

بررسی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط درون شیشه‌ای

لیلا اکبری^{۱*}، کیانوش چقامیرزا^۱ و عزت‌اله فرشادفر^۲

^۱ کرمانشاه، دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

^۲ کرمانشاه، دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده کشاورزی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی

تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۶

چکیده

واکنش کالوس‌های حاصل از کشت رویان‌های بالغ و نابالغ بیست ژنوتیپ گندم دوروم به تنش خشکی در محیط کشت MS حاوی آگار با پنج مقدار مختلف پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (۲۰۰-۰ گرم در لیتر) بررسی شد. ارزیابی ژنوتیپ‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت آزمایش فاکتوریل ۵ × ۲۰ انجام شد. صفات سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، درصد محتوای آب کالوس، شاخص تحمل کالوس و درصد کلروز کالوس در شرایط تنش مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که اثر ژنوتیپ، سطوح مختلف خشکی و اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی برای کلیه صفات مختلف در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را بر اساس صفات اندازه‌گیری شده کالوس حاصل از جنین بالغ و نابالغ تحت تنش خشکی به چهار دسته گروه‌بندی کرد. ژنوتیپ‌های 65-12-3-3 و 75-5-3-5 از ارقام بومی استان کرمانشاه در کشت جنین بالغ در یک گروه بودند، به طوری که این ژنوتیپ‌ها در کشت جنین نابالغ در گروه‌های متفاوت تحت عنوان گروه ژنوتیپ‌های مقاوم قرار گرفتند. با توجه به نتایج بدست آمده در کشت جنین بالغ و نابالغ، ژنوتیپ شماره 75-5-3-5 به علت دارا بودن رشد نسبی کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس، درصد محتوای آب بیشتر و درصد کلروز پایین‌تر در سطوح مختلف خشکی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به عنوان ژنوتیپ احتمالی متحمل نسبت به خشکی در شرایط درون شیشه‌ای شناسایی شد.

واژه‌های کلیدی: کشت جنین، تحمل خشکی، گندم دوروم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۳۱-۸۳۲۴۸۲۰، پست الکترونیکی: Akbari.11020@gmail.com

مقدمه

کشورها حائز اهمیت است (۲۰، ۲۱). محدودیت منابع آبی و سایر عوامل باعث توجه بیشتر به مطالعه اثرات تنش خشکی و انتخاب ارقام مقاوم به خشکی شده است. روش‌های اصلاح سنتی در بررسی تنش‌های زنده و غیر زنده با مشکلاتی همانند نبود فضای مناسب، زمان کافی و نیز از بین رفتن زمینه ژنتیکی در هنگام مقایسه بین گونه‌های وحشی مقاوم با رقم‌های زراعی مواجه هستند (۱۳). ایجاد گیاهان مقاوم به خشکی از طریق روش‌های سنتی بسیار وقت‌گیر و گاهی غیر ممکن است. بنابراین تکنیک‌های متعددی در جهت گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به

گندم دوروم از جنس تریتیکوم (*Triticum*) و با نام علمی تریتیکوم دوروم (*Triticum durum*) یک آلوتراپلوئید با تعداد کروموزوم $2n = 4x = 28$ و فرمول ژنوم AABB می‌باشد (۶). گندم دوروم با داشتن ۲۱ میلیون هکتار سطح زیر کشت، هشتمین رتبه را در میان غلات جهان داراست. در ایران این گیاه با سطح زیر کشت ۳۳۸ هزار هکتار در استان‌های خوزستان، لرستان، اصفهان و خراسان در مزارع دیم کشت شده و به صورت مخلوط با گندم نان استفاده می‌شود. برای تولید ماکارونی و اسپاگتی در سطح جهان کشت داده می‌شود و از دیدگاه اقتصادی برای بیشتر

ریشه‌ها نداشته است (۹). نتایج بررسی بر روی کشت جنین پنج رقم گندم ایرانی نشان داد، با افزایش سطح پلی اتیلن گلیکول وزن تر کالوس‌ها کاهش یافته و در غلظت‌های بالای پلی اتیلن گلیکول بیشترین مقاومت مربوط به رقمی است که با کاهش رشد نسبی همراه است (۱۳). از آنجائی که شناسایی و کاربرد ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در برنامه‌های به‌نژادی آینده دارای اهمیت بسزایی می‌باشد، از این‌رو هدف این مطالعه بررسی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم و ارزیابی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از کالوس‌های حاصل از کشت جنین بالغ و نابالغ در شرایط درون شیشه بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شامل ۹ ژنوتیپ از توده‌های بومی گندم دوروم، ۱۰ لاین از ایکاردا و یک رقم بومی زرد که به عنوان شاهد بود به منظور سهولت کار به هر یک از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کد ۲۰-۱ اختصاص داده شد (جدول ۱). آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد. به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر روی ژنوتیپ‌های دوروم، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور، ژنوتیپ در ۲۰ سطح و خشکی در پنج سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ گرم در لیتر پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰) با سه تکرار اجرا گردید. برای مقایسه درصد و سرعت رشد کالوس حاصل از کشت جنین و نیز واکنش آنها به محیط تحت تنش خشکی، جنین بالغ و نابالغ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تحت شرایط استریل جدا و ۱۰ جنین در هر محیط کشت MS حاوی آگار با ۲/۵ میلی-گرم در لیتر هورمون 2,4-D، برای تولید کالوس کشت داده شد. سپس کالوس‌های تولید شده پس از واکنش برای بررسی مقاومت به خشکی به محیط‌های کشت حاوی مقادیر مختلف پلی اتیلن گلیکول (PEG) به مدت ۱۶ روز منتقل شدند.

خشکی در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (۲۳). امروزه از شیوه‌های جدیدتر از جمله کشت بافت برای ایجاد گیاهان مقاوم به خشکی و سایر عوامل نامساعد استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی به منظور تولید گیاهان مقاوم در برابر تنش و به‌ویژه متحمل به شوری، با استفاده از تنوع موجود یا ایجاد شده در کشت بافت انجام شده است (۱۰). سیستم کشت بافت برای ارزیابی تحمل به تنش‌های محیطی مفید است، زیرا تنش‌های محیطی در شرایط درون شیشه‌ای به سادگی قابل کنترل هستند (۱۴). انتخاب درون شیشه برای تحمل به تنش غیر زیستی به توسعه مؤثر و معتبر القای کالوس و سیستم‌های باززایی گیاه بستگی دارد (۱۱). روش‌های درون شیشه‌ای در مطالعات زیادی برای کوتاه کردن دوره‌های اصلاحی به کار برده شده‌اند. از طریق سلول‌های گیاهی کشت شده و بررسی واکنش آنها به تنش‌های محیطی مؤثر می‌توان اثرات یون‌ها، علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و اثرات سمی را که توسط پاتوژن‌ها تولید می‌شوند، مطالعه کرد (۱۷). زمانی که بافت گیاهی در محیط کشت در سطح سلولی در حال رشد است می‌توان آن را تحت تأثیر عوامل تنش قرار داد، بافتی که بتواند در شرایط تنش زنده بماند، می‌تواند با مقاومت به یک صفت از قبل مشخص شده (خشکی، شوری و ...) به یک گیاه کامل تبدیل شود (۲۲). وزن تر کالوس‌های آفتابگردان گزینش شده در محیط تنش در مقایسه با کالوس‌های گزینش شده در محیط بدون عامل تنش‌زا کاهش محسوسی را از خود نشان داده‌اند و با افزایش سطوح تنش رشد گیاه کاهش پیدا کرده و بین شرایط *In vitro* و *In vivo* همبستگی معنی‌دار وجود دارد (۲۴). پلی اتیلن گلیکول و مانیتول در مقایسه با غلظت‌های متفاوت کلرید سدیم، موجب کاهش شدید تعداد ریشه‌ها در گیاهچه‌های گندم دوروم شده است، همچنین میزان آسیب پلی اتیلن گلیکول بر رشد گیاهچه‌ها بیشتر از کلرید سدیم بوده است. در حالی که غلظت‌های متفاوت مانیتول، تأثیری بر روی درصد جوانه‌زنی و تعداد

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در بررسی تنش خشکی گندم دوروم

نام ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	کد ژنوتیپ
Heider/Mt/Ho	11	Zardak	1
Syrian - 4	12	65-12-3-3	2
Waha- B53	13	25-25-1-5	3
Arthar 71/Bcr//ch5	14	75-5-3-5	4
Stj3/4/stn//Hvi/Somo/ 3/yav/ fg//Roh	15	409	5
Grdara-2	16	259	6
Lgt3/4/Bcr/3/ch1//Gta/ stk	17	15-15-1-3	7
Aghrass-2	18	240	8
Quadalete//Erp/mol/3/unk/4/Mrb3/Mnal	19	37-24-2-3	9
Stj3//Bcr/lks4	20	249	10

سرعت رشد کالوس (Callus Growth Rate) (میلی‌متر قطر در روز): قطر کالوس‌های حاصل در محیط کشت MS حاوی PEG بعد از ۴، ۸، و ۱۲ روز پس از کشت مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نحوه محاسبه قطر کالوس بدین ترتیب بود که به کمک کاغذ میلی‌متری، طول و عرض کالوس‌ها اندازه‌گیری شد و بعد در هم ضرب شده و از آن جذر گرفته شد تا قطر کالوس بدست آید. سپس با استفاده از میانگین کالوس‌ها در هر تکرار متوسط سرعت رشد با استفاده از چهار عدد قطر کالوس محاسبه شد.

زمان / میانگین قطر کالوس = سرعت رشد کالوس

رشد نسبی کالوس (Relative Fresh Weight Growth Callus) (بر اساس وزن تر): رشد نسبی کالوس‌ها بر اساس وزن تر (RFWG)، برای هر ژنوتیپ از روش مورد استفاده کارادیموا و دژامبوا محاسبه شد:

$$RFWG = [(W_2 - W_1) / W_1]$$

که در آن W_1 و W_2 به ترتیب وزن اولیه و نهایی کالوس در مرحله تنش می‌باشد.

سرعت رشد نسبی کالوس (Relative Growth Rate Callus) (بر اساس وزن تر): برای محاسبه سرعت رشد نسبی کالوس‌ها بر اساس وزن تر (RGR)، برای هر ژنوتیپ از فرمول زیر استفاده شد.

$$RGR = [\ln W_2 - \ln W_1] / \text{دوره رشد}$$

انتقال کالوس‌ها به محیط کشت حاوی پلی اتیلن گلیکول: کالوس‌های حاصل از جنین‌های بالغ و نابالغ کشت شده پس از ۲۸ روز نگهداری در شرایط استریل واکت شد. دو هفته پس از واکت، کالوس‌های سالم و با قطر مناسب در محیط کشت MS جامد (حاوی پلی اتیلن گلیکول) حاوی ۲/۵ میلی‌گرم در 2,4-D و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز مورد کشت دوباره قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تحت تأثیر پنج سطح تیمار خشکی ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در لیتر قرار داده شدند. در هر پتری‌دیش حاوی پلی اتیلن گلیکول، پنج قطعه کالوس کشت شد و برای هر سطح تیمار خشکی در هر ژنوتیپ سه تکرار در نظر گرفته شد. پتری‌دیش‌ها پس از علامت‌گذاری، در اتاقک کشت در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در روزهای ۰، ۴، ۸، ۱۲، و ۱۶ روز پس از کشت، قطر کالوس‌ها بوسیله کاغذ میلی‌متری در ابتدا و پایان دوره تنش وزن تر و خشک کالوس‌ها به کمک ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. در طی دوره کشت کالوس‌ها در محیط تنش صفاتی همانند وزن کالوس، قطر کالوس، سرعت رشد کالوس، درصد کلروز، سرعت رشد نسبی، درصد محتوای آب کالوس و شاخص تحمل خشکی کالوس نیز اندازه‌گیری شدند.

صفات مورد مطالعه در بررسی تنش خشکی

محاسبات آماری: تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با آزمون حداقل دامنه‌های معنی‌دار دانکن در سطح احتمال یک درصد، با استفاده از نرم افزارهای آماری MSTATC و SAS انجام شد. تبدیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و MSTATC انجام شد. همبستگی صفات با یکدیگر با استفاده از نرم افزار آماری SPSS محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با روش Ward و با تعیین ضریب فاصله اقلیدسی با استفاده از نرم افزار SPSS.16 انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس بدست آمده از کالوس حاصل از جنین بالغ کشت شده در محیط کشت MS حاوی سطوح مختلف پلی‌اتیلن گلیکول در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، سطوح مختلف خشکی و اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی از نظر صفات سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، درصد محتوای آب کالوس و درصد کلروز کالوس اختلاف بسیار معنی‌دار بود.

که در آن W_1 و W_2 به ترتیب وزن اولیه و نهایی کالوس در مرحله تنش می‌باشد.

درصد کلروز کالوس در خشکی: جهت محاسبه درصد کلروز، ۱۶ روز پس از کشت کالوس‌ها در محیط خشکی، به طور مشاهده‌ای برای کلیه ژنوتیپ‌ها، به هر کالوس رتبه ای عددی که نشانگر میزان کلروز در آن کالوس بود اختصاص یافت.

درصد محتوای آب کالوس: برای محاسبه درصد محتوای آب کالوس (Water Content Callus) بر اساس وزن تر و خشک آنها در پایان دوره تنش از فرمول زیر استفاده شد (۱۵).

$$RWC = [(W_2 - W_1) / W_2] * 100$$

که در آن W_1 و W_2 به ترتیب وزن خشک و وزن تر نهایی کالوس در محیط تحت تنش می‌باشد.

شاخص تحمل خشکی: برای محاسبه شاخص تحمل خشکی (Index of Tolerance) بر اساس سرعت رشد نسبی کالوس از فرمول زیر استفاده شد (۸).

$$INTOL = RGR \text{ treatment} / RGR \text{ control}$$

جدول ۲- میانگین مربعات صفات اندازه‌گیری شده بر روی کالوس حاصل از جنین بالغ تحت تنش خشکی

میانگین مربعات Mean of squares					درجات آزادی Df	منابع تغییرات
محتوای آب کالوس (RWC)	سرعت رشد کالوس (CGR)	رشد نسبی کالوس (RFGW)	سرعت رشد نسبی کالوس (RGR)	درصد کلروز کالوس (CH)		
4.465**	0.041**	0.059**	0.023**	0.264**	19	ژنوتیپ
0.125*	0.030**	4.581**	0.025**	3.049**	4	خشکی
17.324**	0.113**	15.351**	0.082**	10.815**	1	خطی (درجه 1)
0.255*	0.012*	0.823**	0.018**	0.828**	1	درجه 2
0.275*	0.003 ^{ns}	0.358**	0.010**	0.285*	1	درجه 3
0.005 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.796**	0.003 ^{ns}	0.272*	1	درجه 4
0.119**	0.023**	0.043**	0.031**	0.059**	76	ژنوتیپ × خشکی
0.006	0.006	0.029	0.009	0.047	200	خطای آزمایشی
					299	کل
10.22	5.67	15.02	16.88	12.98		درصد ضریب تغییرات CV %

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

نسبی کالوس ژنوتیپ‌های شماره ۲، ۳ و ۴ به ترتیب کمترین مقدار کلروز و بیشترین سرعت رشد نسبی را نشان دادند. ژنوتیپ‌های شماره ۴، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ بیشترین سرعت رشد کالوس را در سطوح مختلف خشکی داشتند. برای صفت شاخص تحمل، ژنوتیپ‌های شماره ۴ و ۸ تحمل بالاتری را در مقایسه با سایرین نشان دادند. ژنوتیپ شماره ۴ از درصد محتوای آب بالاتری نسبت به بقیه برخوردار بود. با توجه به نتایج بدست آمده ژنوتیپ شماره ۴ دارای رشد نسبی کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس و درصد محتوای آب کالوس بالاتر و درصد کلروز پایین‌تر بود، پس می‌توان آن را در این آزمایش به عنوان ژنوتیپ متحمل‌تر نسبت به خشکی ایجاد شده در شرایط شیشه‌شناسایی کرد. در مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و سطوح مختلف خشکی، صفات رشد نسبی کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، محتوای آب کالوس (بر اساس وزن تر)، سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز) با افزایش سطوح خشکی تا سطح ۱۵ درصد کاهش نشان دادند، پس از آن روند تغییرات ثابت ماند. در مقایسه میانگین صفت درصد کلروز کالوس، با افزایش سطح خشکی درصد کلروز کالوس تا سطح ۲۰ درصد پلی اتیلن گلیکول افزایش یافت (شکل ۱). نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج تحقیقات دیگر مطابقت داشت. در مطالعه کالوس‌های حاصل از گندم دوروم در سطوح مختلف تنش خشکی با افزایش غلظت پلی اتیلن گلیکول در محیط کشت، از مقادیر رشد نسبی کالوس و محتوای آب نسبی کالوس کاسته می‌شود (۱۹). کالوس‌های حاصل از جنین‌های نابالغ یک ژنوتیپ زمستانه و دوازده ژنوتیپ بهاره گندم تحت تأثیر پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در شرایط درون شیشه‌ای قرار داده شد. در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری در وزن تر و حجم نسبی کالوس‌ها مشاهده نشد (۱۸). کالوس‌های حاصل از دو رقم نیشکر تحت تأثیر تنش خشکی با سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول، کاهش معنی‌داری را در سرعت رشد نسبی و محتوای آب کالوس

اثر خشکی با توجه به کمی بودن، سطوح آن به درجات مختلف رگرسیون تفکیک گردید. بین سطوح مختلف خشکی و رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) و درصد کلروز کالوس روابط رگرسیونی خطی، درجه دوم، درجه سوم و درجه چهار معنی‌دار شدند.

اما برای سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) و درصد محتوای آب کالوس روابط خطی، درجه دوم و درجه سوم با سطوح مختلف خشکی معنی‌دار شدند. بین سطوح مختلف خشکی و سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز) روابط رگرسیونی خطی و درجه دوم معنی‌دار بودند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس شاخص تحمل خشکی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، سطوح مختلف خشکی و اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی از نظر شاخص تحمل کالوس (بر اساس وزن تر) اختلاف بسیار معنی‌دار وجود داشت. بین سطوح مختلف خشکی و شاخص تحمل کالوس روابط رگرسیونی خطی، درجه دوم و سوم معنی‌دار شدند.

جدول ۳- میانگین مربعات شاخص تحمل کالوس حاصل از جنین بالغ

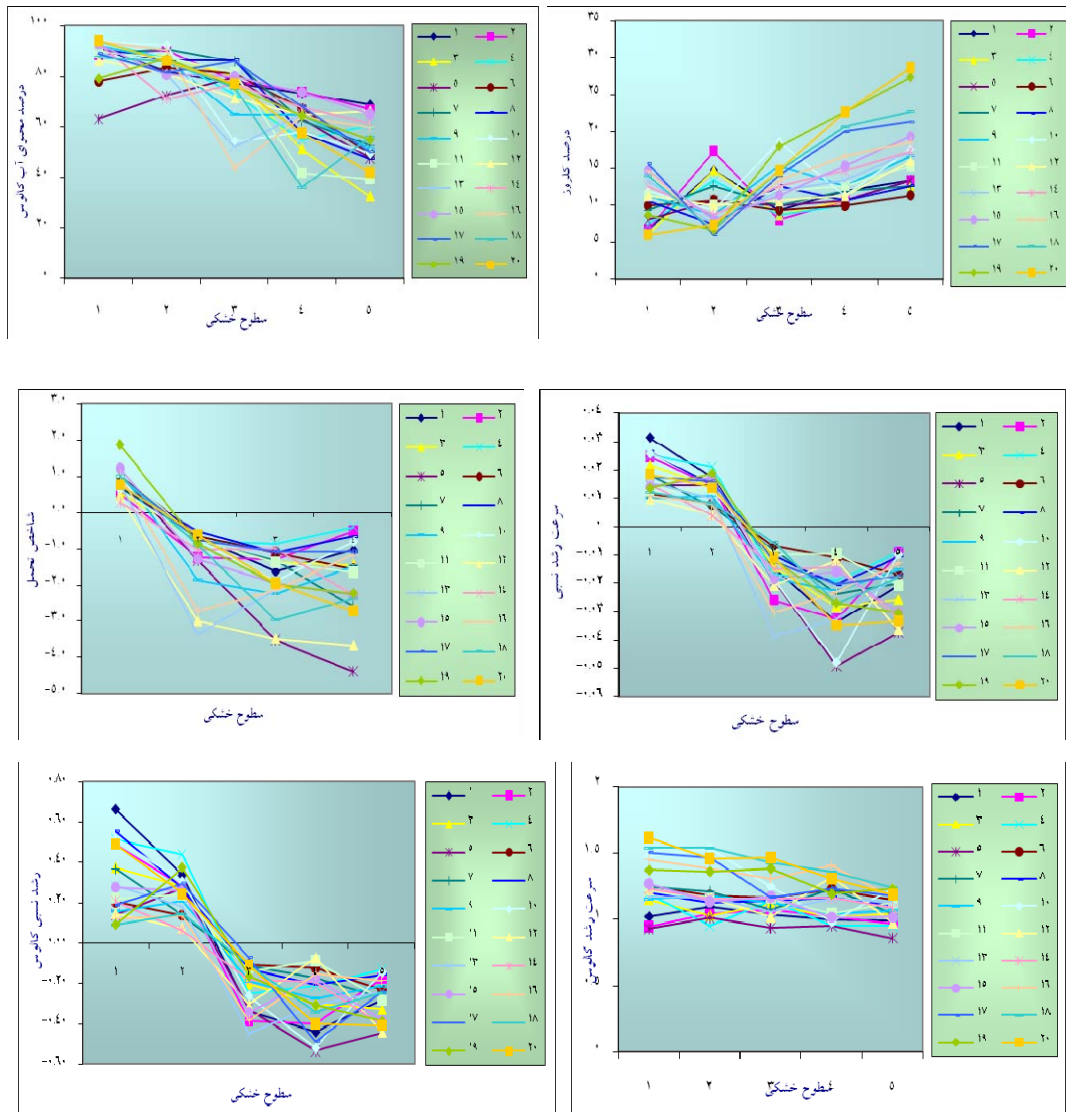
در سطوح مختلف تنش خشکی		
میانگین مربعات	درجات آزادی	منابع تغییرات
df		
0.321*	19	ژنوتیپ
31.760**	3	خشکی
17.430**	1	خطی (درجه ۱)
82.730**	1	درجه ۲
6.366**	1	درجه ۳
0.256*	57	ژنوتیپ × خشکی
0.168	160	خطای آزمایشی
	239	کل
17.47		درصد ضریب تغییرات
%CV		

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های مختلف از نظر صفات مورد بررسی در جدول ۴ ارائه شده است. در مقایسه میانگین صفت درصد کلروز کالوس و سرعت رشد

نشان دادند (۱۴). کالوس‌های بدست آمده از قطعات فوقانی ساقه نخل خرما در محیط کشت MS حاوی ده میلی‌گرم نفتالین استیک اسید و یک و نیم میلی‌گرم ایزوپنتیل آدنین به همراه غلظت‌های متفاوت صفر تا سی درصد پلی اتیلن گلیکول ۸۰۰۰ برای القای تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داده است با افزایش

سطوح پلی اتیلن گلیکول سرعت رشد نسبی، شاخص تحمل و محتوای آب کالوس در ارقام مورد مطالعه به‌طور معنی‌دار کاهش نشان داد (۸). کالوس‌های حاصل از کشت جنین بالغ سه رقم گندم دوروم به مدت یک ماه تحت تأثیر تنش‌های شوری و خشکی قرار داده شدند.



شکل ۱- پاسخ بیست ژنوتیپ گندم دوروم از نظر صفات مورد بررسی کالوس حاصل از جنین بالغ در سطوح مختلف خشکی

گلیکول قرار داشتند در مقایسه با کالوس‌های تحت تأثیر مانیتول قابلیت بازگشت بیشتری را داشته‌اند (۲۰). در بررسی کالوس‌های نخل روغنی در سطوح مختلف تنش

در پایان آزمایش مشخص گردید که در حضور غلظت‌های متفاوت پلی اتیلن گلیکول سرعت رشد نسبی کالوس‌ها کاهش یافت و کالوس‌هایی که تحت تأثیر پلی اتیلن

در شرایط تنش خشکی در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که بین صفت درصد کلروز کالوس با سرعت رشد کالوس در شرایط تنش همبستگی معنی‌داری وجود داشت. همبستگی معنی‌داری بین صفت محتوای آب کالوس با صفات سرعت رشد، رشد نسبی، سرعت رشد نسبی، شاخص تحمل و درصد کلروز در شرایط تنش همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد. البته بین سرعت رشد نسبی کالوس و سرعت رشد کالوس در شرایط تنش همبستگی وجود داشت. بین شاخص تحمل خشکی کالوس در شرایط تنش با صفات سرعت رشد نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس در شرایط تنش همبستگی معنی‌داری مشاهده شد.

خشکی با افزایش سطوح تنش از میزان محتوای آب نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس کاسته می‌شود ولی مقدار پرولین کالوس با افزایش سطح تنش افزایش نشان داده است (۸). در مطالعه بر روی کالوس‌های به دست آمده از نیشکر در سطوح مختلف تنش محتوای آب نسبی و رشد نسبی کالوس در سطوح بالای تنش خشکی کاهش یافتند (۱۴). در مطالعه بر روی کالوس‌های به دست آمده از جنین گندم دوروم با افزایش سطوح مختلف کلروز سدیم، سرعت رشد و رشد نسبی کالوس کاهش و درصد کلروز افزایش یافته است (۱).

همبستگی و روابط بین صفات مورد بررسی: نتایج حاصل از تجزیه همبستگی صفات اندازه‌گیری شده کالوس

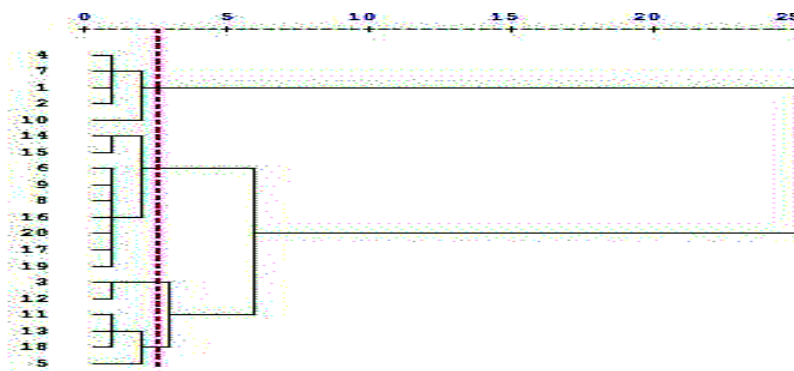
جدول ۴- ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه در کالوس حاصل از جنین بالغ

صفت	1	2	3	4	5	6
1- کلروز Chlorosis	1					
2-محتوای آب RWC	0.151	1				
3- رشد نسبی RFWG	-0.325	0.303	1			
4- سرعت رشد نسبی RGR	-0.170	0.373	0.820**	1		
5- شاخص تحمل INTOL	-0.068	0.232	0.802**	0.838**	1	
6- سرعت رشد CGR	0.825**	0.007	-0.602	-0.013	0.040	1

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

های ۵، ۱۳، ۱۱ و ۱۸ در گروه چهارم قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده ژنوتیپ‌های متحمل در گروه اول قرار داشتند. نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص نیز این گروه-بندی را صد در صد تأیید کرد. در مطالعه نتایج گروه بندی ژنوتیپ‌های گندم دوروم در کشت جنین بالغ و نابالغ تحت تنش شوری نشان داد که ژنوتیپ‌ها در چهار دسته قرار گرفتند و ژنوتیپ‌های زردک و شماره‌های ۲ و ۴ در گروه اول و به عنوان گروه متحمل معرفی شدند. این می‌تواند نشان از ارتباط تحمل به تنش شوری و خشکی در ژنوتیپ‌های زردک و شماره‌های ۲ و ۴ داشته باشد (۵).

دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها: از تجزیه خوشه‌ای، برای دسته‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌ها، به منظور پی بردن به فاصله ژنتیکی آنها و استفاده از تنوع موجود در آنها از نظر صفات مورد بررسی در برنامه‌های اصلاح نبات استفاده می‌شود. در این تحقیق، تجزیه خوشه‌ای به روش Ward بر روی صفات سرعت رشد، رشد نسبی، سرعت رشد نسبی، درصد محتوای آب، شاخص تحمل و درصد کلروز کالوس انجام شد. بر این اساس ژنوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم شدند (شکل ۲). ژنوتیپ‌های زردک شماره‌های ۲، ۴، ۷ و ۱۰ در گروه اول، ژنوتیپ‌های ۶، ۸، ۹، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۹ و ۲۰ در گروه دوم، ژنوتیپ‌های ۳ و ۱۲ در گروه سوم، ژنوتیپ



شکل ۲- نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه صفات اندازه‌گیری شده کالوس حاصل از جنین بالغ تحت تنش به روش Ward

نتایج تجزیه واریانس کالوس حاصل از جنین نابالغ: تجزیه واریانس صفات کالوس‌های بدست آمده از جنین های نابالغ کشت شده در محیط تنش در جدول ۵ ارائه شده است. تجزیه واریانس برای صفات مورد بررسی نشان داد که اثرات ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، سطوح مختلف خشکی و اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی معنی‌دار بودند.

جدول ۵- میانگین مربعات صفات اندازه‌گیری شده بر روی کالوس حاصل از جنین نابالغ تحت تنش خشکی

میانگین مربعات					درجات	منابع تغییرات
mean of squares					df	آزادی
درصد محتوای آب کالوس (RWC)	سرعت رشد کالوس (CGR)	رشد نسبی کالوس (RFWG)	سرعت رشد نسبی کالوس (RGR)	درصد کلروز کالوس (CH)		
0.014**	0.029**	0.226*	0.002**	0.685**	19	ژنوتیپ
0.426**	0.021*	6.229**	0.175**	9.564**	4	خشکی
1.003**	0.041*	18.768**	0.631**	37.341**	1	خطی (درجه 1)
0.094**	0.057**	0.867**	0.047**	0.267**	1	درجه 2
0.612**	0.013 ^{ns}	2.213**	0.025**	0.349**	1	درجه 3
0.011 ^{ns}	0.003 ^{ns}	3.071**	0.005 ^{ns}	0.291**	1	درجه 4
0.017**	0.015**	0.156*	0.008*	0.051*	76	ژنوتیپ × خشکی
0.009	0.013	0.124	0.017	0.037	200	Genotype*Drought Error
					299	Total کل
10.67	1.12	8.49	16.88	11.45		درصد ضریب تغییرات CV%

** : Significant at 1% probability level

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

درجه‌های دوم، سوم و چهارم معنی‌دار شدند. برای سرعت رشد نسبی (بر اساس وزن تر) کالوس و درصد محتوای آب کالوس روابط خطی، درجه‌های دوم و سوم با سطوح مختلف خشکی معنی‌دار بودند. در سرعت رشد کالوس

تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مختلف کالوس نشان دهنده وابستگی این صفات به نوع ژنوتیپ است. بین سطوح مختلف خشکی و رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) و درصد کلروز کالوس روابط رگرسیونی خطی،

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، سطوح مختلف خشکی و اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۶). بین سطوح مختلف خشکی و شاخص تحمل روابط رگرسیونی خطی، درجه دوم و سوم معنی‌دار بودند.

روابط خطی و درجه دوم معنی‌دار شد. نتایج به دست آمده در تجزیه واریانس صفات کالوس جنین‌های نابالغ تحت تنش خشکی با نتایج حاصل از کالوس‌های بالغ در همین مطالعه مطابقت داشت. تجزیه واریانس برای صفت شاخص تحمل کالوس (بر اساس وزن تر) نشان داد که بین

جدول ۶- میانگین مربعات شاخص تحمل کالوس حاصل از جنین نابالغ در سطوح مختلف تنش خشکی

میانگین مربعات	df	درجات آزادی	منابع تغییرات
0.504**	19		ژنوتیپ
5.602**	3		خشکی
17.43**	1		خطی (درجه 1)
2.73**	1		درجه 2
6.366**	1		درجه 3
0.098**	57		ژنوتیپ × خشکی
0.153	160		خطای آزمایشی
	239		کل
16.03			درصد ضریب تغییرات CV%

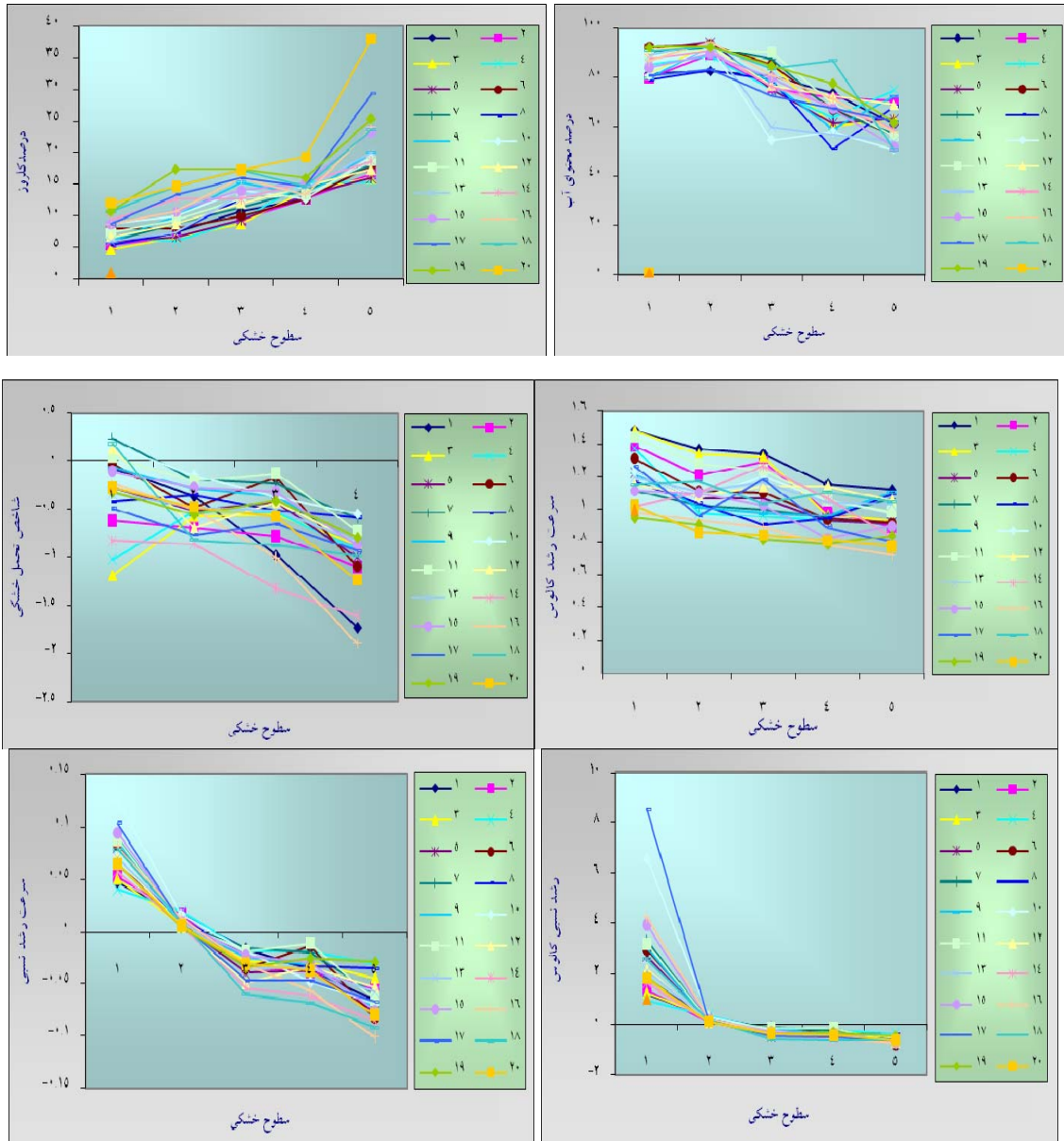
** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

مختلف تنش در طول دوره متفاوت بود. در آزمایشی که به منظور بررسی اثرات تنش خشکی بر کالوس‌های گلرنگ نشان داده شده است، با افزایش سطح خشکی محتوای آب نسبی کالوس، سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و شاخص تحمل کالوس کاهش می‌یابد (۴). در بررسی اثر تنش خشکی بر کالوس‌های ایجاد شده توسط کشت هیپوکوتیل در کلزای پاییزه مشخص گردید که با افزایش سطح تنش خشکی، محتوای آب نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس کاهش می‌یابد (۱۵). در مطالعه بر روی کالوس‌های به دست آمده از نیشکر در سطوح مختلف تنش خشکی نشان دادند که محتوای آب نسبی و رشد نسبی کالوس در سطوح بالای تنش خشکی کاهش می‌یابد ولی محتوای پرولین کالوس با افزایش تنش افزایش می‌یابد (۱۴). در بررسی اثر تنش خشکی بر کالوس‌های حاصل از کشت هیپوکوتیل کلزا با افزایش سطوح مختلف محتوای آب نسبی کالوس، سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و شاخص تحمل کالوس کاهش یافته است (۳). در بررسی

در مقایسه میانگین صفت درصد کلروز کالوس، ژنوتیپ‌های شماره ۲، ۳ و ۴ کمترین مقدار کلروز را در کالوس نشان دادند. ژنوتیپ‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۱۷ و ۱۸ بیشترین سرعت رشد را داشتند. با توجه به نتایج بدست آمده ژنوتیپ شماره ۴ دارای رشد نسبی کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس و سرعت رشد کالوس بالایی بود، پس می‌توان آن را در این آزمایش به عنوان ژنوتیپ متحمل‌تر نسبت به خشکی شناسایی کرد. نتیجه بدست آمده با نتایج حاصل از کالوس‌های به دست آمده جنین بالغ همین ژنوتیپ‌ها در مطالعه حاضر تا حدودی مطابقت داشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، صفات درصد کلروز کالوس، رشد نسبی کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس، محتوای آب کالوس، شاخص تحمل و سرعت رشد کالوس با افزایش سطوح مختلف خشکی کاهش معنی‌داری را از خود نشان دادند و نیز با افزایش غلظت پلی‌اتیلن گلیکول تا سطح ۲۰ درصد، درصد کلروز کالوس افزایش یافت (شکل ۳). واکنش ژنوتیپ‌ها به سطوح

نسبی و درصد محتوای آب کالوس کاهش و درصد کلروز کالوس افزایش را نشان می‌دهد (۲).

تنش خشکی بر روی کالوس‌های حاصل از جنین نابالغ گندم نان مشاهده گردید که با افزایش سطوح مختلف خشکی صفات سرعت رشد، رشد نسبی، سرعت رشد



شکل ۳- پاسخ بیست ژنوتیپ گندم دوروم از نظر صفات مورد بررسی کالوس حاصل از جنین نابالغ در سطوح مختلف خشکی

شرایط تنش خشکی همبستگی معنی‌دار داشت. به طوری که بین سرعت رشد کالوس و صفات رشد نسبی و سرعت رشد نسبی کالوس در شرایط تنش همبستگی مثبت و

همبستگی و روابط بین صفات مورد بررسی: نتایج تجزیه همبستگی صفات مورد مطالعه در جدول ۷ ارائه شده است. شاخص تحمل کالوس با درصد کلروز کالوس در

مشاهده شد که این نتایج با نتایج بدست آمده از کشت جنین بالغ در مطالعه حاضر بود.

معنی‌دار بود، همچنین بین رشد نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس در شرایط تنش همبستگی معنی‌داری

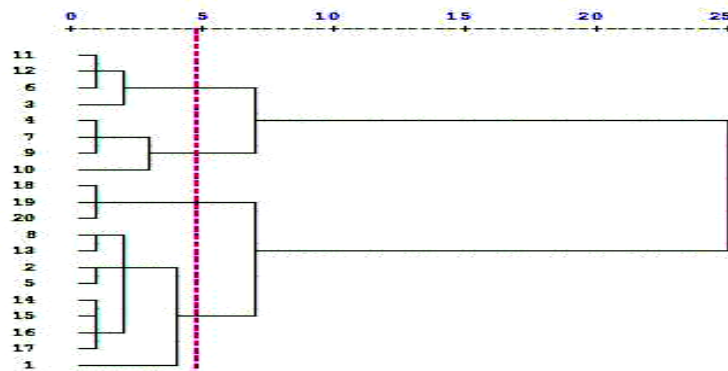
جدول ۷- ضرایب همبستگی بین صفات در شرایط تنش برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در کالوس حاصل از جنین نابالغ

صفت	۱	۲	۳	۴	۵	۶
1- درصد کلروز Chlorosis	1					
2- محتوای آب RWC	0.131	1				
3- رشد نسبی RFWG	-0.380	0.280	1			
4- سرعت رشد نسبی RGR	-0.229	0.202	0.767**	1		
5- شاخص تحمل INTOL	0.850**	0.014	-0.107	-0.450	1	
6- سرعت رشد CGR	-0.095	0.100	0.770**	0.794**	0.111	1

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

می‌باشد. به طوری که در گروه سوم ژنوتیپ‌های متحمل و گروه چهارم ژنوتیپ‌های حساس جای گرفتند. ژنوتیپ شماره ۴ در خوشه‌بندی بدست آمده از صفات کالوس حاصل از جنین بالغ و نابالغ به عنوان ژنوتیپ متحمل به خشکی شناسایی شد. این احتمالاً نشان‌دهنده مقاومت به خشکی این ژنوتیپ در شرایط درون شیشه می‌باشد.

دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها: بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در چهار دسته گروه‌بندی شدند (شکل ۴) که ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۵، ۸، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷ در گروه اول، ژنوتیپ‌های ۳، ۶، ۱۱ و ۱۲ در گروه دوم، ژنوتیپ‌های ۴، ۷، ۹ و ۱۰ در گروه سوم و ژنوتیپ‌های ۱۸، ۱۹ و ۲۰ در گروه چهارم قرار گرفتند. دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها در یک گروه بیانگر شباهت بیشتر آنها از نظر صفات مورد نظر



شکل ۴- نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه صفات اندازه‌گیری شده از کالوس حاصل از جنین نابالغ تحت تنش خشکی به روش Ward

معاونت مؤسسه تحقیقات دیم سرارود) به دلیل در اختیار گذاشتن بذره‌های این مطالعه تشکر و قدردانی می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای مهندس رضا محمدی (محقق

منابع

- ۱- ابراهیمی، ف. ۱۳۸۱. بررسی کالوس‌زایی و باززایی چندین رقم گندم ایرانی برای تحمل تنش شوری و خشکی از طریق کشت بافت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه مازندران.
- ۲- جمشیدی، ب. ۱۳۸۸. بررسی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌های مختلف گندم نان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه رازی.
- ۳- چقاقدی، ز. ۱۳۸۷. بررسی تحمل خشکی ژنوتیپ‌های کلزای پاییزه (*Brassica napus* L.). پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه رازی.
- ۴- سهیلی، ز. ۱۳۸۷. بررسی تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در طی تنش خشکی اعمال شده در گیاه گلرنگ به منظور تعیین ژنوتیپ‌های مقاوم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه رازی.
- ۵- عباسی تکیه، م. ۱۳۸۶. بررسی واکنش ژنوتیپ‌های گندم دوروم به القاء کالوس و تنش شوری در کشت جنین. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه رازی.
- ۶- کریمی، ح. ۱۳۷۱. گندم. انتشارات دانشگاه. ۵۸۸ صفحه
- 7-Aghajanlu, A. 1386. Evaluation seedling traits in different levels of drought stress and seedling traits and path analysis of some agronomic traits in winter wheat. *Journal of Sustainable Agriculture*. 2:16-27
- 8-AL-Khayri, J, M., AL-Bahrany, A.M. 2002. Growth, water content, and proline accumulation in drought stressed callus of date palm. *Biological Plantrum*. 48(1): 105- 108.
- 9-Almansouri, M., kinet. J. M., Lutts. S. 2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil*. 231: 243-254.
- 10-Barakat, M, N., Abdel-latif, T. H. 1996. *In vitro* selection of wheat callus tolerance to high levels of salt and plant regeneration. *Euphytica*. 91: 127-140.
- 11-Benderradgi, H. Bouzerzou, A. Djekoun, Yekhlef, N. and Benmahammed, A. 2007. Effects of NaCl stress on callus oroliferation and plant regeneration from mature embryos of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars Mahon Demias and Hidhab. *Plant Tissue Cult & Biotech*. 17: 19-27.
- 12-Biswas, J, B, Chowdhury., Bhattacharya, A. and Mandal, A. B, . 2002. *In vitro* screening for increased drought tolerance in rice. *Biol. plant*. 38: 525- 530.
- 13-Dragiiska, R., Djilianov. D. and Denchev, P. 1996. *In vitro* selection for osmotic tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *BULG. J. pant physiol*. 22 (3):30- 39.
- 14-Errabii, T., C.B. Gandonou., M, Essalmani., J, Abrini., M, Idaomar and N., Skali-Senhagi, .2006. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. *African Journal of Biotechnology*. 5(16):1488- 1493
- 15-Ghasempour, H. R., Zebarjadi, A.R. and Borjian, L. 2008. Molecular aspects of drought tolerance in five genotype of *Brassica napus* evaluated with callus cultures under stress. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). 17-22. Agust. Tampere. Fanland.
- 16-Golkar, P. A., Arzani, S. A. and Mirmohammadi meibodi, M, 1386. Callus induction and plant regeneration from immature embryo of wheat varieties. *Journal of Agricultural Sciences*. 9: 39-50
- 17-Kumar, De. K. 1997. Plant tissue culture. Department of Botany Barasat Covt. College. West Bengal.
- 18-Lazar, M. D., Chen, T.H.H., Scoles. G.Y., Kartha, K.K. 1987. Immature embryo and anther culture of chromosome addition lines of rye in Chinese spring wheat. *Plant Sciences*. 51:77-81.
- 19-Lutts, S., Almansouri, M. and Kinet, J.M. 2004. Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Science*. 167: 9-18.
- 20-Naqavi, M, R., Pvrshhbazy, A.Sh. and Talei, A. 1381. Diversity of durum wheat reserves for some agronomic and morphological characteristics. *Journal of Agricultural Science*. 4:81-90
- 21-Saleem, M. 2003. Response of durum and bread wheat Genotypes to drought stress: Biomass and yield components. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2: 290-293.
- 22-Swati, Z.A., Muhammad, I. and Haya taj, F. 2003. In situ & In vitro studies in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes for drought tolerance. Treatment of Pant Breeding and Genetic Faculty of Crop Production Science. pp 197.
- 23-Tabatabai Oghdaie, S.R. 1383. The use of biotechnology in breeding for resistance to osmotic stress in plants. 14

24-Turhan, H. and Baser, I. 2004. *In vitro* and *In vivo* water stress in sunflower (*Helianthus annuus*

L.). *Helia*. 27:227- 236.

***In vitro* Evaluation of Drought Tolerance in Durum Wheat Genotypes (*Triticum durum* L.)**

Akbari L.¹, Cheghamirza K.^{1,2} and Farshadfar E.^{1,2}

¹Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

²Research Group of Biotechnology for Drought Resistance, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

The response of twenty genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum) to drought stress was assessed via *in vitro* mature and immature embryo culture. The reaction of derived calli to drought stress was evaluated in Murashige and Skoog (MS) medium containing different concentration of PEG 6000 (0, 50, 100, 150 and 200 g/l), using a 20×5 factorial experiment based on completely randomized design with three replications. The traits including, callus growth rate, relative fresh weight growth, relative growth rate, water content, tolerance index and chlorosis percentage under stress condition were studied. There were significant differences among genotypes concerning all the traits and response of genotypes to drought different levels. Cluster analysis of the mature or immature embryo cultures classified the genotypes into four groups, but the result of classification for each group of mature and immature embryo cultures were in different manner. Base on the results, the genotype No. 75-5-3-5 showed relative fresh weight growth, relative growth rate and water content and lowest chlorosis percentage. Furthermore, this genotype showed the most tolerant to drought stress. Therefore, it may be used as a drought tolerant genotype in plant breeding programs.

Key words: embryo culture, drought tolerance, durum wheat.