSB_2$ .

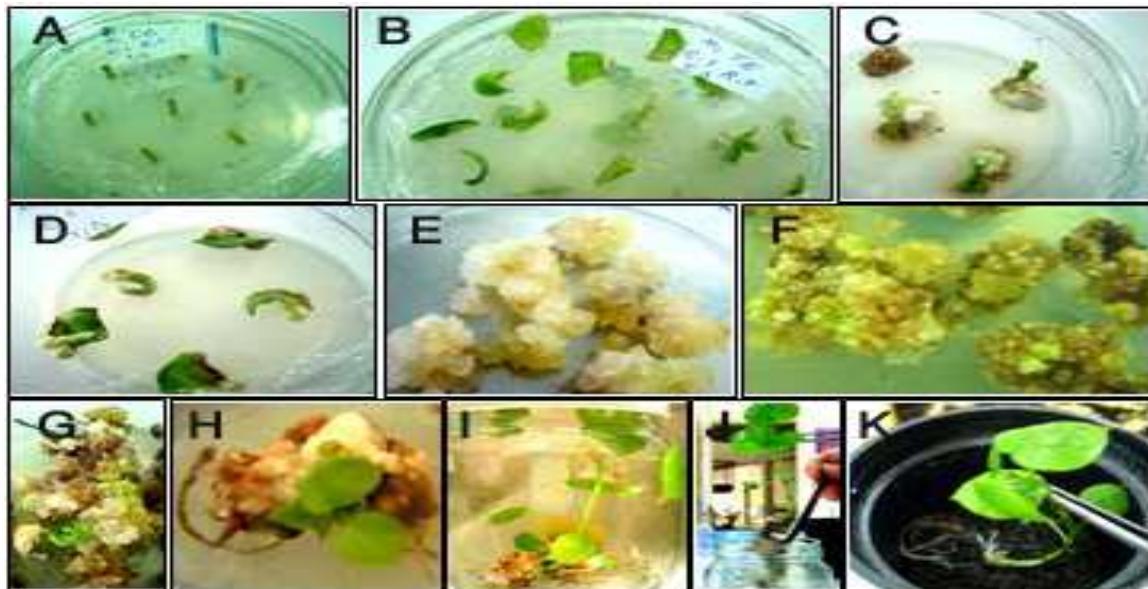
کشت ها می باشد که کال زایی فقط در ۲ ژنوتیپ ۴-S-4 و ۴۶/۶۶ آن هم ناچیز (۱۶/۳۳ درصد) مشاهده شد. ولی همه ژنوتیپ ها شروع به تولید تعداد زیادی ریشه در این محیط نمودند که مقدار ریشه زایی از ۳۳ درصد (ژنوتیپ ۴-S-4) تا ۳۳ درصد (ژنوتیپ ۴۶/۶۶) متغیر بوده است (جدول ۲).

مقایسه میانگین درصد تولید کال های جنین زا در محیط  $MSB_1$ ، نشان داد که باز هم ژنوتیپ ۴-S-4 (۷۷ درصد) در رتبه نخست و ژنوتیپ های کوکر ۳۱۲ و ۳۴۹ و C1211

در محیط  $MSB_1$  ژنوتیپ ها فقط تولید سلول های کاللوسی 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 ۴۶/۶۶ (۷۳/۳۳) و سپس ۳۴۹ (۴-S-4 درصد) و در نهایت کوکر ۳۱۲ 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

تولید کال ناچیزی مشاهده شده بود کال های جنینی تولید نشد.

(به ترتیب با ۷۱، ۶۸/۳۳ و ۵۵ درصد) در گروه بعدی قرار گرفتند. در محیط  $MSB_2$  نیز که



شکل ۲- مراحل انجام شده برای باززایی ژنتیپ های پنبه از ریزنمونه هیپوکوتیل و برگ کوتیلدونی در محیط  $MSB_1$ : A: کشت ریزنمونه هیپوکوتیل ژنتیپ ۳۴۹ در محیط  $MSB_1$ , B: کشت ریزنمونه برگ کوتیلدونی رقم کوکر ۳۱۲ در محیط  $MSB_1$ , C: تحریک و شروع کال دهی ریزنمونه هیپوکوتیل ژنتیپ ۴-S-4, D: ۴-S-4: کال دهی ریزنمونه برگ کوتیلدونی ژنتیپ ۳۴۹, E: کال جنین زایی در ژنتیپ ۴-S-4, F: شروع تولید جنین از کال های جنین زایی در ژنتیپ ۴-S-4, G: مراحل جنین زایی در ژنتیپ ۴-S-4, H: جوانه زنی جنین های سوماتیکی ژنتیپ ۴-S-4, I: رشد گیاهچه های باززا شده از محیط کشت به خاک سبک و استریل شده.

### تعیین بهترین محیط کشت، ریزنمونه و ژنتیپ برای کال زایی

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

در نتیجه این بررسی می توان گزارش داد که محیط  $MSB_2$  برای تولید کال از ریزنمونه برگ کوتیلدونی نامناسب بوده و تمامی ژنتیپ ها در این محیط قادر به تولید کال و کال جنین زایی نبوده و فقط ۲ ژنتیپ مقدار ناچیزی کال غیرجنین زایی 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.

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

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

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

محیط<sub>۱</sub> و هم در محیط MSB<sub>2</sub> نتایج یکسان و خوبی نشان داده است. و در بین این دو ژنوتیپ، ۴-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<sub>1</sub> و MSB<sub>2</sub>) وارد محیط تحریک جنین زایی و بلوغ جنین ها (MS<sub>1a</sub>) شدند. کال ها به مدت ۷ هفته در این محیط قرار گرفته و هر ۲۱-۲۸ روز یکبار واکشت گردیدند. نکته قابل توجه در این محیط، قهوه ای شدن و عدم رشد اغلب تکرارهای کاللوسی بعد از واکشت در این محیط بود. که به نظر مدت زمان ماندن در این محیط می بايست از ۷ هفته کمتر شود. لذا یکسری از

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 ۴-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<sub>1</sub> استفاده نمود.

در بین ژنوتیپ های مورد بررسی، می توان ژنوتیپ های ۴-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 ۴-S-4 در محیط MSB<sub>1</sub> بهترین نتیجه را نشان داده است. ولی در ژنوتیپ ۳۴۹ ریزنمونه هیپوکوتیل هم در

تعدادی گیاهچه شدند. از ژنتیپ C1211 گیاهچه ای تولید نشد. تعدادی از گیاهچه ها در محیط MS<sub>2a</sub> 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 لوبيای سودانی و یورانبی و همکاران (۲۰) بالاترین ریشه زایی در شبدر ایرانی و افشاری (۱) بهترین تیمار برای ریشه زایی شنبیله 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 ژنتیپ می باشد که در بین ژنتیپ های موردن بررسی در این مطالعه ژنتیپ ۴-S-4 زودترین شروع کال دهی را هم با ریزنمونه هیپوکوتیل و هم با برگ کوتیلدونی نسبت به سایر ژنتیپ ها دارا بوده است. در بررسی توحیدفر و همکاران (۱۹) رقم کوکر ۳۱۲ زودتر از ارقام ساحل و در بررسی گروسوی 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 ژنتیپ ها

تکرارهای کالوسی واکشت نشده و فقط به مدت یک ماه در محیط MS<sub>1a</sub> قرار گرفتند که علائم جوانه زنی ژنتیپ های ۴-S-4 و ۳۴۹ در این محیط اتفاق افتاد و بلافضله جوانه ها و کال های جنینی از این محیط به محیط جوانه زنی MS<sub>2a</sub> 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 ۱-۲ 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<sub>1a</sub>) و یا نامناسب بودن میزان نور، نوع هورمون های مورد استفاده و یا سایر موارد همچون خصوصیات ژنتیکی کال های مربوط به هر ژنتیپ 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 ژنتیپ ها، ژنتیپ ۴-S-4 و ۳۴۹ و سپس کوکر ۳۱۲ موفق به تولید

بدست آوردنده. 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 D-2,4-، همکاران (۱۱) بود که با استفاده از Riznomenه کینتین، کال های بسیار ترد از Riznomenه هیپوکوتیل و کوتیلدون پنیه رقم کوکر ۳۱۰ بدست آوردنده. نتایج این تحقیق همچنین مشابه با نتایج گروسوی و همکاران (۶) می باشد که با استفاده از هورمون D-2,4- و کینتین (با غلطت هایی مشابه با این تحقیق) درصد کال دهی نسبتاً بالایی را از Riznomenه هیپوکوتیل در ارقام ساحل (۸۸ درصد) و کوکر ۳۱۲ (۷۵ درصد) و ورامین (۵۷ درصد) گزارش نمودند.

با وجود اینکه D-2,4- به طور گسترده در کشت بافت پنیه استفاده می شود ولی باید از محیط بازیابی و جنین زایی حذف شود. به نظر می رسد انتقال کال ها از محیط دارای D-2,4- به محیط کشت فاقد آن باعث تحریک جنین زایی می شود و استفاده از نیترات پتابسیم درصد جنین زایی را افزایش می دهد. آنیون نیترات در ترکیب با نیترات پتابسیم با تحریک شروع جنین زایی 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 گروسوی و همکاران (۶) نیز با استفاده از زآتین به نتایج مشابهی دست یافته اند. غلطت کم زآتین (۱۰/۰ 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).

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 جنین را 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 Riznomenه کوتیلدون ارقام ساحل و سای اکرا در محیط کشت بدون سیتوکینین و ۲ میلی گرم بر لیتر NAA و هیبرید کوکر ۳۱۲ × کوکر ۳۴۹ در محیط حاوی ۱ میلی گرم بر لیتر NAA بهترین کال زایی را داشتند. ژانگ و همکاران (۲۱) وقتی از D-2,4- برای تحریک و تکثیر کال پنیه 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 پنیه رقم Xinluao کال هایی تولید کردند که جنین زا و غیرجنین زا بودند ولی کومربا و همکاران (۱۰) با استفاده از D-2,4-، کینتین و Riznomenه هیپوکوتیل توانستند کال های بسیار ترد

پیشنهاد می شود از محیط های دیگری برای تحریک و بلوغ جنین ها و همچنین جوانه زنی جنین ها استفاده شود تا بتوان به تعداد گیاهچه های بازرا شده بیشتری دست یافت.

پنبه گیاهی است که در صد 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

## 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. The 10<sup>th</sup> 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.

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. The 5<sup>th</sup> 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.

## Study of Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Cotton

**L. Fahmideh<sup>1</sup>, G.A. Ranjbar<sup>2</sup>, O. Alishah<sup>3</sup> and N.A. Babaeian Jelodar<sup>4</sup>**

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  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D,  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  kinetin,  $0.75 \text{ g l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  and MSB2 medium supplemented with  $1 \text{ mg l}^{-1}$  NAA. Cultures incubated at  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  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  $0.75 \text{ g l}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  and  $1.9 \text{ g l}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ . 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