مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیستم، شماره اول، ۱۳۹۲
http://jopp.gau.ac.ir

# نقش پیش‌تیمار سرمایی و عوامل هورمونی در کالوس‌زایی تخمک تعدادی از ارقام پنبه (*Gossypium* sp.) در شرایط درون شیشه‌ای

*کمال قاسمی بزدی[۱] و وحیده خندان[۲]
[۱]استادیار موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان، [۲]دانش‌آموخته دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۱

## چکیده

استفاده از سلول‌های تخمک جهت تولید گیاهان هاپلوئید، یکی از کاربردهای اساسی کشت بافت محسوب می‌شود. با توجه به این‌که شرایط بهینه کشت بافت، بسته به گونه گیاهی، ژنوتیپ درون‌گونه، ترکیب محیط کشت و عوامل محیطی مختلف فرق می‌کند، در این پژوهش، اثرات پیش‌تیمارهای سرمایی ۱، ۳ و ۱۰ روزه در ۴ درجه سانتی‌گراد و ترکیبات مختلف هورمونی محیط کشت MS بر کالوس‌زایی ریزنمونه تخمک چهار رقم پنبه (*Gossypium* sp.) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، تخمک‌هایی که ۱۰ روز القای سرما در آن‌ها صورت گرفته بود، بالاترین میزان کالوس‌زایی (۸۳/۷ درصد) را داشتند و پیش‌تیمار سرمایی کمتر از ۳ روز نسبت به تیمارهای سرمایی دیگر، اثر کاهشی معنی‌داری (۲۸ درصد) بر کالوس‌زایی داشت. ریزنمونه‌های ارقام مختلف نیز کالوس‌زایی متفاوتی داشتند و رقم ساحل به‌طور معنی‌داری کالوس‌زایی بالاتری نسبت به رقم بومی هاشم‌آباد داشت. از طرفی غلظت‌های پایین اکسین (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D) نقش مثبتی در کالوس‌زایی تخمک داشتند و غلظت‌های BAP بالاتر از ۳ میلی‌گرم در لیتر، اثر بازدارنده‌ای بر کالوس‌زایی نشان دادند. بنابراین، زمان‌های متفاوت القای سرما، نوع رقم و غلظت هورمونی محیط‌کشت بر میزان تولید کالوس از تخمک ارقام مختلف پنبه تاثیرگذار بودند و غلظت‌های پایین 2,4-D همراه با افزایش مدت القای تیمار سرمایی نقش مثبتی در کالوس‌زایی تخمک داشتند. علاوه‌بر

*مسئول مکاتبه: kghasemibezdi@yahoo.com

درصد کالوس‌زایی، تیمارهای مختلف بر رنگ و اندازه کالوس‌های ایجاد شده نیز مؤثر بودند، به‌طوری‌که تخمک‌های رقم ساحل که به‌مدت ۱۰ روز تحت القای سرما قرار گرفته بودند، کالوس‌های متوسط تا بزرگ و سبز روشن تولید کردند و افزایش زمان پیش‌تیمار سرمایی تا روز دهم و همچنین مقادیر پایین 2,4-D (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) در محیط کشت، سبب افزایش اندازه کالوس‌ها گردیدند.

***واژه‌های کلیدی:*** ریزنمونه، هاپلوئید مضاعف، همی‌زیگوس، ژنوتیپ

**مقدمه**

پنبه یکی از مهم‌ترین گیاهان صنعتی استراتژیک جهان به‌شمار می‌رود که به‌طور روزمره به‌عنوان یک کالای حیاتی و موردنیاز تمام افراد بشر استفاده می‌شود و ماده اولیه دو صنعت بزرگ نساجی و روغن‌کشی را تأمین می‌کند. پیشرفت‌های شگرفی که امروزه در تهیه انواع الیاف مصنوعی پدید آمده است، ارزش و توان رقابت با پنبه را ندارند و تاکنون نتوانسته‌اند از نظر کلیه صفات در بازارهای جهانی با پنبه رقابت کنند و جایگاه پنبه هم‌چنان پابرجا مانده است (قاسمی بزدی، ۲۰۱۱).

کاربرد تکنیک‌های بیوتکنولوژی، به محققان این امکان را می‌دهد که بر روی صفات خاصی در هر زمان دست‌ورزی نمایند و کنترل موشکافانه‌ای در کشاورزی داشته باشند (قاسمی بزدی و احمدی، ۲۰۱۲). یکی از تکنیک‌های مورد استفاده در بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات که طی سال‌های اخیر به ابزاری قوی برای تکثیر و اصلاح بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است، کشت بافت می‌باشد و یکی از کاربردهای اساسی آن که اهمیت به‌سزایی در پژوهش‌های به‌نژادی و انتقال ژن دارد، تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت تخمک یا سلول‌های هاپلوئید موجود در بساک است که این گیاهان از منابع عمده و مورد علاقه ژنتیک‌دانان و به‌نژادگران گیاهی به‌شمار می‌روند، زیرا با دو برابر کردن کروموزوم‌های آن‌ها، هاپلوئیدهای مضاعف شده به‌دست می‌آیند که کاملا هموزیگوس هستند و امکان انتخاب لاین‌های با صفات کمی و کیفی مطلوب و مناسب از میان آن‌ها وجود دارد (قاسمی بزدی و احمدی، ۲۰۱۰).

در روش‌های سنتی به‌نژادی، برای رسیدن به هموزیگوسیتی موردنظر، حداقل ۵ تا ۶ نسل خودگشنی لازم است، ولی در روش تولید هاپلوئیدهای مضاعف شده در درون شیشه، علاوه‌بر کاهش مدت زمان برنامه‌های اصلاحی و افزایش قابل ملاحظه کارایی گزینش، صفات مطلوب زراعی

به‌سرعت تثبیت می‌شوند و طی یک نسل می‌توان به هموزیگوسیتی کامل و ۱۰۰ درصد رسید. همچنین در روش‌های مرسوم تولید گیاهان خالص به‌طریقه خویش‌آمیزی، درصد کمی از ناخالصی باقی می‌ماند. در حال حاضر این روش به‌عنوان ابزاری در فرایندهای اصلاحی به‌ویژه در ژنوتیپ‌های هتروزیگوت طبیعی برای حذف اثر ترکیبات نامطلوب ژنی حاصل از کشش پیوستگی و یا جفت‌وجور شدن تصادفی آن‌ها محسوب می‌گردد. بنابراین، به‌نژادگران می‌توانند از طریق روش‌های کلاسیک و یا روش‌های درون شیشه‌ای به گیاهان هاپلوئید دست یابند. با توجه به این‌که جهت عملیات کشت بافت هر گیاهی یک سیستم کالوس‌زایی و باززایی مشخص و کارآمد ضروری است، از طرفی باززایی گیاهان در گونه‌های جنس گوسیپیوم شدیداً وابسته به ژنوتیپ می‌باشد (قاسمی بزدی، ۲۰۱۱) و اغلب مطالعات مربوط به باززایی‌های موفق نیز بر روی واریته شاهد کوکر-۳۱۲ و لاین‌های وابسته به آن انجام گرفته است (سیدسرفراز و همکاران، ۲۰۰۵)، بنابراین جهت استفاده از تکنیک‌های درون شیشه‌ای مختلف در مورد پنبه و موفقیت در این دست‌ورزی‌ها، ضرورت بهینه‌سازی شرایط کشت بافت و افزایش قابلیت باززایی مستقل از ژنوتیپ ارقام پنبه ایران، احساس می‌شود.

در سال‌های اخیر پژوهش‌های مختلفی در رابطه با کالوس‌زایی و باززایی پنبه در شرایط کشت بافت انجام شده است. فاکتورهای مختلفی شامل منبع و نوع ریزنمونه کشت شده، سن و سلامتی گیاه، نوع گونه و نوع ژنوتیپ درون گونه، انواع محیط کشت، مقادیر، نوع و ترکیبات مختلف تنظیم کننده‌های رشد، درجه حرارت، شدت نور و شرایط تاریکی و فاکتورهای دیگر بر روی کالوس‌زایی و باززایی پنبه تأثیرگذار هستند (سینگ و چاند، ۲۰۰۳؛ میشرا و همکاران، ۲۰۰۳؛ گوپتا و همکاران، ۲۰۰۴؛ قائمی و همکاران، ۲۰۱۱).

برای موفقیت در کشت بافت، ترکیب محیط کشت از اهمیت خاصی برخوردار است. هورمون‌هایی مانند اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها جهت کنترل رشد و تقسیمات سلولی می‌توانند در زمان مناسب به محیط کشت اضافه شوند که نقش مهمی در ایجاد کالوس دارند. برخی از قطعات گیاهی کشت شده برای تولید کالوس فقط به اکسین و برخی فقط به سیتوکینین و بیشتر کشت‌ها به هر دو نیاز دارند. فرمول بهینه محیط کشت بسته به نوع گونه، نوع ژنوتیپ درون گونه و منشأ و سن بافت کشت داده شده، فرق می‌کند (قاسمی بزدی و احمدی، ۲۰۱۰).

معمولا موفقیت باززایی در گیاهان مختلف علاوه بر سایر عوامل، به نوع بافت ریزنمونه نیز بستگی دارد. در کارهای کشت بافت گیاهی از ریزنمونه‌های مختلفی شامل محور زیرلپه، برگ‌های لپه‌ای،

قطعات برگ، دمبرگ، ساقه، ریشه، جنین، جوانه‌های برگ‌های لپه‌ای به همراه نوک ساقه، مریستم، تخمک، دانه گرده و غیره استفاده شده است (میشرا و همکاران، ۲۰۰۳؛ گوپتا و همکاران، ۲۰۰۴؛ سیدسرفراز و همکاران، ۲۰۰۵؛ رائو و همکاران، ۲۰۰۶؛ جین و همکاران، ۲۰۰۶؛ قاسمی بزدی و همکاران، ۲۰۰۷؛ مشایخی و همکاران، ۲۰۰۸؛ قائمی و همکاران، ۲۰۱۱) و پژوهشگران مختلف براساس هدف پژوهش، ریزنمونه موردنظر را انتخاب نموده‌اند.

بر اساس نتایج گروسی و همکاران (۲۰۰۷) قدرت کالوس‌دهی در پنبه صفتی است که تا حدودی وابسته به ژنوتیپ می‌باشد. قاسمی بزدی (۲۰۰۸) نیز طی پژوهش‌های خود اثر ژنوتیپ را معنی‌دار گزارش نمود. براساس نظر اوما و همکاران (۲۰۰۴)، پنبه گیاهی است که قابلیت باززایی بیشتر ارقام تجاری آن از طریق جنین‌زایی سوماتیکی یا سوسپانسیون سلولی به مقدار زیادی وابسته به ژنوتیپ بوده و باززایی آن نسبت به بسیاری از گیاهان دیگر مشکل‌تر می‌باشد. در مجموع، پنبه به‌عنوان یک گیاه ریکالسیترانت (سخت باززا) در سیستم‌های درون شیشه‌ای شناخته می‌شود و کشت بافت و باززایی از آن دشوار می‌باشد و درصد موفقیت به‌دست آمده تاکنون در باززایی ارقام تجاری پنبه ایران خیلی زیاد نبوده است (قاسمی بزدی، ۲۰۰۸؛ قائمی و همکاران، ۲۰۱۱).

نقش پیش‌تیمار سرمایی در کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های گیاهان مختلف نیز در موارد متعددی مورد بررسی قرار گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به پژوهش‌های وحدتی و همکاران (۲۰۱۰) در بهبود جوانه‌زنی رویان‌های غیرجنسی گردوی ایرانی، قریشی (۲۰۰۸) در ریزازدیادی سوسن، غفاری و همکاران (۲۰۰۵) بر روی پاسخ به کشت بساک گندم اشاره نمود. عروجلو و همکاران (۲۰۱۱) نیز تأثیر تنش‌های حرارتی را بر جنین‌زایی میکروسپور و باززایی هاپلوئیدهای مضاعف شده کلزا مورد بررسی قرار دادند.

هدف از این پژوهش، بررسی اثرات پیش‌تیمار سرمایی انواع و غلظت مختلف هورمون‌ها در کالوس‌زایی ریزنمونه تخمک پنبه جهت به‌کارگیری آن در اصلاح گیاه و بررسی واکنش‌های برخی از ارقام پنبه نسبت به کشت هاپلوئیدی در شرایط درون شیشه‌ای بود.

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت موسسه تحقیقات پنبه کشور در شهرستان گرگان انجام شد، از سه رقم پنبه تتراپلوئید آپلند (*Gossypium hirsutum*) به نام‌های

نامبر۲۰۰، سیلند و ساحل و یک رقم پنبه بومی دیپلوئید (*Gossypium herbaceum*) به‌نام بومی هاشم‌آباد استفاده شد. با توجه به عکس‌العمل متفاوت ارقام و ریزنمونه‌های پنبه به ترکیبات محیط کشت، از ریزنمونه تخمک و محیط کشت MS به همراه ترکیبات مختلفی از هورمون‌های 2,4-D و BAP جهت کالوس‌زایی استفاده شد. در مورد پیش‌تیمار سرمایی نیز تیمارهای ۱، ۳ و ۱۰ روزه در ۴ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفتند.

به‌منظور تهیه ریزنمونه تخمک، از ارقام پنبه کاشته شده در گلخانه که پس از حدود ۸ هفته به مرحله گل‌دهی رسیدند، گل‌های مناسب هر بوته قبل از گرده‌افشانی، از پایه مادری قطع شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از حذف گلبرگ‌ها و کاسبرگ‌های گل، تخمدان دارای تخمک‌های تلقیح نشده، ابتدا به‌مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند، سپس با آب مقطر استریل شستشو گردیده و به‌مدت ۴ تا ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد تجاری استریل شدند. در نهایت ۳ تا ۵ بار با آب دوبار تقطیر استریل عمل شستشو انجام شد. پس از شکافتن دیواره تخمدان، تخمک‌ها استخراج شده و در شرایط استریل بر روی محیط کشت‌های موردنظر منتقل شدند و در اتاقک رشد با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت فتوپریود ۱۸/۶ ساعت تاریکی/ روشنایی قرار گرفتند.

تمام کشت‌ها هر ۲ تا ۳ هفته یک بار بر روی محیط کشت‌های تازه واکشت شدند. از هفته چهارم به بعد، ظهور یا عدم ظهور کالوس، درصد کالوس‌زایی، تاریخ کالوس‌دهی، اندازه، رنگ و ویژگی‌های ظاهری کالوس‌های ایجاد شده در ریزنمونه‌های ارقام پنبه در سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد به‌کار برده شده در محیط کشت‌ها، مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفتند.

نتایج به‌دست آمده از پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

## نتایج و بحث

ابتدا درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس ریزنمونه‌های تخمک تلقیح نشده ارقام پنبه نامبر۲۰۰ و سیلند بر روی محیط کشت MS تحت تأثیر تیمارهای سرمایی ۱، ۳ و ۱۰ روزه مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج تجزیه واریانس، کالوس‌زایی در ریزنمونه تخمک، بین دو رقم مورد مطالعه

اختلاف معنی‌داری نشان نداد، ولی تحت تأثیر پیش‌تیمار سرمایی و همچنین اثر متقابل فاکتورهای مورد بررسی در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

**جدول ۱- تجزیه واریانس به‌دست آمده از تأثیر رقم، پیش‌تیمار سرمایی و اثر متقابل این فاکتورها بر کالوس‌زایی تخمک پنبه.**

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | |
|---|---|---|---|
| | | کالوس‌زایی (درصد) | اندازه کالوس(میلی‌متر) |
| رقم | ۱ | ۷۴۸/۲ n.s | ۲/۰۵ n.s |
| پیش‌تیمار سرمایی | ۲ | ۶۲۵۶/۲ ** | ۲/۶ * |
| رقم × تیمار سرمایی | ۲ | ۳۰۲۱/۲ ** | ۳/۲ ** |
| اشتباه | ۱۸ | ۴۳۷/۶ | ۰/۵ |
| کل | - | ۵۷/۲ | ۱/۶ |

n.s: عدم اختلاف معنی‌دار **: معنی‌دار در سطح یک درصد *: معنی‌دار در سطح پنج درصد

براساس نتایج مقایسه میانگین‌های اثر متقابل پیش‌تیمار سرمایی × رقم (جدول ۲)، از نظر درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس (قطر ضخیم‌ترین قسمت کالوس) در زمان‌های متفاوت پیش‌تیمار سرمایی، ریزنمونه‌ها در گروه‌های مختلفی قرار گرفتند. نتایج میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها نشان داد که رقم نامبر ۲۰۰ تحت تیمار سرمایی ده روز، با ۹۰/۳ درصد بیشترین میزان کالوس‌زایی را دارا بود.

**جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل پیش‌تیمار سرمایی× رقم بر درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس ریزنمونه تخمک پنبه.**

| ردیف | رقم | پیش‌تیمار سرمایی (روز) | کالوس‌زایی (درصد) | | میانگین کالوس‌زایی (درصد) | | اندازه کالوس (میلی‌متر) | | میانگین اندازه کالوس (میلی‌متر) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | نامبر ۲۰۰ | ۱ | ۰/۰ | c | ۲۸/۰ | c | - | b | ۰/۹۵ | b |
| ۲ | سیلند | ۱ | ۵۶/۰ | b | | | ۱/۹ | a | | |
| ۳ | نامبر ۲۰۰ | ۳ | ۶۴/۸ | ab | ۵۹/۷ | b | ۲/۰ | a | ۱/۸ | a |
| ۴ | سیلند | ۳ | ۵۴/۶ | b | | | ۱/۶ | a | | |
| ۵ | نامبر ۲۰۰ | ۱۰ | ۹۰/۳ | a | ۸۳/۷ | a | ۱/۹ | a | ۲/۰۵ | a |
| ۶ | سیلند | ۱۰ | ۷۷/۱ | ab | | | ۲/۲ | a | | |

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

ریزنمونه‌های موجود بر روی محیط کشت‌هایی که مدت ۱۰ روز القای سرما در آن‌ها صورت گرفته بود، با میانگین ۸۳/۷ درصد کالوس‌زایی در بالاترین رده جدول مقایسه میانگین‌ها جای گرفتند. ریزنمونه‌هایی که ۳ روز القای سرمایی در آن‌ها صورت گرفته بود با ۵۹/۷ درصد کالوس‌زایی در رده بعدی قرار گرفتند. ریزنمونه‌های تیمار شده با یک روز القای سرما، با ۲۸ درصد کم‌ترین کالوس‌زایی را دارا بودند. با توجه به تعداد روزهای متفاوت القای سرما مشاهده شد که افزایش مدت زمان پیش‌تیمار سرمایی به ۱۰ روز، منجر به تولید کالوس بیشتر گردید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تعداد روزهای متفاوت القای سرما بر میزان تولید کالوس در کشت تخمک ارقام پنبه تأثیرگذار می‌باشد و تعداد روزهای پیش‌تیمار سرمایی بیشتر، می‌تواند نقش مثبتی در کالوس‌زایی تخمک پنبه داشته باشد که نظر مطلبی آذر و همکاران (۲۰۰۶) را در بررسی اثرات پیش‌تیمارهای سرمایی و گرمایی بر کالوس‌زایی و شاخه‌زایی کشت بساک گوجه‌فرنگی تایید می‌کند که با اعمال پیش‌تیمارهای دمایی بساک‌ها، می‌توان موفق به تولید جمعیت هاپلوئید شد. همچنین نتایج، تاییدی بر نظر ناصریان و همکاران (۲۰۰۵) می‌باشد که بیان داشتند صفات آندروژنز در گندم، در کنترل ژنوتیپ و محیط است و پیش‌تیمار سرمایی در پاسخ به کشت بساک گندم مؤثر است.

علاوه بر درصد کالوس‌زایی، مشاهده و مقایسه اندازه و ظاهر کالوس‌های ایجاد شده نشان داد که تعداد روزهای القای پیش‌تیمار سرمایی، بر رنگ و اندازه کالوس‌های تولید شده نیز مؤثر می‌باشد. تخمک‌هایی که به‌مدت ۱۰ روز تحت القای سرما قرار گرفته بودند کالوس‌های متوسط تا بزرگ و سبز روشن تولید کردند. بنابراین می‌توان چنین برداشت کرد که افزایش مدت زمان پیش‌تیمار سرمایی به ۱۰ روز سبب افزایش اندازه کالوس در کشت تخمک ارقام پنبه می‌شود.

با توجه به معنی‌دار بودن اثر پیش‌تیمار سرمایی و معنی‌دار نشدن اثر رقم بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها، در آزمایشی جداگانه مبادرت به انتخاب دو رقم مختلف از دو گونه متفاوت پنبه به نام‌های ساحل و بومی هاشم‌آباد گردید تا تأثیر دو پیش‌تیمار سرمایی ۳ و ۱۰ روزه همراه با ترکیبات هورمونی مختلفی از BAP و 2,4-D بر کالوس‌زایی تخمک آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. رقم ساحل از گونه هیرسوتوم و تتراپلوئید بوده که رقم تجاری مورد کشت در استان‌های گلستان و مازندران است و بومی هاشم‌آباد از گونه *G.herbaceum* و دیپلوئید است و جزء پنبه‌های بومی متعلق به دنیای قدیم می‌باشد.

براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳)، درصد کالوس‌زایی تحت تأثیر رقم، پیش‌تیمار سرمایی، غلظت‌های هورمونی محیط کشت و همچنین اثر متقابل فاکتورها در سطح یک درصد معنی‌دار بود.

**جدول ۳- تجزیه واریانس به‌دست آمده از بررسی تأثیر رقم، پیش‌تیمار سرمایی، ترکیبات هورمونی محیط کشت و اثرات متقابل این فاکتورها بر کالوس‌زایی و اندازه کالوس تخمک پنبه.**

| منبع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | |
|---|---|---|---|
| | | کالوس‌زایی (درصد) | اندازه کالوس (میلی‌متر) |
| پیش‌تیمار سرمایی | ۱ | ۲۴۶۶۹/۸** | ۸** |
| رقم | ۱ | ۵۶۵۷/۸** | ۱/۱ n.s |
| رقم × پیش‌تیمار سرمایی | ۱ | ۳۹۴۴۵/۴** | ۲۶/۳** |
| ترکیب هورمونی محیط کشت | ۷ | ۱۹۴۲/۳** | ۱/۶** |
| هورمون × پیش‌تیمار سرمایی | ۷ | ۴۴۰۴/۶** | ۴/۴** |
| رقم × هورمون | ۷ | ۲۴۳۸/۳** | ۱/۹** |
| رقم × پیش‌تیمار سرمایی × هورمون | ۷ | ۱۶۴۷/۲** | ۰/۷ n.s |
| اشتباه | ۹۶ | ۵۶۱/۲ | ۰/۵ |
| کل | - | ۲۴/۸ | ۰/۶ |

ns: عدم اختلاف معنی‌دار **: معنی‌دار در سطح یک درصد

نتایج نشان داد که نوع و غلظت ترکیبات هورمونی، رقم و پیش‌تیمار سرمایی می‌توانند بر کالوس‌زایی تخمک پنبه مؤثر باشند. در حالی‌که از نظر اندازه کالوس، اثر پیش‌تیمار سرمایی و نیز غلظت‌های هورمونی محیط کشت در سطح یک درصد معنی‌دار بود ولی در اثر رقم تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. همچنین اثرات متقابل رقم در پیش‌تیمار سرمایی، هورمون در پیش‌تیمار سرمایی و رقم در هورمون، در سطح یک درصد معنی‌دار شدند.

داده‌های به‌دست آمده از مقایسه میانگین‌های اثر پیش‌تیمار سرمایی بر میزان تولید کالوس ریزنمونه‌ها که در جدول ۴ ارایه شده است نشان می‌دهد که ریزنمونه‌ها از نظر کالوس‌زایی در دو کلاس متفاوت قرار گرفته‌اند، به‌طوری که تیمار سرمایی ده روزه، با ۳۸/۷ درصد کالوس‌زایی به‌طور معنی‌داری در رده بالاتری نسبت به تیمار سرمایی سه روزه با ۱۰/۹ درصد قرار گرفته است. بنابراین، چنین استنباط می‌شود که افزایش مدت زمان القای تیمار سرمایی، نقش مثبتی در کالوس‌زایی تخمک

ارقام پنبه داشته است، که با مطالعات وحدتی و همکاران (۲۰۱۰) مبنی‌بر اثر مثبت اعمال پیش‌تیمار سرمایی در رسیدن به بالاترین تعداد رویان‌های بدنی گردوی ایرانی و همین‌طور بالا بردن درصد جوانه‌زنی آن‌ها مطابقت دارد.

در مورد اثر پیش‌تیمار سرمایی بر اندازه کالوس (جدول ۴) نیز تیمارهای سرمایی در دو گروه متفاوت قرار گرفتند و تیمار سرمایی ده روزه اندازه کالوس بزرگ‌تری تولید کرد.

**جدول ۴- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار سرمایی بر میزان کالوس‌زایی و اندازه کالوس تخمک ارقام پنبه.**

| ردیف | پیش‌تیمار سرمایی (تعداد روز القای سرما) | کالوس‌زایی (درصد) | | اندازه کالوس (میلی‌متر) | |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۳ | b | ۱۰/۹ | b | ۰/۳ |
| ۲ | ۱۰ | a | ۳۸/۷ | a | ۰/۸ |

براساس نتایج مقایسه میانگین‌های اثر رقم بر درصد کالوس‌زایی تخمک (جدول ۵)، رقم ساحل با ۳۱/۵ درصد به‌طور معنی‌داری درصد کالوس بیشتری از بومی هاشم‌آباد (۱۸/۱ درصد) تولید کرد و دو رقم در دو کلاس متفاوت قرار گرفتند.

**جدول ۵- مقایسه میانگین اثر رقم بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه تخمک پنبه.**

| ردیف | رقم | | درصد کالوس‌زایی |
|---|---|---|---|
| ۱ | ساحل | a | ۳۱/۵ |
| ۲ | بومی هاشم‌آباد | b | ۱۸/۱ |

بنابراین، نتایج نشان داد که نوع ژنوتیپ دهنده تخمک پنبه بر کالوس‌زایی آن مؤثر می‌باشد. در مطالعات ناصریان و همکاران (۲۰۰۵) نیز بر روی القای کالوس از کشت بساک گندم، اختلاف معنی‌داری بین ارقام مورد بررسی مشاهده شد که نشان دهنده تأثیر رقم بر کالوس‌زایی می‌باشد.

براساس نتایج میانگین درصد کالوس‌زایی اثر متقابل پیش‌تیمار سرمایی × رقم (جدول ۶)، ریزنمونه‌های تخمک در سه کلاس مختلف قرار گرفتند. ریزنمونه‌های رقم ساحل در تیمار سرمایی ۱۰ روزه با ۶۳ درصد، به‌طور معنی‌داری میزان کالوس‌زایی بالاتری داشتند و در رده اول قرار گرفتند. تیمارهای سرمایی ۳ و ۱۰ روزه در ریزنمونه‌های بومی هاشم‌آباد با ۲۲ و ۱۵ درصد کالوس‌زایی در رده

بعدی جای گرفتند. از نظر اندازه کالوس نیز تیمارهای سرمایی در سه کلاس متفاوت قرار گرفتند، به‌طوری‌که رقم ساحل با تیمار سرمایی ۱۰ روز به‌طور معنی‌داری اندازه کالوس بزرگ‌تری داشت.

**جدول ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل پیش‌تیمار سرمایی × رقم بر درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس ریزنمونه تخمک پنبه.**

| ردیف | پیش‌تیمار سرمایی (تعداد روز القای سرما) | رقم | کالوس‌زایی (درصد) | | اندازه کالوس (میلی‌متر) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۳ | ساحل | c | ۰ | — | |
| ۲ | ۳ | بومی هاشم‌آباد | b | ۲۲ | b | ۰/۸ |
| ۳ | ۱۰ | ساحل | a | ۶۳ | a | ۱/۵ |
| ۴ | ۱۰ | بومی هاشم‌آباد | b | ۱۵ | c | ۰/۳ |

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

در مقایسه میانگین‌های اثر تیمارهای هورمونی بر میزان کالوس‌زایی تخمک (جدول ۷)، ریزنمونه‌ها در سه کلاس متفاوت قرار گرفتند. بنابراین، نوع و غلظت ترکیبات هورمونی به‌کار رفته در محیط کشت می‌تواند بر کالوس‌زایی تخمک پنبه مؤثر باشد. محیط کشت $MS_5$ دارای یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و فاقد هورمون 2,4-D، با ۳۶/۱ درصد کالوس‌زایی در بالاترین رده قرار گرفت و به‌همراه آن سه ترکیب محیط کشت $MS_6$، $MS_7$ و $MS_8$ در گروه اول قرار گرفتند. محیط کشت‌های $MS_3$ و $MS_4$ به‌ترتیب با ۲۵ و ۲۹ درصد در رده بعدی قرار گرفتند و محیط کشت‌های $MS_1$ و $MS_2$ به‌ترتیب با ۱۱/۷ و ۷/۳ درصد، کم‌ترین کالوس‌زایی را دارا بودند. با توجه به نوع و غلظت ترکیبات هورمونی ذکر شده می‌توان چنین بیان داشت که غلظت‌های کم تا متوسط سیتوکینین نقش مثبتی در کالوس‌زایی تخمک ارقام پنبه مورد بررسی دارد و سبب افزایش درصد کالوس‌زایی می‌گردد. از طرفی حضور غلظت‌های پایین اکسین به‌همراه مقادیر متوسط تا زیاد سیتوکینین (بالاتر از ۳ میلی‌گرم بر لیتر) اثر بازدارنده‌ای بر کالوس‌زایی تخمک پنبه داشته است.

از نظر اندازه کالوس نیز انواع محیط کشت‌های به‌کار رفته در ۶ گروه متفاوت قرار گرفتند و محیط کشت $MS_8$ دارای ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D و فاقد هورمون BAP به‌طور معنی‌داری اندازه کالوس‌های بزرگ‌تری تولید نمود.

**جدول ۷- مقایسه میانگین اثر ترکیبات هورمونی محیط کشت بر درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس ریزنمونه تخمک ارقام پنبه.**

| کد محیط کشت | ترکیبات هورمونی محیط کشت (میلی‌گرم بر لیتر) | کالوس‌زایی (درصد) | | اندازه کالوس (میلی‌متر) | |
|---|---|---|---|---|---|
| $MS_1$ | MS + BAP(۶) + 2,4-D (۰) | b | ۱۱/۷ | b-d | ۰/۴۴ |
| $MS_2$ | MS + BAP(۶) + 2,4-D (۰/۱) | b | ۷/۳ | b-d | ۰/۳۸ |
| $MS_3$ | MS + BAP(۳) + 2,4-D (۰) | ab | ۲۵/۰ | d | ۰/۲۵ |
| $MS_4$ | MS + BAP(۳) + 2,4-D (۰/۱) | ab | ۱۹/۰ | cd | ۰/۳۲ |
| $MS_5$ | MS + BAP(۱) + 2,4-D (۰) | a | ۳۶/۱ | a-d | ۰/۶۲ |
| $MS_6$ | MS + BAP(۱) + 2,4-D (۰/۱) | a | ۳۴/۹ | a-c | ۰/۸۸ |
| $MS_7$ | MS + BAP(۰) + 2,4-D (۰) | a | ۳۱/۸ | ab | ۰/۹۴ |
| $MS_8$ | MS + BAP(۰) + 2,4-D (۰/۱) | a | ۳۲/۶ | a | ۱/۱۰ |

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

براساس میانگین اثر متقابل رقم × ترکیبات هورمونی (جدول ۸)، رقم ساحل بر روی محیط کشت $MS_3$ با ترکیب هورمونی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و فاقد 2,4–D، بیشترین کالوس‌زایی را داشت. بنابراین، ترکیبات متفاوت هورمونی بر میزان تولید کالوس در ریزنمونه تخمک تأثیرگذار می‌باشند که نظریات تریپلت (۲۰۰۰) و فولر و همکاران (۲۰۰۹) مبنی‌بر تأثیر هورمون‌های گیاهی به‌خصوص اکسین‌ها را در کشت تخمک گیاه پنبه تأیید می‌کند. نتایج، همچنین اثر رقم را بر کشت تخمک پنبه دوباره تأیید می‌کند، زیرا این بالاترین میزان کالوس‌دهی رقم ساحل با تیمار هورمونی ذکر شده درحالی مشاهده شد که میزان کالوس‌دهی رقم بومی هاشم‌آباد با همان ترکیب محیط کشت، صفر بود. همچنین براساس میانگین اثر متقابل رقم × هورمون بر اندازه کالوس (جدول ۸)، داده‌ها در کلاس‌های متفاوتی جای گرفتند.

**جدول ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × ترکیبات هورمونی محیط کشت بر درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس ریزنمونه تخمک پنبه.**

| کد محیط کشت | ترکیبات هورمونی محیط کشت (میلی‌گرم بر لیتر) | رقم | کالوس‌زایی (درصد) | اندازه کالوس (میلی‌متر) |
|---|---|---|---|---|
| $MS_1$ | MS + BAP(۶) + 2,4-D (۰) | ساحل | ۰۰/۰ d | — |
| $MS_2$ | MS + BAP(۶) + 2,4-D (۰/۱) | ساحل | ۰۰/۰ d | — |
| $MS_3$ | MS + BAP(۳) + 2,4-D (۰) | ساحل | ۵۰/۰ a | ۰/۵ b-d |
| $MS_4$ | MS + BAP(۳) + 2,4-D (۰/۱) | ساحل | ۳۸/۰ abc | ۰/۶ b-d |
| $MS_5$ | MS + BAP(۱) + 2,4-D (۰) | ساحل | ۴۳/۸ ab | ۰/۶ b-d |
| $MS_6$ | MS + BAP(۱) + 2,4-D (۰/۱) | ساحل | ۳۷/۵ abc | ۱/۱ a-c |
| $MS_7$ | MS + BAP(۰) + 2,4-D (۰) | ساحل | ۴۳/۸ ab | ۱/۵ a |
| $MS_8$ | MS + BAP(۰) + 2,4-D (۰/۱) | ساحل | ۳۸/۵ abc | ۱/۲ ab |
| $MS_1$ | MS + BAP(۶) + 2,4-D (۰) | بومی هاشم آباد | ۲۳/۴ a-d | ۰/۹ a-c |
| $MS_2$ | MS + BAP(۶) + 2,4-D (۰/۱) | بومی هاشم آباد | ۱۴/۶ cd | ۰/۷ a-c |
| $MS_3$ | MS + BAP(۳) + 2,4-D (۰) | بومی هاشم آباد | ۰۰/۰ d | — |
| $MS_4$ | MS + BAP(۳) + 2,4-D (۰/۱) | بومی هاشم آباد | ۰۰/۰ d | — |
| $MS_5$ | MS + BAP(۱) + 2,4-D (۰) | بومی هاشم آباد | ۲۸/۵ abc | ۰/۶ b-d |
| $MS_6$ | MS + BAP(۱) + 2,4-D (۰/۱) | بومی هاشم آباد | ۳۲/۳ abc | ۰/۶ cd |
| $MS_7$ | MS + BAP(۰) +2,4-D (۰) | بومی هاشم آباد | ۱۹/۸ bcd | ۰/۴ cd |
| $MS_8$ | MS + BAP(۰) +2,4-D (۰/۱) | بومی هاشم آباد | ۲۶/۷ abc | ۰/۹ a-c |

ـ میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظرآماری (در سطح ۵ درصد) در یک گروه قرار دارند.

علاوه‌بر آن، مشاهده و مقایسه اندازه و ظاهر کالوس‌های ایجاد شده نشان داد که رقم، نوع هورمون و غلظت هورمون‌های محیط کشت علاوه‌بر درصد کالوس‌زایی، بر رنگ و اندازه کالوس‌های تولید شده نیز مؤثر می‌باشند. ریزنمونه‌های موجود بر روی محیط کشت $MS_3$ دارای ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP بدون 2,4-D، گرچه کالوس‌های کوچک، متراکم و قهوه‌ای تولید کردند، اما از نظر درصد کالوس‌زایی، بیشترین میزان (۵۰ درصد) را نشان دادند. کشت تخمک رقم ساحل بر روی محیط کشت‌های $MS_4$، $MS_5$، $MS_6$، $MS_7$ و $MS_8$ منجر به تولید کالوس‌های متراکم، شیری رنگ و با حاشیه مضرس شد که در دومین رده جدول ۸ جای گرفتند. تخمک رقم بومی هاشم‌آباد بر روی

محیط کشت $MS_2$، کم‌ترین درصد کالوس‌زایی را با تولید کالوس‌هایی به‌رنگ قهوه‌ای تیره دارا بود و کالوس‌های تولید شده از رقم ساحل بر روی محیط کشت $MS_8$ به رنگ سبز با پرزهای شیری رنگ در سطح آن، از نظر اندازه نسبت به سایر کالوس‌ها درشت‌تر بودند. بنابراین می‌توان بیان نمود که مقادیر پایین اکسین سبب افزایش اندازه کالوس در کشت تخمک ارقام پنبه می‌شود.

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل تنش سرمایی در ترکیب هورمونی محیط کشت بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها (جدول ۹) نیز نشان داد که مدت زمان پیش‌تیمار سرمایی به‌همراه نوع و غلظت ترکیبات هورمونی بر کالوس‌زایی تخمک مؤثر می‌باشد. ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های $MS_7$ و $MS_8$ تحت تأثیر پیش‌تیمار سرمایی ۱۰ روزه با ۶۵/۱ و ۶۲/۵ درصد کالوس‌زایی در بالاترین رده قرار گرفتند، درحالی‌که بیشتر ریزنمونه‌های موجود بر روی محیط کشت‌هایی که تحت پیش‌تیمار سرمایی ۳ روزه قرار گرفتند، از درصد کالوس‌زایی پایینی برخوردار بودند یا این‌که هیچ‌گونه کالوسی تولید نکردند.

**جدول ۹- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات هورمونی محیط کشت × پیش‌تیمار سرمایی بر درصد کالوس‌زایی و اندازه کالوس ریزنمونه تخمک پنبه.**

| کد محیط کشت | ترکیبات هورمونی محیط کشت (میلی‌گرم بر لیتر) | پیش‌تیمار سرمایی (روز) | کالوس‌زایی (درصد) | اندازه کالوس (میلی‌متر) |
|---|---|---|---|---|
| $MS_1$ | Ms + BAP(۶) + 2,4-D (۰) | ۳ | ۲۳/۴ def | ۰/۹۰cd |
| $MS_2$ | Ms + BAP(۶) + 2,4-D (۰/۱) | ۳ | ۱۴/۷ ef | ۰/۸۰cde |
| $MS_3$ | Ms + BAP(۳) + 2,4-D (۰) | ۳ | ۰/۰ f | — e |
| $MS_4$ | Ms + BAP(۳) + 2,4-D (۰/۱) | ۳ | ۰/۰ f | — e |
| $MS_5$ | Ms + BAP(۱) + 2,4-D (۰) | ۳ | ۲۸/۵ cde | ۰/۶۳ cde |
| $MS_6$ | Ms + BAP(۱) + 2,4-D (۰/۱) | ۳ | ۱۹/۸ def | ۰/۵۰ cde |
| $MS_7$ | Ms + BAP(۰) + 2,4-D (۰) | ۳ | ۱/۰ f | ۰/۱۳ de |
| $MS_8$ | Ms + BAP(۰) + 2,4-D (۰/۱) | ۳ | ۰/۰ f | — e |
| $MS_1$ | Ms + BAP(۶) + 2,4-D (۰) | ۱۰ | ۰/۰ f | — e |
| $MS_2$ | Ms + BAP(۶) + 2,4-D (۰/۱) | ۱۰ | ۰/۰ f | — e |
| $MS_3$ | Ms + BAP(۳) + 2,4-D (۰) | ۱۰ | ۵۰/۰ abc | ۰/۵۰ cde |
| $MS_4$ | Ms + BAP(۳) + 2,4-D (۰/۱) | ۱۰ | ۳۸/۰ b-e | ۰/۶۳ cde |
| $MS_5$ | Ms + BAP(۱) + 2,4-D (۰) | ۱۰ | ۴۳/۸ a-d | ۰/۶۳ cde |
| $MS_6$ | Ms + BAP(۱) + 2,4-D (۰/۱) | ۱۰ | ۵۰/۰ abc | ۱/۵۰ bc |
| $MS_7$ | Ms + BAP(۰) + 2,4-D (۰) | ۱۰ | ۶۲/۵ ab | ۱/۸۰ ab |
| $MS_8$ | Ms + BAP(۰) + 2,4-D (۰/۱) | ۱۰ | ۶۵/۱ a | ۲/۱۰ a |

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

براساس نتایج به‌دست آمده از اثر متقابل سه‌گانه رقم در نوع و غلظت ترکیبات هورمونی محیط کشت در پیش‌تیمار سرمایی (داده‌ها نشان داده نشده‌اند)، تخمک‌های رقم ساحل بر روی محیط کشت $MS_3$ تحت القای ۱۰ روز پیش‌تیمار سرمایی، با ۱۰۰ درصد، بیشترین میزان تولید کالوس را دارا بودند.

## نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، با توجه به نوع و غلظت ترکیبات هورمونی استفاده شده و نیز مدت زمان القای پیش‌تیمار سرمایی، می‌توان چنین استنباط کرد که غلظت‌های پایین 2,4-D (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) همراه با افزایش مدت زمان القای تیمار سرمایی نقش مثبتی در کالوس‌زایی تخمک ارقام پنبه داشته است. از طرفی افزایش غلظت BAP به بالاتر از ۳ میلی‌گرم بر لیتر، اثر بازدارنده‌ای بر کالوس‌زایی تخمک پنبه داشته است و اثر منفی غلظت‌های بالای سیتوکینین با وجود نقش مثبت اعمال تنش سرما از بین نرفته است.

## منابع


1. Fuller, R.J., Carman, J.G., and Hess, J.R. 2009. Nutrient and hormone levels in cotton ovules during embryony. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 99: 183–192.
2. Garousi, S., Tohidfar, M., Kazemi Tabar, S.K., Rahimian, H., and Nematzadeh, G.A. 2007. Somatic embryogenesis in three cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). Iranian J. Crop Sci. 9 (4): 302-314.
3. Ghaemi, M., Majd, A., Fallahian, F., and Ghasemi Bezdi, K. 2011. Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (*Gossypium* Spp.) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis. Afr. J. Biotechnol. 10 (15): 2915-2922.
4. Ghaffari, M., Naserian, B., Rahimi, M., and Vadadi, S. 2005. Effects of seed irradiation with gamma rays and the spike cold pre-treatment on anther culture response of wheat. Fourth National Biotechnology Congress of Iran. International Center for Environmental Science and technology. Kerman, Iran.
5. Ghasemi Bezdi, K. 2008. Study of shoot regeneration potential of cotton cultivars (*Gossypium* spp.) *in vitro*. Final report of research project, Registration No. 87/1554 in Agricultural Information and Documentation Centre of Iran. Publication of Cotton Research Institute of Iran (CRII), Gorgan, Iran. 73 p.
6. Ghasemi Bezdi, K. 2011. Study of effective factors on ovule culture *in vitro* and regeneration possibility of haploid plantlets in cotton (*Gossypium* sp.). Final

report of research project, Registration No. 400024 in Agricultural Information and Documentation Centre of Iran. Publication of Cotton Research Institute of Iran (CRII), Gorgan, Iran. 56 p.

7.Ghasemi Bezdi, K., and Ahmadi, A. 2010. Cell and Tissue Biotechnology (in Micropropagation and Plant Breeding). Makhtoomgholi Faraghi Pub. Gorgan, Iran. 254 p.

8.Ghasemi Bezdi, K., and Ahmadi, A. 2012. An Introduction to Cellular and Molecular Genetics, Second Edition. Nowroozi Pub. Gorgan, Iran. 426 p.

9.Ghasemi Bezdi, K., Karlov, G.I., and Ahmadikhah, A. 2007. Effects of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis. Afr. J. Biotechnol. 6(7): 861-867.

10.Ghoreishi, B. 2008. *Lilium longiflorum* micropropagation through tissue culture. M.Sc. Thesis. Islamic Azad University of Karaj.

11.Gupta, S.K., Srivastava, A.K., Singh, P.K., and Tuli, R. 2004. *In vitro* proliferation of shoots and regeneration of cotton. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 51: 149-152.

12.Jin, S., Zhang, X., Nie, Y., Guo, X., Liang, S., and Zhu, H. 2006. Identification of a novel elite genotype for *in vitro* culture and genetic transformation of cotton. Biologia Plantarum. 50(4): 519-524.

13.Mashayekhi, M., Shakib, A.M., Ahmad-Raji, M., and Ghasemi Bezdi, K. 2008. Gene transformation potential of commercial canola (*Brassica napus* L.) cultivars using cotyledon and hypocotyl explants. Afr. J. Biotechnol. 7(24): 4459-4463.

14.Mishra, R., Wang, H.Y., Yadav, N., and Wilkins, T.A. 2003. Development of highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* L.) - A step towards genotype-independent regeneration. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 73: 21-35.

15.Motallebi Azar, A.R., Khosroshahli, M., Valizadeh, M., Masiha, C., and Moeini, A. 2006. Effect of genotype, and cold and heat pre-treatments effects on the callus formation and regeneration in tomato anther culture. Iranian J. Agri. Sci. 37 (5): 899-909. (In Persian)

16.Naserian, B., Majd, F., Vedadi, S., Rahmani, E., and Mosavi Shalmani, A. 2005. Study of genotype, cold pre-treatment, low-dosage Gamma irradiation and 2,4-D concentration effects on wheat anther culture response. Iranian J. Agri. Sci. 7 (1): 86-96.

17.Oroojloo, M., Enayati, M., Habibzadeh, S., Emamifar, M., and Javidfar, F. 2011. Effect of Temperature on Microspore Embryogenesis and Regeneration of Doubled Haploid Plants in Three Canola (Brassica napus L.) Hybrids. Seed and Plant Breed. J. 27-1(2): 167-182.

18.Ouma, J.P., Young, M.M., and Reichert, N.A. 2004. Optimization of *in vitro* regeneration of multiple shoots from hypocotyl sections of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Afr. J. Biotechnol. 3 (3): 169-173.

19. Rao, A.Q., Syed Sarfraz, H., Shahzad, S., Abbas Bokhari, Y., Allah Rakha, A.R., Shahid, A., Saleem, Z., Tayyab, H., and Riazuddin, S. 2006. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* Spp.). J. Zhejiang Univ. Sci. B. 7(4): 291–298.
20. Singh, A.K., and Chand, S. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explant of a timber-yielding leguminoub tree, Dalbergia sissoo Roxb. Plant Phisiol. 160 (4): 415-421.
21. Syed Sarfraz, H., Husnain, T., and Riazuddin, S. 2005. Recurrent Somatic Embryogenesis and Twin Embryo Production in Cotton. Pakistan J. Biol. Sci. 8 (1): 141-145. (In Persian)
22. Triplett, B.A. 2000. Cotton ovule culture: a tool for basic biology, biotechnology and cotton improvement. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 36: 93–101.
23. Vahdati, K., Bahrami Sermandi, H., and Kalantari, S. 2010. Factors affecting germination of somatic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.) and their conversion to plantlets. J. Crop Improvement. 12 (2): 73-82. (In Persian)

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
*J. of Plant Production, Vol. 20 (1), 2013*
*http://jopp.gau.ac.ir*

# The effect of cold pre-treatment and hormonal agents on ovule callus formation in some cotton (*Gossypium* sp.) cultivars *in vitro*

***K. Ghasemi Bazdi[1] and V. Khandan[2]**
[1]Assistant Prof., Cotton Research Institute of Iran (CRII), Gorgan, Iran,
[2]M.Sc. Graduated, Science and Technology Azad University, Tehran, Iran

**Abstract**

The use of ovules to produce the haploid plants is one of the fundamental fields of tissue culture. Considering that the optimized tissue culture conditions varies depending on plant species, genotype within species, nutrient medium components and different environmental factors, in present study, the effects of 1, 3 and 10 days cold pre-treatments in 4ºC and different hormonal combinations of MS medium was studied on callus-formation of ovule explant in 4 cotton cultivars. Based on the results, ovules with cold induction for 10 days had the highest (83.7%) callus-formation. However, less than 3 days cold pre-treatment with 28% showed significant decreasing effect on callus-formation. Explants of different cultivars had a different callus-formation rate, as Sahel cultivar produced significantly higher callus percentage than Hashemabad native cultivar. In the other hand, low concentrations of auxin (0.1 mg/l 2,4-D) had positive role in callus-formation of ovule, but by increasing BAP concentration above 3 mg/l, an inhibitory effect was observed. Therefore, different cold pre-treatment times, cultivar type, and hormonal types and concentrations affected on callus-production in ovule culture of cotton cultivars, and low concentrations of 2,4-D with increasing cold pre-treatment duration had positive roles in callus-formation. In addition to callus percentage, various treatments also affected on color and size of calli, so the ovules of Sahel that had been under cold induction for 10 days, produced medium to large and bright green calli, and increasing of cold pre-treatment time until the tenth day, and also low levels of 2,4-D (0.1 mg/l) in medium increased the calli size in cotton ovule culture.

***Keywords*:** Explant; Doubled haploid; Hemizygus; Genotype.

* Corresponding Author, Email: kghasemibezdi@yahoo.com