دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی میزان کالوس‌زایی و تحمل ریزنمونه‌های مختلف ارقام پنبه (*Gossypium* sp.) به تنش شوری در شرایط درون شیشه‌ای

ک. قاسمی بزدی[۱] و ب. آیدین[۲]

۱- استادیار موسسه تحقیقات پنبه کشور، نویسنده مسئول: (kamalghasemi@gmail.com)
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه اردبیل

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۲۴

Archive of SID

چکیده

دستیابی به روش‌های کم هزینه و کوتاه مدت جهت دسترسی به لاین‌های متحمل به تنش‌های غیرزنده در برنامه‌های به‌نژادی گیاهی از کاربردهای مهم کشت بافت می‌باشد. در این تحقیق، ابتدا میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های جنین نارس، محور زیر لپه و ریشه ارقام پنبه ساحل، سپید، نامبر ۲۰۰، باربادنس و خرداد روی محیط کشت MS حاوی ترکیبات مختلف هورمون‌های 2, 4-D و BAP مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج تجزیه واریانس، میزان کالوس‌زایی تحت تأثیر رقم، نوع ریزنمونه، ترکیب هورمونی محیط کشت و اثر متقابل ریزنمونه× محیط کشت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. براساس مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار، بیشترین میزان کالوس‌زایی مربوط به ریزنمونه جنین نارس و رقم نامبر ۲۰۰ بود که روی محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D مشاهده گردید، درحالی که ریزنمونه ریشه رقم سپید کمترین میزان کالوس‌زایی را نشان داد. با انتقال کالوس‌های تولید شده به محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف کلرید سدیم و بررسی میزان رشد نسبی کالوس‌ها مشخص گردید که تحمل ریزنمونه‌ها به کلرید سدیم تحت تأثیر رقم، نوع ریزنمونه، غلظت کلرید سدیم و تمام اثرات متقابل آنها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد. بیشترین میزان رشد نسبی کالوس‌ها روی محیط کشت‌های شوری، مربوط به ریزنمونه جنین نارس و ارقام خرداد و سپید به ترتیب با ۷۷/۳ و ۷۶/۲ درصد بود، درحالی که ریزنمونه ریشه رقم نامبر ۲۰۰ با ۱۷/۹ درصد کمترین میزان تحمل را به کلرید سدیم نشان داد. رشد نسبی کالوس‌ها در تمام ریزنمونه‌ها و ارقام، با افزایش غلظت شوری در محیط کشت کاهش پیدا کرد به‌طوری که تیمار شاهد (بدون کلرید سدیم) با ۵۱/۶ درصد بالاترین میزان رشد نسبی و محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم، پایین‌ترین سرعت رشد نسبی کالوس را با ۲۰/۶ درصد به خود اختصاص دادند. با انتقال ریزنمونه‌های متحمل انتخاب شده به محیط کشت‌های با غلظت‌های بالاتر ۳/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم مشخص گردید که هیچ یک از کالوس‌ها و ریزنمونه‌ها قادر به زنده‌مانی و رشد روی این محیط کشت‌ها نبودند.

واژه‌های کلیدی: تنش، ریزنمونه، پنبه، کالوس، کلرید سدیم

www.SID.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر تکنیک‌های کشت بافت به ابزاری قوی برای تکثیر بسیاری از گونه‌های گیاهی تبدیل شده است. یکی از زمینه‌های اساسی کشت بافت، استفاده از سلول‌ها و بافت‌های مجزا در سلکسیون گیاهانی است که از طریق آنها بتوان گیاهان سریع‌الرشد متحمل به عوامل نامساعد محیطی مختلف از قبیل خشکی، شوری، درجه حرارت‌های پایین و بالا، عوامل بیماری‌زای گیاهی، فلزات سنگین و غیره را به‌دست آورد (۵).

با وجود موفقیت‌های تجاری در پنبه‌های تراریخته، انتقال ژن و باززایی در پنبه هنوز نسبت به گونه‌های گیاهی دیگر یک مشکل اساسی محسوب می‌شود. کارآیی جنین‌زایی سوماتیکی و تنوع سوماکلونال نیز از مشکلات موجود در باززایی پنبه می‌باشد (۲۷). پنبه به‌عنوان یک گیاه ریکالسیترانت در سیستم‌های باززایی در شرایط درون شیشه‌ای شناخته می‌شود و کشت بافت و باززایی از آن دشوار بوده و درصد موفقیت به‌دست آمده تاکنون در باززایی ارقام تجاری پنبه ایران خیلی بالا نبوده است (۲ و ۴).

از طرفی شوری نیز به‌عنوان یک عامل محدود کننده کشت پنبه محسوب می‌شود. سلول‌های تحت تاثیر تنش شوری با کاهش آب قابل دسترس، سمیت یونی و کاهش قابل دسترس بودن عناصر غذایی ضروری مواجه هستند، پاسخ‌هایی که در سطح گیاه کامل نیز انعکاس خواهند یافت. سلول‌هایی که در معرض نمک زیاد قرار می‌گیرند، مجبورند عناصر مورد نیاز خود را از محیطی مملو از یون‌ها که دارای پتانسیل سمیت بوده و برای رشد گیاه غیرضروری هستند، جذب نمایند. برای رشد در چنین محیطی، یک سلول گیاهی بایستی توان تحمل شرایط را داشته باشد و یا اینکه قادر به جذب عناصر غذایی ضروری باشد (۲۰).

طی سال‌های اخیر تحقیقات متعددی در رابطه با کالوس‌زایی و باززایی پنبه در شرایط کشت بافت انجام شده است که به تعدادی از آنها اشاره می‌شود. براساس نتایج گروسی و همکاران (۱) شروع کالوس‌دهی در پنبه صفتی است که تا حدودی وابسته به ژنوتیپ می‌باشد. قاسمی بزدی (۴) طی تحقیقات خود اثر ژنوتیپ را معنی‌دار مشاهده نمود. براساس نظر اوما و همکاران (۱۹)، پنبه گیاهی است که قابلیت باززایی بیشتر ژنوتیپ‌های تجاری آن از طریق جنین‌زایی سوماتیکی یا سوسپانسیون سلولی به مقدار زیادی وابسته به ژنوتیپ بوده و نسبت به سایر گیاهان مشکل‌تر می‌باشد.

ماندشوار (۱۳) در بررسی قابلیت باززایی ژنوتیپ‌های مختلف کوکر به این نتیجه رسید که قابلیت باززایی، بین ریزنمونه‌های مختلف و همچنین در ارقام مختلف متفاوت است، به علاوه زمان انتخاب ریزنمونه از گیاهچه‌های مختلف، در باززایی گیاهچه موثر می‌باشد. اغلب مطالعات مربوط به باززایی‌های موفق بر روی واریته کوکر-۳۱۲ و لاین‌های وابسته به آن انجام شده است (۲۵).

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی نقش مهمی در القای کالوس دارند. برخی از قطعات

Archive of SID

www.SID.ir

گیاهی کشت شده برای تولید کالوس فقط به اکسین و برخی فقط به سیتوکینین و اکثر کشت‌ها به هر دو نیاز دارند (۵). ژانگ (۲۹) وقتی از ۰/۰۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین و ریزنمونه‌های برگ‌های لپه‌ای، محور زیر لپه و ریشه استفاده کرد، میزان تولید کالوس در همه ریزنمونه‌ها ۱۰۰ درصد نبود ولی وقتی از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D همراه با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر زآتین استفاده کرد، میزان تولید کالوس در همه ریزنمونه‌ها ۱۰۰ درصد شد که نشان دهنده تاثیر مطلوب 2, 4-D در تولید کالوس می‌باشد. همچنین وی وقتی از 2, 4-D برای تحریک و تکثیر کالوس پنبه رقم Simiun-3 استفاده کرد کالوس‌های یکسانی گرفت که سبز رنگ و متراکم بودند. براساس تحقیقات ژانگ (۲۹) با وجود اینکه 2, 4-D به‌طور گسترده‌ای در کشت بافت پنبه استفاده می‌شود ولی باید از محیط کشت باززایی و جنین‌زایی حذف شود. به‌نظر می‌رسد انتقال کالوس‌ها از محیط کشت دارای 2, 4-D به محیط کشت فاقد آن باعث تحریک جنین‌زایی شود و استفاده از نیترات پتاسیم درصد جنین‌زایی را افزایش می‌دهد.

عقیده بر این است که فاکتورهای مختلفی شامل منبع ریزنمونه، انواع محیط کشت، مقادیر، انواع و ترکیبات مختلف هورمون‌ها یا تنظیم کننده‌های رشد، درجه حرارت، شدت نور و شرایط تاریکی روی کالوس‌زایی و باززایی پنبه تأثیرگذار هستند (۲، ۶، ۸، ۱۵ و ۲۳).

در مطالعات 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 (۲، ۳، ۶، ۱۰، ۱۴، ۱۵، ۲۲، ۲۴ و ۲۵) و پژوهشگران مختلف براساس هدف تحقیق، ریزنمونه مورد نظر را انتخاب نموده‌اند.

با وجود مشکلاتی که در مورد کشت درون شیشه‌ای پنبه وجود دارد، تنش شوری نیز از میزان کالوس‌زایی و باززایی ریزنمونه‌های پنبه می‌کاهد. با بهینه‌سازی شرایط کشت بافت، می‌توان گزینش ژنوتیپ‌های مختلف را براساس تحمل به شوری و یا میزان رشد نسبی کالوس در ژنوتیپ‌ها و ریزنمونه‌های مختلف در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار داد. این روش در گیاهان مختلفی از قبیل گل کتانی و میخک (۹)، پنبه (۱۲ و ۳۰)، چغندر قند (۱۸)، رازیانه (۱۱)، برنج (۱۶)، نیشکر (۱۷)، گندم (۷) و غیره صورت گرفته است.

هدف از تحقیق حاضر، بررسی شرایط کالوس‌زایی ریزنمونه‌های مختلف پنبه و میزان تحمل ارقام و ریزنمونه‌ها به غلظت‌های مختلف کلرید سدیم و همچنین به‌دست آوردن متحمل‌ترین ریزنمونه ارقام مختلف پنبه نسبت به شوری در شرایط کشت درون شیشه‌ای بود.

مواد و روشها

در تحقیق حاضر که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت موسسه تحقیقات پنبه کشور در شهرستان گرگان، طی سال‌های

Archive of SID

www.SID.ir

۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ انجام شد، از ۴ رقم پنبه آپلند (*Gossypium hirsutum* L.) به نام‌های ساحل، سپید، خرداد و نامبر ۲۰۰ و یک رقم پنبه مصری (*G. barbadense*) به نام باربادنس ۵۵۹۵ استفاده شد. با توجه به عکس‌العمل متفاوت ارقام و ریزنمونه‌های پنبه به ترکیبات محیط کشت، از محیط کشت MS به همراه ترکیبات مختلفی از هورمون‌های بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2, 4-D) جهت کالوس‌زایی و القای بیشتر تنوع سوماکلونی و تیمارهای مختلفی از کلرید سدیم (Na Cl) به‌عنوان عامل تنش شوری در محیط کشت‌های کالوس‌زایی جهت ریزنمونه‌های جنین نارس، محور زیر لپه و ریشه ارقام مختلف پنبه به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تیمار استفاده شد.

جهت تهیه ریزنمونه‌های محور زیر لپه و ریشه، بذور ارقام مختلف پنبه پس از کرک‌زدایی توسط اسید سولفوریک غلیظ به مدت چند ثانیه، با غوطه‌ور شدن در اتانول ۷۰ درصد و تکان دادن به مدت یک دقیقه استریل سطحی گردیدند. سپس این بذور سه مرتبه با آب مقطر شستشو گردیده و با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم تجاری ۲۵ درصد همراه با تکان دادن استریل گردیده و دوباره سه مرتبه با آب دوبار تقطیر شده شستشو گردیدند. بذور استریل شده در شیشه‌های حاوی محیط کشت جوانه‌زنی MS بدون هورمون قرار گرفته و در اتاقک رشد با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد تحت فتوپریود ۱۸/۶ ساعت تاریکی/ روشنایی قرار گرفتند. هفت روز پس از مرحله جوانه‌زنی، از بافت‌های محور زیر لپه و ریشه گیاهچه‌های پنبه، ریزنمونه تهیه شد و در شرایط استریل روی محیط کشت‌های مورد نظر منتقل گردید.

به‌منظور تهیه جنین‌های نابالغ از ارقام کشت شده در گلخانه استفاده گردید. بذور پنبه کشت شده در گلخانه پس از حدود ۸ هفته به مرحله گلدهی رسیدند. گل‌های هر بوته قبل از باز شدن اتیکت گذاری شده و ۳ تا ۴ روز پس از گرده افشانی، گل‌های مناسب انتخاب گردیده، از پایه مادری قطع شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از حذف گلبرگ‌ها و کاسبرگ‌های گل، قوزه‌های حاوی جنین‌های نابالغ ۳ تا ۴ روزه، ابتدا به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند، سپس با آب مقطر استریل شستشو شده و به مدت 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. سپس به کمک پنس و اسکالپل استریل، پس از شکافتن دیواره تخمدان، جنین‌های نابالغ از داخل تخمدان استخراج شده و در شرایط استریل روی محیط کشت‌های مورد نظر منتقل شدند.

تمام محیط کشت‌ها هر ۲ تا ۳ هفته یک بار 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

Archive of SID

www.SID.ir

ایجاد شده و درصد جوانه‌های تشکیل شده در ارقام مختلف پنبه در سطح محیط کشت‌های متفاوت، مورد بررسی و یادداشت برداری قرار گرفتند. کالوس‌های مناسب حاصله به محیط کشت‌های MS حاوی غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (Na Cl) منتقل گردیدند. در تمام آزمایش‌ها، حداقل سه واکشت تا زمان انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت‌های شوری انجام شد. تیمارهای مورد آزمایش شامل ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم به همراه شاهد (فاقد Na Cl) بودند. کالوس‌های حاصله به مدت یک تا دو ماه نگهداری شدند و مدت زمانی که کالوس‌ها در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف کلرید سدیم توانستند زنده بمانند، اندازه‌گیری شده و ارزیابی رشد نسبی بافت کالوس در محیط کشت حاوی نمک، برای هر ژنوتیپ از رابطه (۱) به دست آمد:

$$G = (W - J) / J \times 100 \qquad (۱)$$

که در آن:

G = میزان رشد نسبی کالوس

W = وزن تر نهایی کالوس

J = وزن تر اولیه کالوس

نتایج حاصل از تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد. کالوس‌ها و ریزنمونه‌های متحمل به غلظت‌های کلرید سدیم تیمار شده، به سطوح شوری بالاتر ۳/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم منتقل گردیدند. در نهایت براساس نتایج تجزیه آماری، مناسب‌ترین محیط کشت جهت کالوس‌زایی ریزنمونه‌های ارقام مورد بررسی و متحمل‌ترین کالوس‌ها و ارقام نسبت به شوری تعیین گردیدند.

نتایج و بحث

در این تحقیق، ابتدا اثر ترکیبات و غلظت‌های مختلف هورمون‌های 2, 4-D و BAP در محیط کشت MS روی ریزنمونه‌های جنین نارس، محور زیر لپه و ریشه تعدادی از ارقام پنبه، به‌منظور تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون‌ها روی میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، میزان کالوس‌زایی تحت تأثیر رقم، نوع ریزنمونه، ترکیب هورمونی محیط کشت و اثر متقابل ریزنمونه × ترکیبات هورمونی محیط کشت‌های مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

براساس مقایسه میانگین داده‌های مربوط به ارقام مورد بررسی به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (جدول ۲)، ارقام مورد بررسی در گروه‌های مختلفی قرار گرفتند. رقم نامبر ۲۰۰ با ۵۳/۸ درصد کالوس‌زایی در گروه اول، ارقام باربادنس و ساحل به ترتیب با ۴۹/۵ و ۴۸/۹ درصد در گروه دوم و رقم خرداد با ۴۶/۲ درصد در گروه سوم و در نهایت رقم سپید با ۴۱/۳ درصد در پایین‌ترین رده کالوس‌زایی قرار گرفتند. بنابراین پتانسیل کالوس‌زایی در بین ارقام مختلف متفاوت بود و این با نتایج قاسمی بزدی (۴) مطابقت دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس میزان کالوس‌زایی ریزنمونه‌های پنبه

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم (C)	۴	۷۵۸/ ۳**
ریزنمونه (E)	۲	۳۰۳۳۶/۸**
C × E	۸	۱۱۲/۴ns
ترکیبات هورمونی محیط کشت (M)	۳	۲۵۲/۸**
C × M	۱۲	۱۲۹/۶ns
E × M	۶	۱۲۴۹/۵**
C × E × M	۲۴	۱۱۶/۸ns
اشتباه	۱۲۰	۱۱۳/۵
کل تغییرات	۱۷۹	
ضریب تغییرات (درصد)	۲۲/۲	

ns و **: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

براساس داده‌های حاصل از مقایسه میانگین اثر ریزنمونه‌های مورد بررسی بر میزان تولید کالوس (جدول ۲)، سه نوع ریزنمونه در سه کلاس متفاوت قرار گرفتند. جنین نارس با ۷۳/۱ درصد در اولین رده جدول قرار گرفت و بیشترین درصد کالوس‌زایی را نشان داد. محور زیرلپه با ۴۱ و ریشه‌ها با ۲۹/۸ درصد رده‌های بعدی جدول را به خود اختصاص دادند. این مشاهدات با نتایج تحقیق سیدسرفراز و همکاران (۲۵) منطبق می‌باشد، مبنی بر آن که میزان تولید کالوس در محور زیر لپه ارقام پنبه بیشتر از ریزنمونه‌های ریشه بود.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم × ریزنمونه (جدول ۲) نشان داد که جنین نارس رقم نامبر ۲۰۰ با ۸۱ درصد بالاترین میزان کالوس‌زایی را داشت و جنین نارس ارقام باربادنس، ساحل، خرداد و سپید به ترتیب با ۷۶/۸، ۷۳/۷، ۷۲/۷ و ۶۱/۲ درصد در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند، ولی در هر صورت، ریزنمونه‌های جنین نارس در تمام ارقام بالاترین درصد کالوس‌زایی را داشتند. همچنین ریزنمونه ریشه رقم سپید با ۲۵/۸ درصد و ریشه رقم خرداد با ۲۷/۸ درصد در پایین‌ترین جایگاه‌های این جدول قرار گرفتند. در این مورد هم ریزنمونه‌های ریشه در تمام ارقام کم‌ترین درصد کالوس‌زایی را نشان دادند. از مجموع این نتایج چنین برمی‌آید که رقم نامبر ۲۰۰ در این مورد نیز از پتانسیل کالوس‌زایی بالاتری برخوردار است و رقم سپید قدرت کالوس‌زایی کمتری دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین حاصل از بررسی تاثیر ارقام، ریزنمونه‌های مختلف و اثرات متقابل آنها بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های پنبه به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

رقم	درصد کالوس‌زایی ریزنمونه			میانگین کالوس‌زایی رقم
	جنین نارس	محور زیر لپه	ریشه	
ساحل	۷۳/۷^{a}	۴۲/۹^{cd}	۳۰/۱^{efg}	۴۸/۹^{ab}
سپید	۶۱/۲^{b}	۳۷/۰^{def}	۲۵/۸^{g}	۴۱/۳^{c}
نامبر ۲۰۰	۸۱/۰^{a}	۴۷/۶^{c}	۳۲/۸^{efg}	۵۳/۸^{a}
باربادنس	۷۶/۸^{a}	۳۹/۴^{cde}	۳۲/۲^{efg}	۴۹/۵^{ab}
خرداد	۷۲/۷^{a}	۳۸/۱^{de}	۲۷/۸^{fg}	۴۶/۲^{bc}
میانگین کالوس‌زایی ریزنمونه	۷۳/۱^{a}	۴۱/۰^{b}	۲۹/۸^{c}	-

- میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، فاقد تفاوت آماری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

همچنین براساس مشاهدات و یادداشت-برداری‌های مورفولوژیکی از کالوس‌های به‌وجود آمده از کشت‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف مشاهده شد که کالوس‌های حاصل از جنین‌های نارس نسبت به سایر ریزنمونه‌ها درشت‌تر و دارای حجم بیشتری بودند. رنگ کالوس‌های تولید شده از هر سه نوع ریزنمونه متناسب با رقم، نوع و غلظت هورمون‌های به‌کار رفته در محیط کشت متفاوت بود که به رنگ‌های سبز روشن، سبز متمایل به صورتی، کرم، کرم متمایل به قهوه‌ای و یا کرم متمایل به صورتی مشاهده گردید. به عنوان مثال، کالوس‌های تولید شده از جنین‌های نارس رقم باربادنس در تیمار هورمونی شماره ۴ (جدول ۳) به رنگ سبز روشن و دارای بیشترین حجم کالوس نسبت به ارقام دیگر بودند، که نشان‌دهنده تاثیر نوع گونه در رنگ و اندازه کالوس تشکیل شده است، به‌دلیل اینکه رقم باربادنس از گونه باربادنس و بقیه ارقام از گونه هیرسوتوم می‌باشند.

در مورد نتایج مقایسه میانگین نوع و غلظت ترکیبات هورمونی به‌کار رفته در محیط کشت بر کالوس‌زایی گیاه پنبه (جدول ۳)، تیمارها در دو گروه مختلف قرار گرفتند. بیشترین درصد تولید کالوس با ۵۱/۴ درصد در محیط کشت شماره ۲ با ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و فاقد سیتوکینین بود. همچنین محیط کشت‌های شماره ۱ و ۳ که به ترتیب دارای صفر و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D بودند، کمترین میزان کالوس‌زایی را داشتند. این نتایج با تحقیقات انجام شده توسط قاسمی بزدی (۴) و رائو و همکاران (۲۲) که اثر ترکیبات و غلظت‌های مختلف تعدادی از هورمون‌ها را در محیط کشت MS بر کالوس‌زایی و باززایی تعدادی از ارقام پنبه مورد بررسی قرار داده بودند، مطابقت دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین حاصل از بررسی تاثیر ریزنمونه، نوع و غلظت ترکیبات هورمونی محیط کشت و اثـرات متقابل آنها بر درصد کالوس‌زایی ریزنمونه‌های پنبه به‌روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمـال پنج درصد

کد محیط کشت	تیمار هورمونی محیط کشت	درصد کالوس‌زایی براساس نوع ریزنمونه			میانگین کالوس‌زایی براساس محیط کشت
		جنین نارس	محور زیر لپه	ریشه	
۱	MS+2, 4-D (0.2)+BAP (0)	۶۹/۴^{bc}	۴۰/۸^{e}	۳۰/۳^{fgh}	۴۶/۸^{b}
۲	MS+2, 4-D (0.5)+BAP (0)	۶۴/۳^{c}	۵۱/۶^{d}	۳۸/۳^{ef}	۵۱/۴^{a}
۳	MS+2, 4-D (0.5)+BAP (1)	۷۳/۰^{b}	۳۷/۶^{ef}	۲۸/۱^{gh}	۴۶/۲^{b}
۴	MS+2, 4-D (0.5)+BAP (2)	۸۵/۶^{a}	۳۴/۰^{efg}	۲۲/۵^{h}	۴۷/۴^{ab}
	میانگین کالوس‌زایی ریزنمونه	۷۳/۱^{a}	۴۱/۰^{b}	۲۹/۸^{c}	-

- میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، فاقد تفاوت آماری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

در نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که وجود غلظت‌های بالاتر اکسین عامل محرکی در کالوس‌زایی پنبه محسوب می‌شود. از طرف دیگر، سیتوکینین به‌همراه اکسین در کالوس‌زایی پنبه نقش دارد، ولی استفاده از مقادیر بالاتر BAP به عنوان منبع سیتوکینین در این آزمایش باعث کاهش کالوس‌زایی گردیده است. بنابراین می‌توان گفت که اکسین‌ها نقش مثبتی در کالوس‌زایی ریزنمونه‌ها داشته و متعاقب آن غلظت بالای سیتوکینین‌ها در تولید کالوس از ریزنمونه‌ها ممکن است نقش بازدارنده داشته باشد و جهت کالوس‌زایی ریزنمونه‌های پنبه بهتر است از محیط کشت‌های با غلظت‌های بالاتر اکسین و نسبت‌های پایین‌تر سیتوکینین استفاده شود. براساس نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل ریزنمونه × نوع و غلظت ترکیبات هورمونی محیط کشت (جدول ۳)، بالاترین درصد کالوس‌زایی در مورد ریزنمونه‌های جنین نارس در محیط کشت شماره ۴ که حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D بود، مشاهده شد. همچنین در مدت کمتر از ۷ تا ۸ روز، کالوس‌ها در سطح برش یافته این ریزنمونه قابل مشاهده بودند. نتایج نشان دادند که با افزایش غلظت سیتوکینین و کاهش غلظت اکسین، درصد کالوس‌زایی در جنین‌های نارس افزایش یافت. پایین‌ترین درصد کالوس‌زایی در جنین‌های نارس نیز مربوط به محیط کشت شماره ۲ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D بدون سیتوکینین بود. بنابراین غلظت نسبتاً پایین اکسین همراه با افزایش سیتوکینین تاثیرات مثبتی در بالاتر رفتن میزان کالوس‌زایی در جنین‌های نارس نشان داد که این نتایج با نظریه رائو و همکاران (۲۲) مبنی بر تاثیر هورمون‌ها به‌خصوص ستوکینین‌ها روی کالوس‌زایی مطابقت دارد.

همچنین در رابطه با ریزنمونه‌های محور زیر لپه و ریشه، بالاترین درصد کالوس‌زایی مربوط به محور زیر لپه در محیط کشت شماره ۲ حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D بدون سیتوکینین (BAP) با ۵۱/۶ درصد و پایین‌ترین میزان در این ریزنمونه، در محیط

Archive of SID

www.SID.ir

کشت‌های شماره ۴ و ۳ با ۳۴ و ۳۷/۶ درصد بود که به ترتیب حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و دو و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP بودند. در مورد ریزنمونه ریشه نیز دقیقاً چنین روندی مشاهده شد (جدول ۳). نتایج حاصل شده نشان داد که در مورد کالوس‌زایی این ریزنمونه‌ها با افزایش سیتوکینین و کاهش اکسین درصد کالوس‌زایی دچار کاهش چشم‌گیری گردیده و با افزایش اکسین بدون سیتوکینین، کالوس‌زایی افزایش می‌یافت. این نتایج دقیقاً عکس نتایجی بود که در مورد ریزنمونه جنین نارس مشاهده گردید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که قابلیت باززایی بین ریزنمونه‌های مختلف و همچنین در ارقام مختلف متفاوت است و ریزنمونه‌های مختلف می‌توانند پاسخ‌های متفاوتی به نسبت‌های اکسین به سیتوکینین در محیط کشت داشته باشند و ترکیب تیمارهای هورمونی مختلف و همچنین نوع ریزنمونه‌های کشت شده نقش مهمی در میزان کالوس‌زایی در پنبه دارد.

نتایج به‌دست آمده از درصد کالوس‌زایی در ریزنمونه‌های محور زیر لپه و ریشه نشان داد که ریزنمونه‌های محور زیر لپه نسبت به ریشه درصد کالوس‌زایی بالاتری داشتند. این نتایج با نظر رائو و همکاران (۲۲) مبنی بر درصد بالاتر کالوس‌های به‌وجود آمده از محور زیر لپه نسبت به سایر ریزنمونه‌های مورد بررسی مطابقت دارد.

به منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم بر میزان رشد نسبی کالوس‌ها در شرایط درون شیشه‌ای، کالوس‌های به‌وجود آمده از ریزنمونه‌های ارقام مختلف پنبه، وزن گردیدند و روی محیط کشت‌های حاوی چهار غلظت مختلف کلرید سدیم (NaCl) و یک تیمار شاهد بدون کلرید سدیم منتقل شدند. براساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴)، تحمل ریزنمونه‌ها به کلرید سدیم تحت تاثیر رقم، نوع ریزنمونه، غلظت کلرید سدیم و تمامی اثرات متقابل این فاکتورها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس میزان تحمل کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های ارقام پنبه به کلرید سدیم

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم (C)	۴	۲۷۰۱/۱**
ریزنمونه (E)	۲	۲۹۲۶۸/۶**
C × E	۸	۷۶۹/۹**
غلظت کلرید سدیم (Na Cl)	۴	۷۲۲۸/۱**
C × Na Cl	۱۶	۱۷۲/۹**
E × Na Cl	۸	۱۱۱/۲**
C × E × Na Cl	۳۲	۵۱/۱**
اشتباه	۱۵۰	۱۶/۶
کل تغییرات	۲۲۴	
ضریب تغییرات (درصد)	۱۰/۱۵	

**: معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

Archive of SID

www.SID.ir

براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۵)، ارقام در ۵ کلاس مختلف جای گرفتند. رقم خرداد با ۴۸/۳ درصد در جایگاه اول و ارقام ساحل و نامبر ۲۰۰ به ترتیب با ۳۹/۲ و ۲۷/۷ درصد در پایین‌ترین رده‌ها نسبت به ارقام دیگر قرار گرفتند. در تحقیقی که رمضانی‌مقدم و زنگی (۲۱) در مورد ارزیابی مزرعه‌ای تحمل به شوری در ۴۰ ژنوتیپ تتراپلوئید پنبه انجام دادند، ۵ رقم مورد بررسی در تحقیق حاضر نیز به‌همین صورت در کلاس‌های متحمل، نیمه‌متحمل و حساس به شوری طبقه‌بندی شدند. همچنین نتایج تاییدی بر پژوهش انجام شده توسط زنگی (۲۸) در بررسی ۵ رقم متحمل به شوری در مقایسه با رقم ساحل در یک منطقه شور در استان گلستان بود که رقم خرداد به‌عنوان متحمل‌ترین رقم نسبت به شوری معرفی گردید.

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین حاصل از بررسی تاثیر ارقام پنبه، ریزنمونه‌های مختلف و اثرات متقابل آنها بر میزان رشد نسبی کالوس‌های ریزنمونه‌های آنها در غلظت‌های مختلف کلرید سدیم به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

رقم	درصد رشد نسبی کالوس در ریزنمونه			میانگین درصد رشد نسبی کالوس براساس رقم
	جنین نارس	محور زیر لپه	ریشه	
ساحل	۵۷/۰^{c}	۳۷/۱^{e}	۲۳/۵^{h}	۳۹/۲^{d}
سپید	۷۶/۲^{a}	۳۰/۰^{f}	۲۶/۱^{gh}	۴۴/۱^{b}
نامبر ۲۰۰	۴۰/۴^{d}	۲۴/۸^{h}	۱۷/۹^{i}	۲۷/۷^{e}
باربادنس	۶۱/۹^{b}	۳۴/۲^{e}	۲۸/۲^{fg}	۴۱/۴^{c}
خرداد	۷۷/۳^{a}	۳۷/۲^{e}	۳۰/۵^{f}	۴۸/۳^{a}
میانگین درصد رشد نسبی کالوس براساس ریزنمونه	۶۲/۵^{a}	۳۲/۶^{b}	۲۵/۲^{c}	-

- میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، فاقد تفاوت آماری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

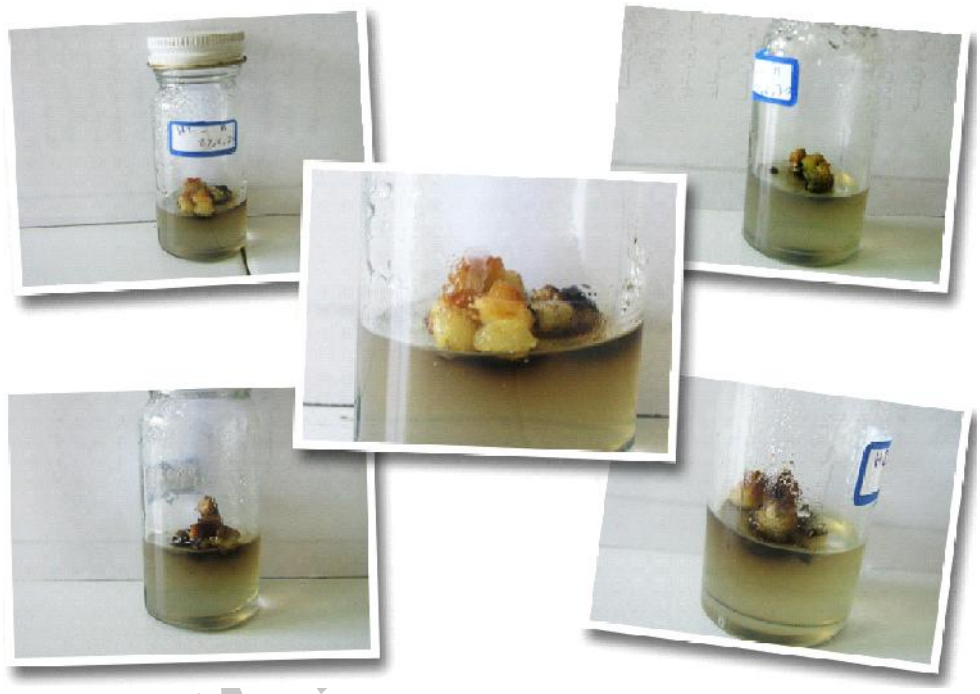
نتایج جدول ۵، ریزنمونه‌ها را در سه کلاس مختلف جای داد، به‌طوری که جنین‌های نارس با ۶۲/۵ درصد در جایگاه بالاتری نسبت به ریزنمونه‌های محور زیر لپه و ریشه قرار گرفتند. براساس نتایج اثر متقابل رقم × ریزنمونه نیز بیشترین میزان رشد نسبی کالوس‌ها روی محیط کشت‌های شوری مربوط به ریزنمونه جنین نارس در ارقام خرداد و سپید به ترتیب با ۷۷/۳ و ۷۶/۲ درصد بود، در حالی که ریزنمونه ریشه رقم نامبر ۲۰۰ با ۱۷/۹ درصد، کمترین میزان تحمل را به غلظت‌های مختلف کلرید سدیم نشان داد.

همچنین مشاهدات و یادداشت برداری‌های مورفولوژیکی از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های گوناگون ارقام مختلف در غلظت‌های مختلف شوری نشان داد که جنین‌های نارس شکننده‌تر و دارای حجم بزرگ‌تری نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها بودند

Archive of SID

www.SID.ir

(شکل ۱). ریزنمونه‌های ریشه بسیار زودتر از ریزنمونه‌های دیگر به سطوح مختلف شوری حتی در غلظت‌های پایین کلرید سدیم واکنش منفی نشان دادند، به‌گونه‌ای که کالوس‌های ریشه بسیار سریع به صورت خشبی و سفت درآمده و راه نفوذ مواد غذایی به سلول‌ها گرفته شد. رنگ کالوس‌های ریزنمونه‌های ریشه کم‌کم به صورت قهوه‌ای تیره درآمد، اما کالوس‌های ریزنمونه جنین نارس به رنگ‌های سبز تیره تا سبز روشن و در برخی از آن‌ها به رنگ کرم مشاهده شدند.



شکل ۱- تفاوت در رنگ و اندازه کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های جنین نارس رقم خرداد در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلف کلرید سدیم.

نتایج نشان‌دهنده این مطلب بود که ریزنمونه‌های ارقام گوناگون در مراحل مختلف رشد درون شیشه‌ای عملکرد معنی‌داری را از خود به نمایش گذاشتند، به طوری‌که ریزنمونه جنین نارس، رشد نسبی کالوس بالاتری نسبت به دیگر ریزنمونه‌ها در همه ارقام مورد آزمایش از خود نشان داد و ریزنمونه ریشه در تمام ارقام مورد آزمایش، رشد نسبی کالوس پایین‌تری را در برابر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم داشت. علت این امر شاید به دلیل کامل‌تر بودن مرحله رشدی در ریزنمونه جنین نارس و حساس بودن ریزنمونه ریشه به کلرید سدیم به دلیل حساسیت بالای آن در مراحل اولیه رشد باشد که این نتایج با مطالعات تورت (۲۶) روی پنبه رقم نازیلی مبنی بر کاهش رشد ریشه در غلظت‌های گوناگون کلرید

www.SID.ir

سدیم در مراحل اولیه رشد گیاهچه مطابقت دارد.

میزان رشد نسبی کالوس‌ها در مورد تمام ریزنمونه‌ها و کلیه ارقام مورد بررسی، با افزایش غلظت شوری در محیط کشت کاهش چشم‌گیری پیدا کرد (جدول ۶)، به‌طوری‌که تیمار شاهد (بدون کلرید سدیم) با ۵۱/۶ درصد، بالاترین نرخ رشد نسبی و محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم، پایین‌ترین درصد رشد نسبی کالوس را با ۲۰/۶ درصد به خود اختصاص دادند. نتایج حاصله با تحقیقات ابراهیمی (۷) در بررسی کالوس‌زایی و باززایی چند رقم گندم ایرانی برای تحمل به خشکی و شوری در شرایط کشت بافت مطابقت دارد.

جدول ۶- نتایج مقایسه میانگین حاصل از بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم در محیط کشت بر میزان رشد نسبی کالوس‌های ریزنمونه‌های پنبه به روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

ردیف	کد محیط کشت	غلظت کلریدسدیم (میلی‌گرم بر لیتر)	درصد رشد نسبی کالوس
۱	۵	MS+Na Cl (0)	۵۱/۶[a]
۲	۶	MS+Na Cl (0.5)	۴۸/۹[b]
۳	۷	MS+Na Cl (1)	۴۴/۹[c]
۴	۸	MS+Na Cl (2)	۳۴/۶[d]
۵	۹	MS+Na Cl (3)	۲۰/۶[e]

در نهایت، ریزنمونه‌های مختلف ارقامی که در آزمایشات قبلی نسبت به تیمارهای کلرید سدیم، تحمل بیشتری از خود نشان داده بودند، به محیط کشت‌های با غلظت بالاتر ۳/۵ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم انتقال یافتند، ولی هیچ یک از ریزنمونه‌های به کار برده شده نتوانستند در محیط کشت‌های جدید حاوی غلظت‌های بالاتر کلرید سدیم میزان تحمل مناسبی داشته باشند. بنابراین، نتیجه‌گیری می‌شود که ریزنمونه‌های ارقام مورد بررسی پنبه گرچه با یکدیگر نیز تفاوت‌های معنی‌داری نشان دادند، ولی در حدنصاب ۳/۵ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم متوقف شدند و غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر کلرید سدیم می‌تواند به‌عنوان غلظت نهایی مورد استفاده جهت گزینش ریزنمونه‌های ارقام پنبه در شرایط درون شیشه‌ای جهت تحمل به شوری مورد استفاده قرار گیرد و یا اینکه براساس تنوع سوماکلونال در سلول‌های موجود در بافت کالوس از غلظت‌های بالاتر نمک جهت گزینش استفاده شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Garousi, Sh., M. Touhidfar, K. Kazemi Tabar, H. Rahimian and G.A. Nematzadeh. 2008. Somatic embryogenesis in three cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. Iranian J. Crop Sci., 9(4): 302-314.
2. Ghaemi, M., A. Majd, F. Fallahian and K. Ghasemi Bezdi. 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.
3. Ghasemi Bezdi, K., G.I. Karlov and A. Ahmadikhah. 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.
4. Ghasemi Bezdi, K. 2008. Study of shoot regeneration potential of cotton cultivars (*Gossypium* spp.) *in vitro*. Cotton Research Institute of Iran (CRII) Pub., 87/1554 Registration No. in Agricultural Scientific Information and Documentation Center (ASIDC). Tehran, Iran. 73 pp.
5. Ghasemi Bezdi, K. and A. Ahmadi. 2010. Cell and Tissue Biotechnology (in Micropropagation and Plant Breeding). Makhtoomgholi Faraghi Pub., Gorgan, Iran. 254 pp.
6. Gupta, S.K., A.K. Srivastava, P.K. Singh and R. Tuli. 2004. *In vitro* proliferation of shoots and regeneration of cotton. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 51: 149-152.
7. Ibrahimi, F. 2007. Study of callus formation and regeneration of some Iranian wheat cultivars for salinity and drought stress by tissue culture. Agri J., 9(1): 39-50.
8. Ikram, U.H. 2005. Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Afr. J. Biotechnol. 4(2): 206-209.
9. Ilva, F. and I. Gederts. 2010. Relative NaCl tolerance of rare and endangered coastal plant species in conditions of tissue culture. Environ. Experiment. Biol., 8: 35-42.
10. Jin, S., X. Zhang, Y. Nie, X. Guo, S. Liang and H. Zhu. 2006. Identification of a novel elite genotype for *in vitro* culture and genetic transformation of cotton. Biologia Plantarum. 50(4): 519-524.
11. Khorami, R. and A. Safarnejad. 2011. *In vitro* selection of *Foeniculum vulgare* for salt tolerance. Not. Sci. Biol., 3(2): 90-97.
12. Lee, C.G., S.J. Basangouda, C.L. Kenneth, A. Paul, J.P. Brian and R.D. Michael. 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. Free Radical Biol. and Medic., 33(4): 502-511.
13. Mandeshwar, S.B. 1995. Regeneration of cotton *G. hirsutum* from shoot tip culture. Adv. in Plant Sci., 8(1): 84-94.
14. Mashayekhi, M., A.M. Shakib, M. Ahmad-Raji and K. Ghasemi Bezdi. 2008. Gene transformation potential of commercial canola (*Brassica napus* L.) cultivars using cotyledon and hypocotyl explants. Afr. J. Biotechnol. 7(24): 4459-4463.
15. Mishra, R., H.Y. Wang, N. Yadav and T.A. Wilkins. 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.
16. Mohana, P.A., P.S. Karutha and M. Ramesh. 2011. Effect of NaCl on *in vitro* plant regeneration from embryogenic callus cultures of 'cv IR 64' indica rice (*Oryza sativa* L.). Afr. J. Biotechnol. 10(36): 6947-6953.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Neelma, M. 2009. Biochemical characterization of *in vitro* salt tolerant cell lines and regenerated plants of sugarcane (*Saccharum* Spp. Hybrid). PhD Thesis. Department of Botany, University of the Punjab, Lahore, Pakistan.
18. Nowroozi, P., S.Y. Sadeghian, M. Mesbah and T. Lahrasbi. 2003. Investigation on salt tolerance and chromosomal variation in cell culture of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Sugarbeet J., 19(1): 37-50.
19. Ouma, J.P., M.M. Young and N.A. Reichert. 2004. Optimization of *in vitro* regeneration of multiple shoots from hypocotyl sections of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Afr. J. Biotechnol. 3(3): 169-173.
20. Poustini, K. 1995. Physiological rections of two wheat cultivars to salinity stress. Iranian J. of Agri. Sci., 26(2): 57-64.
21. Ramazani Moghaddam, M.R. and M.R. Zangi. 2003. Evaluation of salinity tolerance in tetraploid cotton (*Gossypium* spp.) genotypes. Cotton Research Institute of Iran (CRII) Pub., 82/649 Registration No. in Agricultural Scientific Information and Documentation Center (ASIDC). Tehran, Iran. 47 pp.
22. Rao, A.Q., H. Syed Sarfraz, S. Shahzad, B.Y. Abbas, A.R. Allah Rakha, A. Shahid, Z. Saleem, H. Tayyab and S. Riazuddin. 2006. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* Spp.). J. Zhejiang Univ. Sci. B., 7(4): 291-298.
23. Singh, A.K. and S. Chand. 2003. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explant of a timber-yielding leguminoub tree, Dalbergia sissoo Roxb. Plant Physiol., 160(4): 415-421.
24. Syed Sarfraz, H., T. Hussain and S. Riazuddin. 2004. Somatic embryo germination and plant development from immature zygotic embryos in cotton. Pakistan J. Biol. Sci., 7(11): 1946-1949.
25. Syed Sarfraz, H., T. Hussain and S. Riazuddin. 2005. Recurrent somatic embryogenesis and twin embryo production in cotton. Pakistan J. Biol. Sci., 8(1): 141-145.
26. Tort, N. 1996. Effects of light different growth mediaton and salt contration on germination of cotton seed. Agron. and Crop Sci., 176: 717-727.
27. Wilkins, T.A., R. Mishra and N.L. Trolinder. 2004. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of cotton. J. Food Agric. Environ., 2: 179-187.
28. Zangi, M.R. 2008. Evaluation and comparison yield on five salt tolerance cultivars of cotton compare to Sahel cultivar in Golestan province. Cotton Research Institute of Iran (CRII) Pub., 86/370 Registration No. in Agricultural Scientific Information and Documentation Center (ASIDC). Tehran, Iran. 25 pp.
29. Zhang, B.H. 2001. High frequency somatic embryogenesis and Plant regeneration of an elite cotton variety. Bot. Bull. Acad. Sin., 42: 9-16.
30. Zhang, K., N. Guo, L. Lian, J. Wang, L. Sulian and J. Zhang. 2011. Improved salt tolerance and seed cotton yield in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by transformation with betA gene for glycinebetaine synthesis. Euphytica. 181(1): 1-16.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of Callus Formation and Salinity Tolerance in Different Explants of Cotton (*Gossypium* sp.) Cultivars *in Vitro*

K. Ghasemi Bezdi[1] and B. Aidin[2]

1- Assistant Professor, Cotton Research Institute (Corresponding author: kamalghasemi@gmail.com)
2- Former M.Sc. of Ardebil University
Received: 12, October, 2011 Accepted: 14, July, 2012

Abstract

Achievement to low-priced and short-term methods for obtaining of tolerant lines to abiotic stresses in plant breeding programs is one of the main applications of tissue culture. In present study, the callus formation potential of immature embryo, hypocotyl and root explants of Sahel, Sepid, No. 200, Barbadense and Khordad cotton cultivars were investigated on MS basal medium containing various hormonal combinations of 2, 4-Dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) and 6-Benzylamino purine (BAP). According to analysis of variance, callus formation percent was significant at 1% level for cultivar, explant type, hormonal combinations of medium and explant × hormonal combinations of medium interaction. On the basis of the mean comparisons by Least Significant Difference (LSD) Test, the highest callus formation was related to immature embryo explant of No. 200 cultivar on the MS medium containing 0.5 mg/l 2, 4-D, whereas, the root explant of Sepid cultivar showed the lowest callus formation percent. By transferring the produced calli on MS medium containing different concentrations of sodium chloride (NaCl) and then studying the relative growth rate of calli, it was revealed that the tolerance of explants to different concentrations of NaCl was significant at 1% level affected to cultivar, explant type, NaCl density and all their interactions. The highest relative growth rate of calli on the salinity medium was related to immature embryo explant and Khordad and Sepid cultivars with 77.3% and 76.2%, respectively, while the root explant of No. 200 cultivar with 17.9% showed the lowest tolerance to NaCl. The relative growth rate of calli showed significant reduction in all explants and cultivars with increasing of NaCl densities, as, the control treatment (without NaCl) has been the highest relative growth rate with 51.6%, and the lowest relative growth rate with 20.6% was observed on MS medium containing 3 mg/l NaCl. By transferring of the selected tolerant explants to the media with higher concentrations of 3.5 and 4 mg/l NaCl, it was determined that none of the calli and explants could not tolerate the higher NaCl densities in the medium.

Keywords: Stress, Explant, Cotton, Callus, NaCl

Archive of SID

www.SID.ir