Razi University

Cereal Biotechnology and Biochemistry

Online ISSN: 2783-5170

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

# Investigation Callus Induction and Regeneration via Immature Embryo Culture to *in vitro* in Durum Wheat

**Leila Akbari[1] ✉, Kianoosh Cheghamirza[1,2] & Ezzatolah Farshadfar[1]**

[1] Department of Plant Production and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran.

[2] Cereal Research Center, Razi University, Kermanshah, Iran.

✉ Corresponding author. E-mail: l.akbari@razi.ac.ir

## ABSTRACT

**Introduction:** Durum wheat is known as the eighth agricultural product in the world and is used for spaghetti and pasta. In many studies, in vitro cultivation methods have been used a lot to shorten breeding periods. The use of different explants in the production of wheat embryo callus is known as the best explant in the production of callus. Plant regeneration from callus is also a complex morphogenetic phenomenon that can be affected by various internal and external factors.

**Materials and methods:** An experiment was conducted to study callus induction and regeneration of immature embryos with 11 genotypes of durum wheat. In the callus induction stage, two characteristics, callus induction, and callus growth rate based on the completely randomized design with five replications were measured. Callus derived from an immature embryo was conducted in MS medium containing BAP (0.5, 1 and 1.5 g/l) using an 11*3 factorial experiment based on the completely randomized design with three replications.

**Results:** Statistical analysis results in the callus induction stage showed a significant difference in the percentage of callus induction and callus growth rate among genotypes. Mean comparison results indicated that in the callus growth rate of genotypes, respectively Stj3//Bcr/lks4 and Quadalete//Erp/mol/3/unk/4/Mrb3/Mnal, had the fastest growth rate and at percentage callus induction genotype 25-25-1-5 showed the highest induction. In the regeneration phase with different concentrations of BAP growth regulator, genotypes 409 and Stj3//Bcr/lks4 showed the highest regeneration. Therefore, based on the results obtained in this study, Genotype Stj3//Bcr/lks4 was introduced as the best genotype among others due to giving the highest callus induction and regeneration.

**Conclusion:** Therefore, according to the availability of wheat embryos, it can be considered a suitable source in tissue culture through independent factors, which are located in the nucleus or cytoplasm. According to the results, it could be stated that the success in tissue culture is influenced by various factors such as genotype, type of micro sample, and concentration of growth regulators, which differs from one cultivar to another.

**Keywords:** Callus induction, Durum wheat, Growth Regulator, Immature embryo, Regeneration.

**Article Type:** Research Article

**Article history: Received:** 27 Mar 2023, **Revised:** 10 May 2023, **Accepted:** 16 Jun 2023, **Published online:** 22 Jun 2023

**Cite this article:** Akbari, L., Cheghamirza, K. & Farshadfar, E. (2023). Investigation Callus Induction and Regeneration via Immature Embryo Culture to *in vitro* in Durum Wheat. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, *2*(2), 209-220. DOI: 10.22126/cbb.2023.9186.1045

© The Author(s).

**Publisher:** Razi

10.22126/cbb.2023.9186.1045

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

# بررسی القاء و باززائی کالوس کشت جنین نابالغ در شرایط درون شیشه‌ای گندم دوروم

لیلا اکبری[۱]✉، کیانوش چقامیرزا[۱و۲] و عزت‌اله فرشادفر[۱]

[۱] گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه ایران.

[۲] مرکز تحقیقات غلات، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

✉نویسنده مسئول. رایانامه: l.akbari@razi.ac.ir

## چکیده

**مقدمه:** گندم دوروم به عنوان هشتمین محصول مورد کشت در دنیا جهت تولید اسپاگتی و ماکارونی کاربرد زیادی دارد. هم چنین از روش‌های کشت درون شیشه‌ای در مطالعات زیادی جهت کوتاه کردن دوره‌های اصلاحی استفاده زیادی شده است. جنین نابالغ گندم به عنوان بهترین ریزنمونه در استفاده از ریزنمونه‌های مختلف گیاه گندم در تولید کالوس شناخته شده است. باززائی گیاه از کالوس نیز یک پدیده مورفوژنتیکی پیچیده است که تحت تأثیر عوامل مختلف داخلی و خارجی قرار می گیرد.

**مواد و روش‌ها:** به منظور بررسی القای کالوس از جنین نابالغ آزمایش بر اساس طرح پایه کاملاً تصادفی در پنج تکرار و با ۱۱ ژنوتیپ گندم دوروم و برای مرحله باززائی از کالوس نیز آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور ژنوتیپ (۱۱ سطح) و غلظت‌های متفاوت هورمون بنزیل آمینوپورین در (سه سطح) در سه تکرار اجرا گردید.

**یافته‌ها:** تجزیه‌های آماری صفات درصد القای کالوس، سرعت رشد (CGR) و درصد باززائی کالوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج در مرحله کالوس‌زائی جنین نابالغ نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از نظر درصد القای کالوس و سرعت رشد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در باززائی نیز بین ژنوتیپ‌ها و سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی از نظر درصد باززائی نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد($P\leq\%1$). نتایج مقایسه میانگین نیز نشان داد که برای صفت سرعت رشد کالوس به ترتیب ژنوتیپ های Stj3//Bcr/lks4 و Quadalete//Erp/mol/3/unk/4/Mrb3/Mnal بیشترین سرعت رشد و برای درصد القاء کالوس ژنوتیپ 5-1-25-25 بیشترین میزان القاء را نشان دادند. در مرحله باززائی نیز با بررسی سه غلظت متفاوت تنظیم کننده رشد گیاهی بنزیل آمینو پورین و تأثیر آن بر باززائی کالوس، ژنوتیپ‌های 409 و Stj3//Bcr/lks4 بیشترین و ژنوتیپ 5-1-25-25 کمترین درصد باززائی را نشان دادند. بنابراین بر اساس نتایج به‌دست آمده ژنوتیپ Stj3//Bcr/lks4 در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به علت دارا بودن میزان کالوس‌زائی و باززائی بیشتر به عنوان ژنوتیپ برتر در بین ژنوتیپ‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای شناسائی گردید.

**نتیجه‌گیری:** بنابراین با توجه به در دسترس بودن جنین گندم می‌توان آن را به عنوان یک منبع مؤثر در کشت بافت از طریق عوامل غیر وابسته که ممکن است در هسته یا سیتوپلاسم قرار گرفته به حساب آورد. طبق نتایج می‌توان بیان داشت که موفقیت در کشت بافت تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل ژنوتیپ، نوع ریز نمونه و غلظت تنظیم کننده‌های رشد می‌باشد که از نحوه پاسخ‌دهی از رقمی به رقم دیگر نیز متفاوت است.

**واژه‌های کلیدی:** القاء کالوس، باززائی، تنظیم کننده رشد گیاهی، جنین نابالغ، گندم دوروم.

**نوع مقاله:** مقاله پژوهشی

**نوع مقاله: دریافت:** ۱۴۰۲/۰۱/۰۷ **اصلاح:** ۱۴۰۲/۰۲/۲۰ **پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۳/۲۶، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

**استناد**: اکبری، ل.، چقامیرزا، ک. و فرشادفر، ع. (۱۴۰۲). بررسی القاء و باززائی کالوس کشت جنین نابالغ در شرایط درون شیشه‌ای گندم دوروم. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۳(۲)، ۲۰۹-۲۲۰. DOI: 10.22126/cbb.2023.9186.1045

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

CC BY NC

**مقدمه**

گندم آلوتتراپلوئید دوروم یکی از گونه‌های متنوع گیاهی است که برای تولید ماکارونی و اسپاگتی در سطح جهان کشت داده می شود از دیدگاه اقتصادی برای بیشتر کشورها حائز اهمیت است. در کشور ما به دلیل این‌که ۲۰۰۰ سال قبل از گندم نان اهلی شده، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (Karimi, 1992). هم‌چنین با توجه به اینکه غذای عمده ۴۰ کشور در دنیا محسوب می‌شود که جوابگوی ۳۵ درصد جمعیت دنیاست. بر اساس گزارشات در کشت سلول یا بافت گیاهی، امکان تولید انواع تنوعات ژنتیکی و غیر ژنتیکی فراهم می‌گردد (Kahrizi *et al.*, 2005). کشت جنین یکی از روش‌های بیوتکنولوژی است که از مدت‌ها پیش در اصلاح نباتات برای تولید گیاهان هیبرید بین گونه‌ای یا بین جنسی بکار برده شده است. روش‌های درون شیشه‌ای در مطالعات زیادی جهت کوتاه کردن دوره‌های اصلاحی به کار برده شده‌اند (Grigoryeua *et al.*, 2006).

اندام‌های مریستمی نسبت به اندام‌های بالغ جهت القاء کالوس خیلی مناسب‌تر هستند (Ahmadian *et al.*, 2006). جنین های نابالغ منبع ریز نمونه مناسبی برای القاء کالوس و جنین زائی سوماتیکی در غلات می‌باشند. در نتایج حاصل از بررسی واکنش ارقام مختلف گندم نان و گندم دوروم به القاء کالوس و توانائی باززائی مشخص گردید که فرآیندهای مورفوژنتیک بوسیله‌ی ژنوتیپ تعیین می‌شود. در باززائی حاصل از کشت بخش‌های گوناگون گندم مانند جنین‌های بالغ و نابالغ، آندوسپرم، برگ‌ها و قسمت های فوقانی ساقه و ریشه بیان شده است که در میان این کشت‌ها، کشت جنین نابالغ برای کالوس-زائی و باززائی مطلوب‌تر بوده است (Arzani *et al.*, 1998). کالوس‌های به‌دست آمده از جنین نابالغ گندم دوروم را تحت تأثیر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی متفاوت قرار داده‌اند. ارقام مورد مطالعه در محیط‌های متفاوت از لحاظ القاء کالوس مقایسه شده‌اند و حداکثر کالوس‌دهی در محیط کشت پایه MS با دو میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D بوده است. در بررسی تأثیر تیمارهای دمائی بر باززائی کالوس‌های حاصل از کشت جنین نابالغ جو، محیط کشت حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D حداکثر کالوس‌زائی و محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D حداکثر باززائی را به دست آمده است. در واکنش ارقام گندم نان از لحاظ القاء کالوس و باززائی در کشت جنین نابالغ در شرایط *in vitro*، محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک دهم میلی‌گرم در لیتر Kinetin مورد ارزیابی قرار گرفته و حداکثر القای کالوس با یک میلی‌گرم در لیتر IAA و حداکثر باززائی با یک میلی‌گرم در لیتر BA به دست آمده است (Golkar *et al.*, 2005). برای القاء کالوس محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D را درکشت جنین های نابالغ ذرت معرفی گردید (Hamdy *et al.*, 2002). در کشت جنین‌های بالغ و نابالغ دوازده ژنوتیپ گندم نان و دو ژنوتیپ گندم دوروم حداکثر القاء کالوس را در محیط حاوی دو و نیم‌میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D گزارش کردند. فاکتورهایی مانند ژنوتیپ گیاه مادر، غلظت‌های

متفاوت از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، انواع ریز نمونه، اندازه آن‌ها، محیط کشت و شرایط کشت در فرآیند باززائی توسط مؤثرشناخته شده‌اند ( Pellegrineschi *et al*., 2004). بر اساس نتایج به‌دست آمده اختلاف معنی داری در بین ژنوتیپ های مورد بررسی از لحاظ ظرفیت باززائی وجود داشته است (Mirodjagh *et al*., 1998). با توجه به نتایج به‌دست آمده در محیط های کشت حاوی غلظت‌های هورمونی مختلف واکنش‌های متفاوتی به القای کالوس در ژنوتیپ‌های یولاف مشاهده شده است. محیط کشت MS حاوی دو میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مؤثر برای کالوس‌زائی و محیط حاوی یک دهم میلی‌گرم IAA و دو میلی‌گرم در لیتر BA برای باززائی مناسب شناخته شده‌اند (Ihsanshah *et al*., 2002). با توجه به بررسی شرایط مناسب کشت برای کالوس‌زائی خویشاوندان وحشی نیشکر، نتایج نشان داده است که ژنوتیپ‌ها واکنش های متفاوتی در ترکیبات هورمونی مختلف از خود نشان می‌دهند. در بررسی القای کالوس ژنوتیپ‌های گندم نان در محیط کشت پایه حاوی 2,4-D حداکثر کالوس‌زائی و در محیط حاوی یک‌دهم میلی‌گرم در لیتر IAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP حداکثر باززائی به دست آمده است (Bennacear, 2000). در بیان نتایج تمامی فاکتورهای موجود در شرایط کشت (نور، رطوبت، دما، ترکیب هورمونی، مواد معدنی و ...) جهت القاء کالوس مؤثر هستند (Ruiming *et al*., 2008). در میان گندم‌های دیپلوئید و تتراپلوئید، تریتیکوم دوروم به القاء کالوس واکنش بیشتری از خود نشان داده است. محیط کشت MS حاوی غلظت‌های مختلف از هورمون اکسین بر رشد کالوس‌ها موٌثر است و با افزایش غلظت اکسین وزن تر کالوس‌ها نیز کاهش پیدا کرده است ( Sarker & Biswas., 2009). میزان تنظیم کننده رشد در القاء کالوس، سرعت رشد کالوس و میزان باززائی گیاهچه از کالوس مؤثر شناخته شده است (Swart *et al*,. 2007). بر اساس مشاهدات در محیط کشت MS با غلظت‌های متفاوت هورمون 2,4-D در ایجاد کالوس چهار رقم گندم بهاره حداکثر تعداد کالوس در محیط حاوی شش میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بوده است (Rahman *et al*., 2008). محیط کشت پایه حاوی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون kinetin جهت باززائی دابل هاپلوئیدهای جنین نابالغ گندم معرفی شده است(Inagaki, 1986). در استفاده از محیط‌های کشت پایه حاوی غلظت‌های متفاوت هورمون در باززائی کالوس حاصل از کشت جنین نابالغ گندم محیط MS حاوی ویتامین‌ها به همراه یک‌دهم میلی‌گرم در لیتر 2,4-D جهت باززائی مناسب‌تر بوده و تفاوت در بین نتایج ناشی از اثر ژنوتیپ است. غلظت‌های متفاوتی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در محیط کشت MS حاوی سه و نیم میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D جهت کالوس‌زائی و محیط کشت پایه حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه یک میلی‌گرم در لیتر IAA جهت باززائی مناسب شناخته شده‌اند (Ihsan shah *et al*., 2003). از آنجائی‌که شناسائی و کاربرد ژنوتیپ هائی که واکنش مطلوبی به کشت بافت نشان می‌دهند در برنامه‌های به‌نژادی دارای اهمیت بسزائی می‌باشد. لذا هدف بررسی القای کالوس و

بازززائی کالوس حاصل از کشت جنین نابالغ ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم در شرایط درون شیشه ای بود.

**مواد و روش‌ها**

به منظور کالوس‌زائی جنین‌های نابالغ از طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار و برای مطالعه میزان باززائی از کالوس‌های حاصل از جنین نابالغ آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور ژنوتیپ ( ۱۱سطح) و هورمون BAP در سه سطح (۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و مقدار یک میلی گرم در لیتر هورمون IAA در سه تکرار استفاده شد.

**جدول۱- ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در بررسی کالوس‌زائی و باززائی جنین های نابالغ گندم دوروم**

**Table 1- Durum genotypes used for study of callus induction and regeneration from immature embryo**

| کد ژنوتیپ | ژنوتیپ |
|---|---|
| 1 | 25-25-1-5 |
| 2 | 409 |
| 3 | 259 |
| 4 | 240 |
| 5 | Heider/Mt/Ho |
| 6 | Syrian – 4 |
| 7 | Waha- B53 |
| 8 | Grdara-2 |
| 9 | Aghrass-2 |
| 10 | Quadalete//Erp/mol/3/unk/4/Mrb3/Mnal |
| 11 | Stj3//Bcr/lks4 |

**صفات بررسی شده در آزمایش کشت جنین و باززائی کالوس**

**درصد القاء کالوس**

به منظور مطالعه کالوس‌زائی جنین‌های نابالغ گندم دوروم در هر پتری دیش حاوی محیط کشت MS تعداد ۱۰ نمونه قرار داده شد و سپس در شرایط تاریکی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۸ روز در اتاق کشت نگه‌داری شدند. درصد القای کالوس چهار هفته بعد از کشت جنین از طریق شمارش تعداد کالوس‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفت.

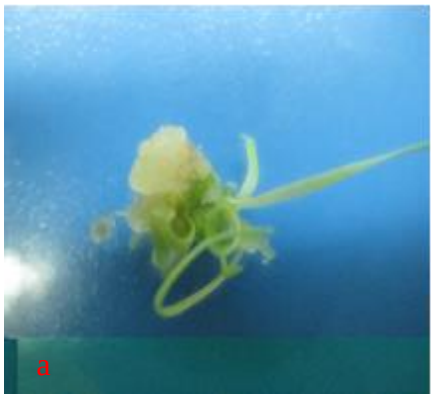
**سرعت رشد کالوس[1] (میلی‌متر قطر در روز)**

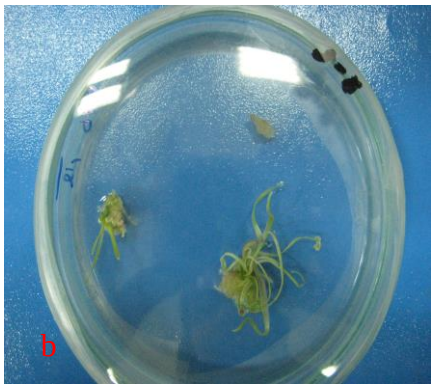
قطر کالوس‌های حاصل در ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از کشت جنین مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. برای محاسبه‌ی قطر کالوس به کمک کاغذ میلی‌متری، طول و عرض کالوس‌ها اندازه‌گیری شد و سپس در هم ضرب شده و از

[1] Callus growth rate

آن جذرگرفته 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 (Golkar *et al*., 2005).

زمان / میانگین قطر کالوس = سرعت رشد کالوس




**شکل ۱- باززائی کالوس حاصل از کشت جنین نابالغ گندم دوروم**

**Figure 1- Callus regeneration derived from immature embryo culture in durum wheat**

**باززائی گیاهچه از کالوس حاصل از جنین نابالغ**

به منظور باززائی، کالوس‌های حاصل پس از چهار هفته به محیط کشت باززائی MS حاوی هورمون‌های رشد BAP و IAA منتقل و سپس محیط های حاوی کالوس در اتاقک رشد تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند، کالوس‌های باززا شده ۴-۲ هفته بعد از انتقال به اتاقک رشد، شمارش و مشاهدات یادداشت برداری گردید( شکل ۱).

**محاسبات و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها**

تجزیهٔ واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل دامنه‌های معنی‌دار دانکن در سطح احتمال یک درصد، به کمک نرم‌افزارهای آماری MSTATC و SAS انجام شد، تبدیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام شد.

**نتایج و بحث**

نتایج تجزیه واریانس صفات کالوس‌زائی جنین‌های نابالغ گندم دوروم در جدول (۲) ارائه شده است. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات درصد القای کالوس و سرعت رشد کالوس اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت باززائی نشان داد که بین ژنوتیپ های مورد مطالعه و سطوح مختلف هورمون BAP از نظر درصد باززائی اختلاف بسیار معنی‌دار بود. با

توجه به کمی بودن هورمون BAP سطوح آن به درجات (جدول۳).

رگرسیونی تفکیک گردید و اثرات مختلف محاسبه شد

**جدول ۲- میانگین مربعات صفات اندازه‌گیری شده بر روی کالوس حاصل از جنین نابالغ گندم دوروم**

**Table 2- Mean of squares for measured traits on immature embryo callus in durum wheat**

| منابع تغییرات Source of variations | درجات آزادی degrees of freedom | میانگین مربعات mean of square | |
|---|---|---|---|
| | | درصد القاء کالوس(callus induction) | سرعت رشد کالوس(callus growth rate) |
| ژنوتیپ Genotype | 10 | 0.013** | 0.001** |
| اشتباه آزمایشی Error | 44 | 0.007 | 0.000 |
| کل Total | 54 | | |
| درصد ضریب تغییرات CV% | ---- | 4.54 | 5.84 |

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**: Significant at 1% probability level

در بررسی اثر هورمون BAP در مرحله باززائی بر روی کالوس حاصل از جنین بالغ گندم دوروم نشان داده‌اند که اثر متقابل بین ژنوتیپ و سطوح مختلف هورمون معنی‌دار نگردیده است. این می‌تواند نشان دهد که سطوح مختلف هورمون در تمامی ژنوتیپ‌ها دارای رفتار مشابهی بوده است.

**جدول ۳- تجزیه واریانس صفت باززائی بر روی کالوس حاصل از جنین نابالغ**

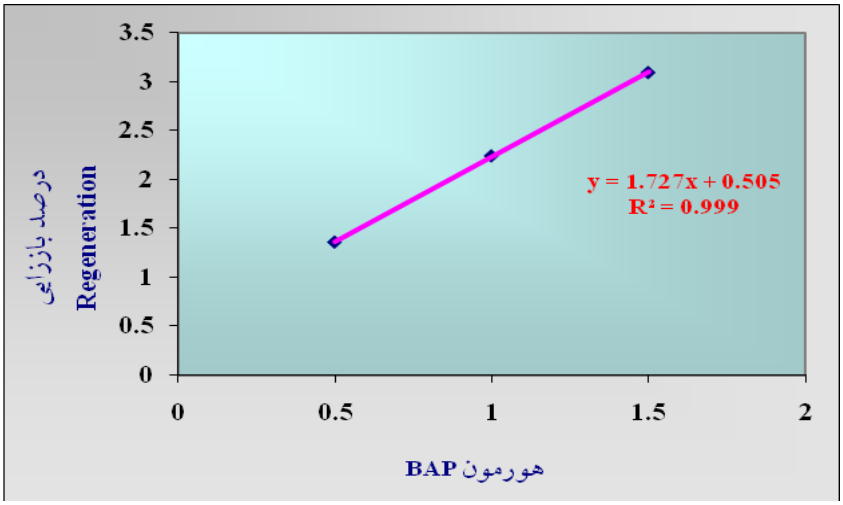
**Table 3- Mean of squares for regeneration trait on immature embryo callus in durum wheat**

| منابع تغییرات Source of variations | درجات آزادی df | میانگین مربعات Mean square |
|---|---|---|
| ژنوتیپ Genotype | 10 | **0.005 |
| هورمون Hormone | 2 | **0.031 |
| خطی linear | 1 | 0.062** |
| ژنوتیپ × هورمون Genotype*Hormone | 20 | 0.001ns |
| اشتباه آزمایشی Error | 66 | 0.001 |
| کل Total | 98 | |
| درصد ضریب تغییرات CV% | 2.36 | |

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، **ns** غیرمعنی‌دار

**Significant at 1% probability level , not significant

تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها از نظر درصد باززائی نشان دهنده وابستگی این صفت به ژنوتیپ می‌باشد. بین درصد باززائی و سطوح مختلف هورمون رابطه خطی معنی‌دار گردید، با افزایش سطح هورمون تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر میزان باززائی افزایش نشان داد (شکل۲).

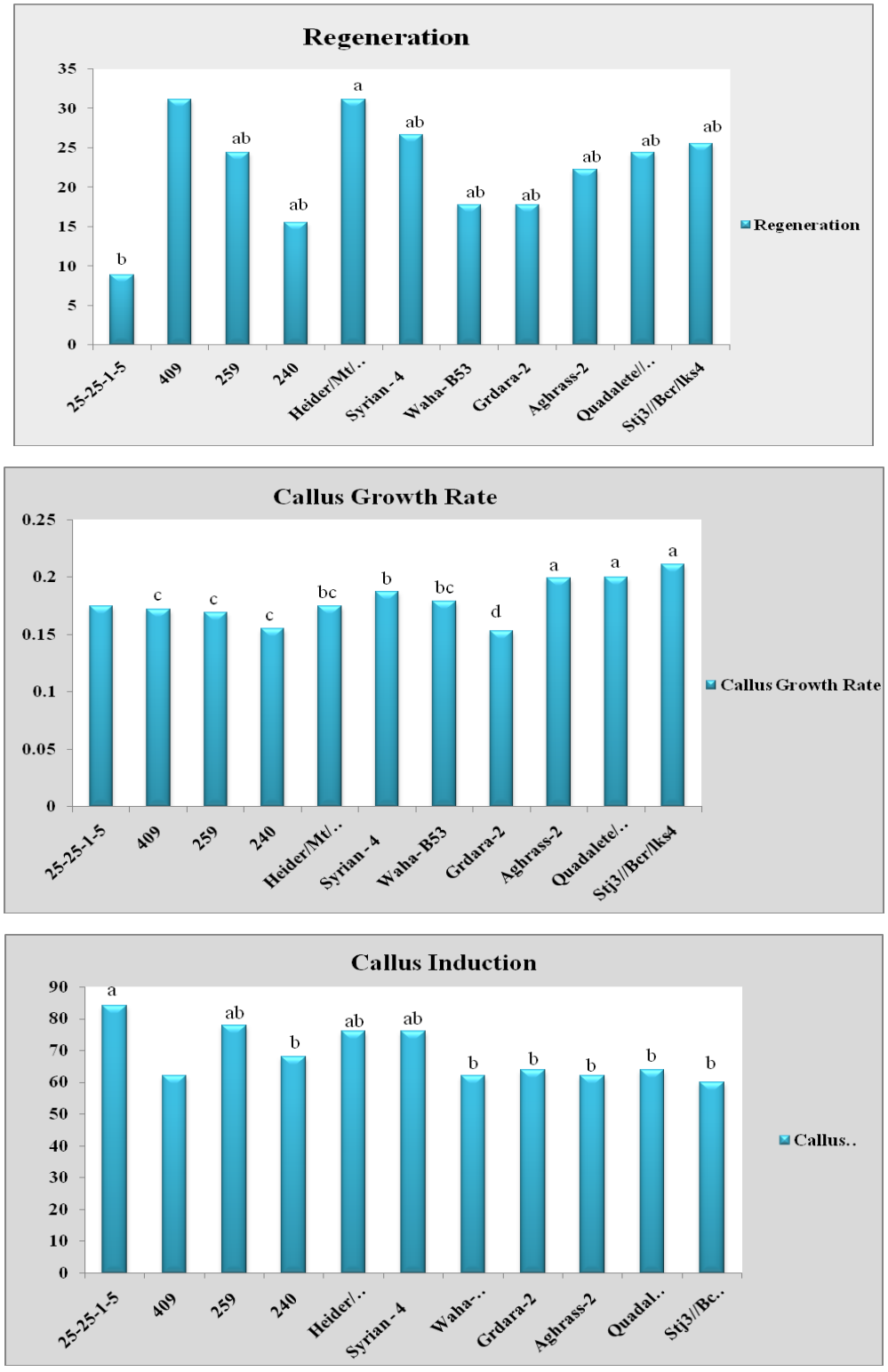



**شکل ۲- نمودار رگرسیون درصد باززایی کالوس**

**Figure2- Regression plot of callus regeneration**

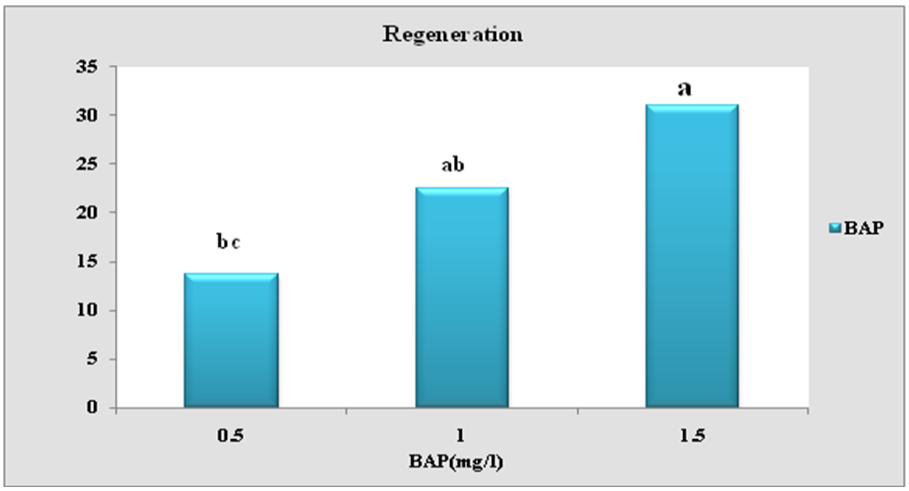
**مقایسه میانگین کالوس‌زائی و باززائی در کشت جنین نابالغ گندم دوروم**

با وجود اینکه در نتایج حاصل از ANOVA اثرات اصلی معنی‌دار و اثر متقابل بین ژنوتیپ و هورمون از نظر صفت درصد باززائی در مرحله باززائی کالوس معنی‌دار نگردیده است، در روش مقایسه میانگین چند دامنه‌ای به روش دانکن میان ژنوتیپ‌ها و هورمون اختلاف مشاهده گردیده است، می‌توان چنین بیان داشت که این نوع تفاوت از نوع اختلاف در مقدار است نه از نوع اختلاف در جهت، بنابراین با توجه به نتایج می‌توان اثرات اصلی را مورد مقایسه میانگین قرار داد. مقایسه میانگین بین ژنوتیپ-های مورد مطالعه از نظر درصد باززائی نشان داد که ژنوتیپ های 409 و Heider/Mt/Ho بالاترین میزان باززائی و ژنوتیپ شماره 5-1-25-25 کمترین میزان باززائی را دارا بودند. در صفت درصد القای کالوس ژنوتیپ 5-1-25-25 و 259 بیشترین و ژنوتیپ Stj3//Bcr/lks4 کمترین درصد القای کالوس را دارا بودند. بیشترین سرعت رشد مربوط به ژنوتیپ Stj3//Bcr/lks4 و ژنوتیپ Grdara-2 دارای کمترین سرعت رشد بودند (شکل۳). مقایسه میانگین بین سطوح مختلف هورمون BAP نشان داد که با افزایش سطح هورمون میزان باززائی افزایش یافت. سطح هورمون ۱/۵ میلی گرم در لیتر بیشترین باززائی و مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کمترین باززائی را نشان داد(شکل ۴).




**شکل ۳ - نمودار مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های گندم دوروم از نظر صفات باززائی و کالوس‌زائی حاصل از کشت جنین نابالغ**

**Figure3- Mean comparison of wheat durum genotypes in callus induction from immature embryo culture**




**شکل ۴- مقایسه میانگین درصد باززائی سطوح مختلف هورمونBAP برای درصد باززائی**

**Figure 4- Mean comparison of BAP growth regulator levels for percentage of regeneration**

تنوع موجود بین ژنوتیپ ها از نظر صفات مختلف بیانگر وابستگی این صفات به نوع ژنوتیپ است. در مطالعه کالوس حاصل از جنین ارقام گندم دوروم نشان داده شده است که صفاتی، همچون درصد القای کالوس، وزن تر کالوس و درصد باززائی آن‌ها تحت تأثیر نوع ژنوتیپ می-باشد و نیز القاء و باززائی تحت تأثیر ژنوتیپ، منبع ریز نمونه، منشأ جغرافیائی، محیط کشت و اثر متقابل بین آن‌ها است. باززائی و القای کالوس به ژنوتیپ گیاه مورد مطالعه وابسته است (Nasircilar *et al*., 2006). بر اساس گزارشاتبین درصد القای کالوس با وزن کالوس و بین درصد باززائی و تعداد گیاه ایجاد شده همبستگی معنی داری مشاهده نگردیده است (Birsin *et al*., 2007). افزایش موفقیت کارائی در باززائی توسط فاکتورهائی مانند ژنوتیپ‌ها، ترکیب محیط کشت، شامل تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، شرایط کشت تحت کنترل است. فراونی القای کالوس از ۹۰- ۸۵ درصد در بین ژنوتیپ ها متفاوت و وابسته به ژنوتیپ و هورمون متفاوت می باشد. باززائی و القای کالوس تحت کنترل شرایط ژنتیکی می‌باشد، باززائی گیاهان توسط چند فاکتور ژنتیکی کنترل می‌گردد. به طور کلی ظرفیت باززائی به کیفیت جنین و وراثت پذیری آن وابسته است. سرعت القای کالوس و ظرفیت باززائی از یکدیگر مستقل هستند (Ozgen *et al*., 1998). در نتایج به دست آمده نیز بین درصد باززائی با درصد القای کالوس همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد. عدم حضور رابطه معنی‌دار بین فراوانی القای کالوس و باززائی کالوس می تواند بیانگر این موضوع باشد که این دو خصوصیت از لحاظ ژنتیکی مستقل از هم می‌باشند. به طور قوی ژنوتیپ در القای کالوس تأثیر بسیار زیادی می‌گذارد. همبستگی‌های غیر معنی‌دار به دست آمده در بین واکنش‌های مختلف به کشت نشان دهنده آن است که ممکن است توسط ژن‌های متفاوتی یا تغییرات ژنی متعدد کنترل شود. جنین همراه با آندوسپرم یک ماده ژنتیکی

مناسب را برای مطالعات انتقال ژن فراهم کرده است، انتقال ژن های متعدد به گندم از طریق تکنیک‌های مهندسی ژنتیک به گسترش سیستم‌های باززائی درون شیشه‌ای کارآمد نیازمند است (Kourda *et al*., 1998).

**نتیجه‌گیری**

بنابراین با توجه به دسترس بودن جنین بالغ گندم در طول سال می‌توان آن را بعنوان یک منبع مؤثر در کشت بافت از طریق عوامل غیر وابسته که ممکن است در هسته یا سیتوپلاسم قرار گرفته به حساب آورد. باززائی گیاه از طریق فاکتورهای ژنتیکی کنترل می‌شود. تفاوت مشاهده شده در بین ژنوتیپ‌ها را ناشی از تأثیر هورمون‌های داخلی دانسته که احتمالاً خود تحت کنترل یک و یا تعداد بیشتری ژن می‌باشد. بنابراین با افزایش میزان هورمون BAP در محیط کشت باززائی درصد باززائی افزایش می‌یابد. نتایج به‌دست آمده با نتایج سایرین مبنی بر اینکه درصد باززائی وابسته به ژنوتیپ بوده مطابقت داشت.

**References**


Afridi, S., Imran, M., Hassan, S., Swati, Z, A., Shah, S, H. 2002. Callogenesis and plant regeneration in sugarcane. ScientificKhyber. 15(2):37-34

Ahmadian Tehrani, P., Amiri, M., Fazelzadeh, A. 2006. Effect of temperature treatment on callus regeneration in cultured immature embryos of various barley genotypes. Journal of Agricultural Science. 37-1(3): 521-529.

Arzani, A,. Myrodjagh, Sh.1998. Regeneration from immature embryo response of durum wheat varieties. Journal of Agricultural Science. 2(3): 61-70.

Bennacear, M. 2000. Callus formation and plant regeneration from young wheat spikes: Effect of genotypes. CIHEAM - Options Mediterraneennes. 40: 121-124.

Birsin, A, M., Onde, S,. Ozgen, M. 2007. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of oat (*Avena sativa* L.). Turk J Biol.25:427- 437.

Fazeli-Nasab, B., Omidi, M., Amiritokaldani, M. 2012. Callus induction and plant regeneration of wheat mature embryos under abscisic acid treatment. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 4(1): 17-23

Golkar, P,. Arzani, A,. Mirmohammadi S, E, meibodi, M. 2005. Evaluation callus induction and plant regeneration from immature embryos of wheat. Journal of Agricultural Science. 9(1): 39-50

Grigoryeva, L. P., Shletser, I. A. 2006. Screening wheat cultures for morphogenesis ability in immature embryo *in vitro*. Biologe 30-41.

Hamdy, M., Areff, EI. 2002. Employment of maize immature embryo culture for improving drought tolerance. Proceeding of the $3^{rd}$ Scientific Conference Agriculture Sciences, Fac of Agric. Assiut Univ., Assiut, Egypt. 463- 477.

IhsanShah, S., Swati, S. 2002. Genotype and hormonal effect on callus formation and regeneration in oat. Agric. 18(3):295-298.

IhsanShah, M., M, Jabeen., I, Ilahi. 2003. *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) var.lu-26s. Pak. J. Bot. 35(2): 209-217.

Inagaki, M.1986. Callus induction and plant regeneration from immature haploid embryos of wheat. J. Breed. 36:49-53.

Karimi, H. 1992. Wheat. Academic Publishing Center.

Kahrizi, D,. Arminian, E,. Masumi asl,. A. 2005. *In vitro* plant breeding. Razi University Press.

Kourda, S,. Kato, H,. Ikeda, R. 1998. Heterosis and combining ability for callus growth rate in rice. Crop Science. 38: 333-336

Mirodjagh, S, Sh., Arzani, A. 1998. Study of plant regeneration from immature embryo culture in durum wheat (*Triticum turgidium* var. durum) cultivars. J. Agric. Sci & Nat. 2(3): 71-79.

Nasircilar, G., Turgut, K., Fiskin, K. 2006. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. Pak. Bot. 38(2): 637-645.

Ozgen, M, Turret, M,. Ozcan, S., Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryo of winter durum wheat genotypes. Plant Breed. 115(6):455-458.

Ozgen, M,. Turet, M,. Altinok, S,. Sancak, C. 1998. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (Triticum aestivum L.) genotypes. Plant Cell. 18: 331-335.

Pellegrineschi, A., Brito, R, M., Mclean, S., Hoisington, D. 2004. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 77: 245-250.

Rahman, M, M., Shams Uddin, A, K, M., Asad., A. 2008. *In vitro* regeneration from mature embryos in spring wheat. Crop Prod. 3(2):76- 89.

Ruiming, B, T., Wany, H. 2008. Primary studies on tissue culture from mature embryos in diploid and tetraploid wheat. Agric. 2(3): 262-265.

Sarker, R, H., Biswas, A. 2002. *In vitro* plantlet regeneration and agrobacterium mediated genetic transformation of wheat. Plant Tissue Culture .12(2):155-165.