نشریه زراعت
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۳، زمستان ۱۳۹۰

استفاده از هورمون ژیبرلیک اسید (GA) و کشت جنین بالغ در دورگه گیری بین گونه ای ارقام دیپلوئید با تتراپلوئید پنبه

• **علی جعفری مفیدآبادی** (نویسنده مسئول)
دانشیار موسسه تحقیقات پنبه کشور
• **عاطفه رنجبران**
کارشناس ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ‌دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۷ تاریخ‌پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۷۰۶۴۴۲
Email: mofidabad@yahoo.com

چکیده

به منظور انتقال ژن های مقاوم ازگونه های وحشی خویشاوند پنبه دیپلوئید بومی (2n=2x=26) به گونه های تتراپلوئید تجاری (2n=4x=52) و ایجاد یک روش کا آمد برای توسعه توانمندی ژنتیکی ارقام تجاری پنبه، از ژیبرلیک اسید و کشت جنین بالغ برای انجام تلاقی بین آنها استفاده شد. تلاقی ها بین ارقام پنبه تتراپلوئید و دیپلوئید به صورت دستی و دو طرفه در ایستگاه هاشم آباد گرگان انجام گرفت. جهت جلوگیری از ریزش گل ها و تشکیل و تکامل غوزه ها و دست یابی به بذر هیبرید، گل های والد مادری پس از گرده افشانی توسط هورمون GA_3 با دو غلظت صفر و ۱۰۰ پی پی ام به مدت هفت روز تیمار شدند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد و ۱ درصد به ترتیب بین والدین مختلف و تیمارهای هورمونی با استفاده از آزمون کای اسکور برای حفظ و نگهداری گل ها وجود دارد. بیشترین درصد تشکیل قوزه در تیمار ۱۰۰ پی پی م ژیبرلیک اسید برای تلاقی رقم سپید با هاشم آباد (۶۴ درصد) پس از ۷۰ الی ۸۰ روز مشاهده شده است. در حالی که فقط ۷/۵ درصد گل های تلاقی شده بدون اعمال تیمار هورمونی بر روی بوته ها حفظ و نگهداری شدند. مقایسه اثرات متوسط سن جنین (۳و ۴۵ روز) در جوانه زنی نشان داد که اختلاف معنی دار بسیار زیادی بین آنها در سطح ۱ درصد وجود دارد. بیشترین در صد جوانه زنی برای جنین با سن ۴۵ روز در تیمار ۱۰۰ پی پی ام جیبرلیک اسید در محیط کشت MS دیده شد (۷۳/۳ درصد). اثرات والدین در تلاقی ها با غلظت ۱۰۰ پی پی ام جیبرلیک اسید و جنین ۴۵ روزه نشان داد که رقم تجاری سپید با هاشم آباد بیشترین تلاقی پذیری را به همراه داشته است. اختلاف معنی داری بین والدین تتراپلوئید و دیپلوئید در انتخاب آنها به عنوان والد مادری در تلاقی ها برای در صد جوانه زنی جنین مشاهده نشد. بذور حاصل از تمامی تلاقی ها در مقایسه با بذور معمولی حاصل از گل های خودگشن شده به لحاظ مورفولوژی بذر ناقص است. گیاهان دو رگ تریپلوئید حاصل علاوه بر رشد رویشی برتر در مقایسه با والدین، عقیم بودند.

کلمات کلیدی: پنبه، هیبریداسیون بین گونه ای، دیپلوئید، تتراپلوئید، کشت جنین و ژیبرلیک اسید (GA)

www.SID.ir

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 93 pp: 78-83

Application of gibberellic acid and ovule-embryo culture in interspecific hybridization of diploid and tetraploid cotton species

By: Ali Jafari Mofidabadi, Associate Member of Cotton Research Institute (Corresponding Author; Tel: +989123706442)
Ranjbaran A. Msc Expert of Natural Resources and Agricultural Sciences Faculty of Gorgan University.

In order to transfer resistant gene from related wild species of cotton (2n=2x=26) to commercial species (2n=4x=52), and to establish an efficient genetic broadening system, gibberellic acid and ovule-embryo culture were used. Crosses between two Gossypium hirsutum commercial cultivars (Sahel and Sephid) as a seed parents with pollen grain of Hashem Abad and Kashmer diploid cultivar (*G. arboretum*) have been carried out into direction. For getting mature boll, pollinated flowers have been treated with 0 and100 ppm concentration of GA3 to overcome early abscission of pollinated flowers. There was a significant difference between GA3 concentrations and crosses for boll development at 5% probability level, using Chi-square test. Highly significant differences have been observed between control and hormone growth regulator for hybrid boll setting. Maximum boll development (64%) was observed in Sephid ×Hashem Abad when treated with 100 ppm GA3 after 45 DAP (Day after pollination). Only 7.5% of pollinated flowers led to develop boll in absent of GA3. Highly significant differences have been observed between 3 and 45 days old ovule-embryo culture on MS medium at 1% probability level. Direct embryo germination was observed from 45 days old embryo culture in MS hormone free medium. No significant differences were observed between tetraploid and diploid as seed parents for embryo germination. There was no direct plantlet regeneration in culture of isolated ovule less than 45 days. The seeds were not developed as well as those harvested from the self pollinated female parents. The sterile triploid hybrid plants showed more vigorous than either parent.

Key words: Cotton, *Gossypium hirsutum*, *G. arboretum*, Gibberellic acetic acid (GA), Diploid, Tetraploid, Triploid and Hybridization

مقدمه

پنبه به لحاظ تامین ماده خام صنایع نساجی و روغنکشی در اقتصاد کشورها ازجایگاه مهمی برخوار دار است. این گونه به جنس Gossypium تعلق دارد و دارای منابع ژنتیکی به فرم وحشی و زراعی است که در اصلاح ارقام تجاری آن اهمیت خاصی دارد. حدود ۴۹ گونه شناخته شده و تعریف شده در جنس Gossypium وجوددارد که ۴۴ عدد آن دیپلوئید (۲n=۲x= ۲۶) بوده و درکلاس های ژنومی A,B,C,D,E,F,K طبقه بندی شده اند (۵). گونه های آسیایی زراعی دیپلوئید *G.arboreum* L. و *G.herbaceum* L. دارای ۲۶ کروموزوم و گونه های دنیای جدید آلوتتراپلوئید *G.hirsutum* و *G.barbadense* که دارای ۵۲ کروموزوم هستند (۳،۲ ، ۱۱). کشت گونه های آسیایی دیپلوئید از چند سال قبل تا به حال کاهش یافته است این گونه ها در حال حاضر فقط در یک منطقه محدود از هند و چین و پاکستان کشت می شوند ولی در عوض کشت پنبه آپلند *G. hirsutum* افزایش پیدا کرده و بر رشد همه انواع پنبه های دنیای قدیم غالب گردیده است (۱۷)، به این ترتیب سطح وسیعی از اطلاعات توارثی وصفات ژنتیکی مهم موجود در گونه های دیپلوئید مثل مقاومت به انواع آفات و بیماری ها، سازگاری به شرایط نامساعد محیطی، مقاومت در برابر استرس هایی چون شوری و خشکی و ... که در طی میلیون ها سال در این گونه ها ایجاد شده و می تواند به طور مؤثر به گونه های تجاری آلوتتراپلوئید به جهت توسعه توانمندی ژنتیکی ارقام تجاری منتقل شود رفته رفته از مخازن ژنی حذف شده و به دست فراموشی سپرده می شود (۲۲).

در طی یک دوره طولانی زمانی اکثر اصلاح گران پنبه و علاقه مندان به برنامه های تکاملی در زمینه تلاقی بین گونه های پنبه دیپلوئید دنیای جدید و دنیای قدیم و همچنین تلاقی های بین گونه های دیپلوئید و تتراپلوئید تلاش های زیادی انجام دادند. بین پنبه های دنیای قدیم (AA) و دنیای جدید (AADD) در یک مقیاس محدود بین دو گونه قابل اجراست (۱۴). روش های نوین پیشنهادی مثل روش های کشت تخمک و یا استفاده از تیمار هورمون های ژیبرلیک اسید و نفتالین استیک اسید به صورت جداگانه در انجام تلاقی به عنوان روش هایی ضروری برای دست یابی به دورگه ها بکار گرفته شده و تا حدودی زمینه تلاقی را بوجود آورده اند (۲۰). استفاده از کشت جنین نارس اجباری بخاطر ریزش گل ها پس از تلاقی، موجب جوانه زنی غیر مستقیم جنین شده است (۱۸،۴،۱). هورمون جیبرلیک اسید و نفتالین استیک اسید برای جلوگیری از ریزش گل ها و تشکیل و تکامل غوزه ها جهت ایجاد هیبرید ها ی بین گونه های دیپلوئید و پنبه های آپلند مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۰). مع الوصف گونه های دیپلوئیدی که به طور مستقیم و یا با استفاده از روش های نوین با گونه های آپلند پنبه تلاقی می یابد هیبریدهای F1 عقیم تولید می کند. برای تولید هگزاپلوئیدهای بارور هیبریدهای F1 عقیم را با کلشی سین تیمار می کنند (۱۴). استفاده از کلشی سین نیز برای مضاعف نمودن تعداد کروموزوم های گونه دیپلوئید، جهت ایجاد آمفی دیپلوئید و سپس تلاقی گیاه حاصل با پنبه آپلند

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش شـد (۱۴). در این تحقیق، به دلیل ضـرورت نگهداری گل های تلاقی یافته تارسـیدن به بلوغ کامل جنین و دست یابی به گیاه هیبرید، از تلفیق تیمار هورمونی برای نگهداری گل ها و کشـت جنین بالغ برای باززایی گیاه استفاده شد.

مواد و روش ها

بذور والدین تهیه شـده از بانک بذر موسسه تحقیقات پنبه کشور در ردیف‌های با فاصله ۹۰ سـانتیمتر از هم و با در نظر گرفتن ۹۰ سانتیمتر فاصله بین تک بوته ها کشـت شدند، در هر واحد آزمایشی ده ردیف والد مادری به همراه دو ردیف والددهنده دانه گرده کشـت شـده اند. تمامی نیازهای زراعی کشـت پنبه نظیر آماده سـازی زمین، کوددهی و کنترل علـف های هرز و مبارزه با آفات و امراض بر اسـاس دسـتور العمل های زراعـی کشـت منطقه ای انجام شـد. تلاقی ها به صـورت دو طرفه بین والدیـن تترا/لوئید (سـاحل و سـپید) و والدین دیپلوئید (هاشـم آباد و کاشـمر) انجام گرفت. بمنظور جلوگیری از ریزش گل ها دو سطح تیمار هورمونـی ژیبرلیک اسـید (۱۰۰و صفر) بـر روی دمگل ها به مدت یک هفته بلافاصله پس از تلاقی بکار گرفته شد. گل های والد مادری هر روز بعداز ظهر توسـط دست اخته و سپس صبح روز بعد گرده افشانی توسط کشیدن بساک پایه پدری بر روی کلاله پایه مادری اخته شده مورد گرده افشانی قرار گرفته اند. جهت ممانعت از ریزش قوزه ها، هورمون ژیبرلیک اسـید روی محل اتصال دمگل و ساقه به مدت ۷ روز چکانده شد و برای اطلاع از میزان غوزه های ریخته هر روز تعداد اتیکت های ریخته شده بر روی زمین شمارش می شدند. جهت تلقیح مصنوعی جنین، تخمک های ایزوله شـده از تخمدان، ۳ و ۴۵ روز پس از گرده افشـانی به درون ویال های حاوی ۲۰ میلی متر محیط کشت مایع MS و هورمون رشد گیاهی در قالب کشت پرستار منتقل شدند.

محیط کشـت مورد اسـتفاده برای جوانه زنی جنین، محیط کشت MS (Murashige و Skoog، ۱۹۶۲) حاوی ۳۰ گرم در لیتر سـاکارز فاقد هورمون های رشـد گیاهی در نظر گرفته شد. سترون سازی محیط کشـت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو انجام و به درون ویال ها ریخته شد. کشت ها پس از انتقال تخمک ها در دمای ۲۴ درجه سـانتی گراد تحت شـرایط دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ سـاعت روشـنایی حاصل از لامپ های ۴۰ وات مهتابی و خورشـیدی با شـدت ۴۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس نگهداری شـدند. آنالیز داده ها بر اساس مقایسـه میانگن عوامل موثر (ژیبرلیک اسـید و سـن جنین) در تشکیل غوزه و جوانه زنی درون شیشـه ای جنین به روش کی اسکور با استفاده از نرم افزار Mstatc انجام شـد. گیاهچه ها با ارتفاع ۳ الی ۴ سانتی متر بداخل شیشـه های مربایی حاوی محیط کشت مشابه منتقل و به مدت یک ماه قبل از انتقال به گلدان حاوی خاک نگهداری شدند..

نتایج و بحث

از ۴۰۰ گل تلاقـی یافتـه که بـا هورمون ۱۰۰ پی پـی ام ژیبرلیک اسـید تیمار شـدند، ۲۳۴ غوزه پس از ۴۵ روز بر روی گیاه باقی مانده و به بذر نشسـته اند (۵۸/۳ درصد). در صورتـی که ۳۰ عدد غوزه از ۴۰۰ گل تلاقی شده (۷/۵ درصد) که تحت تیمار هورمون جیبرلیک اسید قرار نگرفته اند فقط برای مدت یک ماه بر روی بوته ها باقی ماندند. مقایسـه اثرات متوسـط تلاقی پذیری بین والدین با سطوح مختلف پلوئیدی نشان داد کـه اختـلاف معنی داری در سـطح احتمال ۱ درصـد برای تلاقی دو رقم سـاحل و سـپید از گونه هیرسـتوم با دو رقم بومی هاشم آباد و کاشمر به صورت دو طرفه وجود دارد (جدول ۱). بیشترین درصد متوسط تلاقی پذیری (۶۴ درصد) برای تلاقی سپید به عنوان والد مادری تتراپلوئید با رقم کاشمر به عنوان والد دهنده دانه گرده دیپلوئید اتفاق افتاد. مقایسه متوسـط اثرات غلظت های هورمون رشـد ژیبرلیک اسید برای حفظ و نگهداری غوزه ها نشـان داد که اختلاف بسـیار معنی داری در سطح ۱ درصد برای غلظت ۱۰۰ پی پی ام و کنترل (بدون اسـتفاده از هورمون) وجود دارد (جدول ۱). بیشـترین در صد غوزه ها (۳۸/۲ درصد) با تیمار ۱۰۰ پی پی ام در پایان ۴۵ روز مشاهده شد. تمامی ۷/۵ درصد غوزه های تشکیل شده بدون تیمار زیبرلیک اسید، پس از حدود یکماه ریزش کردند. این موضوع بیانگر این است که بدون استفاده از هورمون جیبرلیک اسید امـکان تلاقی بین گونه های دور از هم بویژه با سـطوح مختلف پلوئیدی وجود ندارد. مقایسـه اثرات متوسط، والدین مادری تترا پلوئید و دیپلوئید در تکامـل و نگهداری غـوزه ها (درصد تلاقی پذیری) بر اسـاس آزمون کای اسـکور نشـان داد که اختلاف بسیار معنی داری در سطح احتمال ۱ درصـد بین والدین مادری تتراپلوئید (ارقام تجاری) با دانه گرده دیپلوئید (گونه های وحشی) و تلاقی عکس آن برای نگهداری غوزه ها تحت تیمار ۱۰۰ پی پی ام هورمون ژیبرلیک اسـید وجود دارد (جدول ۲). استفاده از تیمار ۱۰۰ پی پی ام ژیبرلیک اسـید موجب باقی ماندن بطور متوسط ۳۴/۲ در صـد گل ها و تکامل غوزه ها و بذر دهی در کل تلاقی ها شـد. بدین معنی که اسـتفاده از هورمون مذکور موجب شد تا از ریزش گل ها جلوگیری گردد و به غوزه های تشـکیل شده، فرصت کافی برای تکامل جنیـن از مرحله نارس (۳ روز) تـا مرحله بلوغ کامل (حداقل ۴۵ روز) را بدهـد و زمینـه انجام تغذیه مصنوعی جنین و رفع ناسـازگاری احتمالی بویژه در تولید دورگ های دیپلوئید با تترا پلوئید بوجود آورد. این موضوع در مورد گیاهان دیگری که دوره تکاملی جنین در آنها طولانی اسـت نیز صدق می کنـد. (۸). گل های تلاقی یافته بـدون اعمال تیمار هورمونی ژیبرلیک اسـید یک هفته پس از تلاقی شـروع به ریزش و در مدت سـه الـی چهار هفته تمامی گل ها از دسـت رفت. بنابرایـن تجزیه و تحلیل داده ها برای ارزیابی تغذیه مصنوعی جنین و اثرات والدین در جوانه زنی آنها، فقط برای تیمار ۱۰۰ پی پی ام زیبرلیک اسید انجام شد. بدلیل عدم تشـکیل جنین بالغ در تیمار کنترل (بدون اسـتفاده از ژیبرلیک اسید)، آزمون اثر تغذیه مصنوعی جنین و والدین در جوانه زنی درون شیشه ایی جنین از ادامه بررسی حذف شد. در مجموع ۶۰ عدد تخمک حاوی جنین ۳و ۴۵ روزه (۳۰ عدد برای هر سن) برای هر یک از تلاقی ها ایزوله و به محیط کشت MS منتقل شدند. جنین ها با سن ۴۵ روزه پس از گذشت یک هفته از انتقال تخمک ها در محیط کشـت شـروع به جوانه زنی توام سـاقه و ریشـه و ایجاد گیاه معمولی نموده اند. در حالی که تخمک ها با سـن کمتر از ۴۵ روز (۳ روز) در محیط کشـت شروع به کالزایی کردند. لذا کالوسـهای ترد و شـکننده پس از مدت یک ماه و واکشت در محیط کشـت جامد مشـابه با ظهور رنگدانه های قرمز رنگ شـروع به باززایی گیـاه نمودند. این نتایج مشـابه گـزارش Zhang و همکاران (۱۹۹۵) و

Archive of SID
www.SID.ir

Stewart و Hsu (۱۹۷۷) در خصوص ظهور رنگ دانه های قرمز قبل از باززایی گیاهچه از سطح کالوس است. کشت جنین با سن کمتر از ۴۵ روز به دلیل عدم اســتفاده از تیمار هورمونی در مطالعات (۶،۷،۹،۱۰،۱۵،۱۶). استفاده شد و نتایج مشابهی بدست آمد. تمامی گیاهان حاصل و داده های ناشــی از آن، به دلیل باززایی غیرمسقیم و احتمال وقوع تنوع سوماکلونی حذف شــدند. این موضــوع در گــزارش Khadi و Kulkarni (۱۹۹۸) نیز آمده اســت. نتایــج حاصل از تجزیه و تحلیــل داده های حاصل از اثر والدین در جوانه‌زنی جنین تلاقی های مختلف، بیانگر وجود اختلاف بسیار معنی داری در ســطح ۱ درصد بین آنها می باشــد (جدول ۳). بیشــترین در صــد جوانه زنی جنیــن ۴۵ روزه (۷۳/۳ درصد) بــرای تلاقی رقم تترا پلوئید ســپید با کاشمر مشاهده شــد (جدول ۳). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده ها حاصل از اثر سطوح مختلف پلوئیدی والدین در جوانه زنی کشــت جنین (۱۳/۷۵ درصد و ۱۰/۵درصد بترتیب تتراپلوئید با دیپلوئید و تلاقی عکس آن) نشان داد که اختلاف معنی داری بین آنها وجود ندارد (جدول ۴). بیشــترین درصد جوانه زنی جنین و بیشــترین در صد تکامل غوزه ها وقتی بدســت آمد که رقم تتراپلوئید به عنوان والد مادری انتخاب شد (جداول ۱و ۴). کمترین مقدار جوانه زنی جنین مربوط به تلاقی هاشم آباد به عنوان والد مادری دیپلوئید با رقم تتراپلوئید ســاحل اســت (۲۶/۶ درصد). نتایج نشان می دهد که با بکار بردن هورمون GA امکان ایزوله و کشت جنین بالغ در تلاقی درون و بویژه بین گونه های با سطوح مختلف پلوئیــدی بین والدیــن تتراپلوئید با دیپلوئید جهت ایجاد زمینه مناســب دســتیابی به ارقام هگزا پلوئید وجود دارد. گیاهان عقیم بدســت آمده به عنوان مارکر فنوتیپی حاکی از تریپلوئید بودن این گیاهان و صحت انجام تلاقی تتراپلوئید و دیپلوئید و تلاقی عکس آن است (شکل ۱).

الف ب

شکل ۱- گیاه F۱ عقیم حاصل از تلاقی بین گونه ای کاشمر (۲x) با سپید (۴x) (الف) و گیاه F۱ عقیم حاصل از تلاقی بین گونه ای ساحل (۴x) با هاشم آباد (۲x) (ب)

جدول ۱- مقایسه اثرات متوسط فاکتورهای مختلف (والدین و ژیبرلیک اسید) در تولید دورگ های بین کونه ای (تتراپلوئید با دیپلوئید و تلاقی معکوس آنها) با استفاده از آزمون کی اسکور

در صد تلاقی پذیری	فاکتورهای موثر
٪ گلهای بارور شده	اثر سطوح پلوئیدی والدین در تلاقی ها
۶۴**	Sephid (۴x) × Hashem-Abad (۲x)
۵۴	Sephid (۴x) × Kashmer (۲x)
۳۴	Sahel (۴x) × Kashmer (۲x)
۲۲	Sahel (۴x) × Hashem-abad (۲x)
۲۲	Hashem-abad (۲x) × Sephid(۴x)
۱۸	Hashem-abad (۲x) × Sahel(۴x)
۲۸	Kashmer (۲x) × Sephid (۴x)
۲۲	Kashmer (۲x) × Sahel
٪ گل های بارور شده	اثرات GA
۳۸/۲**	۱۰۰ppm
۷/۵	۰ppm
** = اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد وجود دارد	

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه اثرات متوسط فاکتورهای مختلف (والدین و ژیبرلیک اسید) در تولید دورگ های بین گونه ای (تتراپلوئید با دیپلوئید و تلاقی معکوس آنها) با استفاده از آزمون کی اسکور

در صد متوسط ماندگاری غوزه ها و بیان اختلاف آماری	سطوح پلوئیدی والدین
۴۳/۵ **	۲x × ۴x
۲۵	۴x × ۲x

** = اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد وجود دارد

جدول ۳- اثرات متوسط والدین تلاقی ها با سطوح مختلف پلوئیدی بر روی جوانه زنی جنین های دورگ ۴۵ روزه

٪ جوانه زنی	سطوح پلوئیدی والدین در تلاقیها
۴۳/۳ **	Sephid (۴x) × Hashem-Abad (۲x)
۷۳/۳	Sephid (۴x) × Kashmer (۲x)
۳۶/۶	Sahel (۴x) × Kashmer (۲x)
۳۰	Sahel (۴x) × Hashem-abad (۲x)
۲۶/۶	Hashem-abad (۲x) × Sahel(۴x)
۴۳/۳	Hashem-abad (۲x) × Sephid(۴x)
۳۰	Kashmer (۲x) × Sahel (۴x)
۴۰	Kashmer (۲x) × Sephid (۴x)

** = اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد وجود دارد

جدول ۴- مقایسه اثرات متوسط والدین با سطوح مختلف پلوئیدی در جوانه زنی با استفاده از آزمون مربع کای

درصد متوسط جوانه زنی جنین و بیان اختلافات آماری	سطوح پلوئیدی والدین
۱۳/۷۵ ns	۲x × ۴x
۱۰/۵	۴x × ۲x

ns= عدم اختلاف معنی دار

منابع مورد استفاده

۱- عالیشـــاه، ع. (۱۳۸۲) بررسی کشت جنین در تولید دورگ های بین و درون گونه ایی. پایان نامه دکتری. دانشگاه تهران

2- Amalraj, S.F.A. (1989) Combining ability studies on *G. hirsutum* and *G.barbadens* hybrids. *Indian J.Agric Res*. 23(2): 65-69.

3- Arutynova, L.G. and Ablaeva, R.A. (1988) Variability of chromosome number of interspecific cotton hybrids. *Cytology and Genetics,* 22(3): 8-18.

4- Eid, A.A.H., Delange E. and Waterkeyn, L. (1973) in vitro culture of fertilized cotton ovules. The growth of cotton embryos. *Cellule* 69: 361-371.

5- Endrizzi J.E., Turcotte E.L. and Kohel R.J. (1985) Genetics, cytology and evolution of Gossypium. *Adv. Genet* .23:271-327.

6- Gill, M.S., and Bajaj Y.P.S. (1987) Hybridization between diploid (*G. arboreum*) and Tetraploid (*G. hirsutum*) cotton through ovule culture. *Euphytica*, 36(2): 625-630.

7- Hu, S.A. and Li, X.L. (1982) Ouule Culture of interspecific hybrids from diploid wild cotton × tetraploid cultivars and the embryo and seedling development. *Acta Genet. Sin*. 9(1): 57-62.

8- Jafari Mofidabadi, A. and Modir-Rahmati A.R. (2000)

www.SID.ir

Cottons. 28:2,17-126.

17- Moradi, A.R. (1997) *Hybridization of diploid and tetraploid cottons through in vitro embryo culture*. M.Sc. Thesis. Tarbiat Modares University.

18- Pandey, S.N. (1976) Utilization of cotton seed and its products. *Cotton Develop*. 6:4-9.

19- Pundir, N.S. (1974) In vitro growth responses of hybrid embryos and ovules of cotton, 3rd International Conf. *Plant Tissue and Cell Culture*.Abst.86.

20- Singh, P. (1998) *Cotton Breeding*, Kalyani Publishers New Delhi, India Pp:125-135.

21- Stewart, J.M. and Hsu, C.L. (1978) Hybridization of diploid and tetraploid cottons through in-ovulo embryo culture. *The journal of heredity*. 69: 404-408.

22- Stewart, J.M. and Hsu. C.L. (1977) In-ovulo embryo culture and selfing development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Planta* 137:2,113-117.

23- Wavikesavan, R. Raveendran, T.S. Parameshwar, C. Suganthi, S. Mohand S. and Surendran C. (2002) *Morphological, Physiological and biological features associated with biotic and abiotic stresses in cotton cultures derived through introgressive breeding*. Proceeding of 2nd Meeting of the Asian Cotton Research and Development Network.pp. 69-87.

24- Wendel J.F. (1989) *New World tetraploid cottons contain old world cytoplasm.* Proc.of Natl.Acad.Sci. USA. 86: 4132-4136.

25- Zhang, B.H., X.M. Du and Feng R. (1995) Research on pigment of cotton embryos. *China-cottons*. 22:2,11-12.

Production of *Populus euphratica* Oliv. × *P. alba* L. hybrid poplars through ovary and ovule cultures. *Plant Genetic Newsletter*. 122: 13-15.

9- Joshi, P.C. and Johri, B.M. (1972) In vitro growth of ovules of *G. hirsutum*. *Phytomorphology*, 22: 195-209.

10- Joshi, P.C. and Pundir, N.S. (1996) Growth of hybrid ovules of *Gossypium arboretum* × *G.hisutum in vivo* and in vitro. *Indian Cotton.* J.20:23-29.

11- Khadi B.M. and Kulkarni V.N. (1998) *Cultivar development and seed problems in India*. In Proceedings of seminar on cotton cultivation and problems of marginal farmers held between 10-11 April 1998. Guntur Andhra Pradesh. India. pp 111-123.

12- Liu, C., Shun J. and Liu. J. (1992) *In vitro* interspecific fertilization, embryo development and formation of hybrid seedling between *G.hirsutum* and *G.arboreum*. *Euphytica* 60: 79-88.

13- Meyer V.C. (1974) Interspecific Cotton Breeding. *Economic Botany* 28: 56-60.

14- Murashig T. and Skooge F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiol. Planr.* 15: 473-493.

15- Mirza, M.A., Sheikh A.L. and Anjum, Z.I. (1993) In-ovulo embryo culture of interspecific hybrids between some diploid Asian and Australian wild species of Gossypium. *Pakphyton* 5: 109-117.

16- Mirza, M.A. and Shaikh A.L. (1984) In-ovulo embryo culture of some incompatible species hybrids of Gossypium. *Pakistan-*

Archive of SID