Cereal Biotechnology and Biochemistry
Online ISSN: 2783-5170
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

Response of durum wheat mature embryo to callus induction and salt stress in vitro condition

Mahasti Abbasi[1] & Reza Mohammadi[2] ✉

[1] Agricultural and Natural Resources Engineering Organization, Kermanshah, Iran, and MSc graduated in Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.

[2] Dryland Agricultural Research Institute, Sararood Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran.

✉ Corresponding author. E-mail: rmohammadi95@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: Using plant tissue culture, including embryo culture, is one of the ways to increase genetic diversity to withstand environmental stresses, including salinity tolerance in plants.

Materials and methods: In this study, the reaction of 20 different durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum Desf.) genotypes, including improved lines, native accessions, and two control cultivars, Zardak and Saji, were evaluated to the induction of callus formation and plant regeneration through mature embryo culture and comparison of callus response to salt stress condition. Murashige and Skoog (MS) medium was used for the mature embryo culture of durum wheat. For assessment of genotypes to salt stress, growing morphogenic calli were exposed to different concentrations of NaCl (0, 4, 8, 12, 16 and 20 dSm-1) added to the culture medium. The response of genotypes to in vitro NaCl stress was analyzed as a 20 × 6 factorial experiment based on a completely randomized design with three replications. Comparison of genotypes for callus induction from mature embryos was based on callus induction frequency, relative fresh weight growth of callus (RFWG), relative growth rate (RGR) and callus growth rate. The relative fresh weight growth of callus (RFWG), relative growth rate (RGR), callus growth rate and necrosis percent of callus were used for salt stress.

Results: The analysis of the correlation coefficients of the investigated traits in the conditions of callus induction showed that the callus induction percentage has a positive and significant correlation ($P<0.01$) with the callus growth rate. A positive and significant correlation ($P<0.05$) was also observed between the relative callus growth and the relative callus growth rate. Under salinity stress, relative callus growth showed a positive and significant correlation ($P<0.01$) with callus relative growth rate and a negative and significant correlation with callus chlorosis percentage. The results cluster analysis showed that genotypes 65-12-3-3, 75-5-3-5 and Zardak were classified in the same group of tolerant salt stress genotypes. Based on the results, Zardak variety and accessions 65-12-3-3 and 75-5-3-5 due to high relative growth rate and relative growth of callus and low chlorosis percentage in the saline environment were identified as tolerant genotypes to salinity under in vitro conditions. Genotype 25-25-1-5 had the highest response to adult embryo culture. The results showed a significant variation in the ability to callus induction in the genetic material under salinity stress conditions, which can be used in the durum wheat breeding program. It could be suggested to evaluate genotypes in field conditions and study the relationships between traits in vitro and in vivo.

Conclusion: Selected cells and plants provide a tool to determine the mechanisms involved in salt stress tolerance. The laboratory screening method for tolerance to salinity stress of plant genotypes can provide a suitable path for developing salinity-tolerant lines in durum wheat.

Keywords: Callus induction, salinity tolerance, embryo culture, durum wheat.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 13 Apr 2023, **Revised:** 05 May 2023, **Accepted:** 09 Jun 2023, **Published online:** 22 Jun 2023

Cite this article: Abbasi, M. & Mohammadi, R. (2023). Response of durum wheat mature embryo to callus induction and salt stress in vitro condition. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, *2*(2), 190-208. DOI: 10.22126/cbb.2023.9226.1046

© The Author(s).

Publisher: Razi

10.22126/cbb.2023.9226.1046

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

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

واکنش جنین بالغ گندم دوروم به القاء کالوس و تنش شوری در شرایط آزمایشگاهی

مهستی عباسی تکیه[۱] و رضا محمدی[۲]*

[۱] سازمان نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، کرمانشاه، ایران و دانش‌آموخته رشته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

[۲] موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، معاونت سرارود، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

*نویسنده مسئول. رایانامه: rmohammadi95@yahoo.com

چکیده

مقدمه: استفاده از کشت بافت‌های گیاهی از جمله کشت جنین یکی از راه‌های افزایش تنوع ژنتیکی برای تحمل تنش‌های محیطی از جمله تحمل شوری در گیاهان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی واکنش ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم متنوع شامل لاین‌های اصلاحی، اکسشن‌های بومی و دو رقم شاهد زردک و ساجی به القاء تشکیل کالوس و باززایی گیاه از طریق کشت جنین بالغ و مقایسه پاسخ کالوس به شرایط تنش شوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. واکنش به شوری کالوس‌های حاصل از جنین‌های بالغ در محیط کشت موراشیک و اسکوگ حاوی مقادیر متفاوت کلرور سدیم (صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ دسی زیمنس بر متر) به صورت آزمایش فاکتوریل ۶ ×۲۰ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. در مرحله القاء کالوس از جنین بالغ درصد القاء کالوس، سرعت رشد کالوس (میلیمتر قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) و در شرایط تنش صفات سرعت رشد کالوس (میلیمتر قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، درصد کلروز کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج تجزیه ضرایب همبستگی صفات مورد بررسی در شرایط القا کالوس نشان داد که صفت درصد القاء کالوس با سرعت رشد کالوس همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد دارد. همچنین بین صفت رشد نسبی کالوس با صفت سرعت رشد نسبی کالوس همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد. در شرایط تنش شوری صفت رشد نسبی کالوس با صفات سرعت رشد نسبی کالوس همبستگی مثبت و معنی‌دار و با درصد کلروز کالوس همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات اندازه‌گیری شده تحت تنش نشان داد که ژنوتیپ های 3-12-3-65 و 5-75-5-3 به همراه رقم بومی زردک در یک گروه تحت عنوان گروه ژنوتیپ های متحمل به شوری قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل، رقم زردک و اکسشن‌های 5-3-5-75 و 3-12-3 بدلیل داشتن سرعت رشد نسبی و رشد نسبی کالوس بالا و داشتن درصد کلروزه پایین در محیط شوری به عنوان ژنوتیپ‌های متحمل به شوری تحت شرایط درون شیشه‌ای شناسایی شدند. ژنوتیپ 5-25-1-5 دارای بیشترین واکنش به کشت جنین بالغ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر تنوع قابل‌توجهی برای توانایی القای کالوس در مواد ژنتیکی تحت شرایط تنش شوری بود که می‌تواند در برنامه اصلاحی گندم دوروم مورد استفاده قرار گیرد. روش غربالگری آزمایشگاهی برای تحمل به تنش شوری ژنوتیپ‌های گیاهی می‌تواند مسیر مناسبی برای توسعه لاین‌های متحمل به شوری در گندم دوروم فراهم نماید.

واژه‌های کلیدی: القاء کالوس، تحمل شوری، کشت جنین، گندم دوروم.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۴ **اصلاح:** ۱۴۰۲/۰۲/۱۵ **پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۳/۱۹، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

استناد: عباسی تکیه، م. و محمدی، ر. (۱۴۰۲). واکنش جنین بالغ گندم دوروم به القاء کالوس و تنش شوری در شرایط آزمایشگاهی. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۲(۲)، ۱۹۰-۲۰۸. DOI: 10.22126/cbb.2023.9226.1046

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

CC BY NC

مقدمه

در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای تکمیل روش‌های متداول اصلاحی به منظور تولید گیاهان مقاوم در برابر تنش و خصوصاً تنش شوری، با استفاده از تنوع موجود یا ایجاد شده در کشت بافت و در سطح سلولی صورت گرفته است. اعتقاد بر آن است که کاربرد کشت بافت می‌تواند روش‌های متداول به‌نژادی را در جهت بهبود تحمل تنش شوری در گیاهان تقویت و تکمیل نماید (Wijerathna-Yapa & Hiti-Bandaralage, 2023). کشت بافت گیاهی نیازهای تکثیر گیاه در مقیاس وسیع را برآورده می‌کند و ابزاری ضروری برای تسهیل سایر کاربردهای بیوتکنولوژی برای اصلاح گیاهان زراعی می‌باشد (Kumar & Loh, 2012; Wijerathna-Yapa *et al*., 2022; Gamborg 2002). علاوه بر این، اهمیت آن به عنوان یک ابزار و کاربرد مستقیم در مطالعات بنیادی مربوط به زیست شناسی گیاهی، بیوشیمی و زیست شناسی مولکولی به خوبی شناخته شده است.

امروزه جمعیت جهان به ۸ میلیارد نفر رسیده است. تهیه غذا و محصولاتی که اکثریت آن‌ها گیاهی است، به یکی از بزرگترین چالش‌های پیش روی نسل بشر در عصر حاضر تبدیل شده است. این در حالی است که چالش‌های بی‌سابقه تغییرات اقلیمی پیچیده‌تر از همیشه هستند (Tripathi *et al*., 2019; Valoppi *et al*., 2021). تغییرات آب و هوایی مختلف در نتیجه گرمایش جهانی بر سیستم های کشاورزی در سراسر جهان تأثیر زیادی می‌گذارد. این تغییرات باعث تشدید تنش‌های محیطی از قبیل خشکی، سرما، گرما، شوری و قرار گرفتن در معرض ترکیبات سمی می‌گردد (Wijerathna-Yapa *et al*., 2022). کشت بافت گیاهی بستری مؤثر، کارآمد و نسبتاً مقرون به صرفه برای غربال گیاهان از نظر تنش‌های زنده و غیر زنده فراهم می‌کند. باززایی گیاه از کالوس یک پدیده مورفوژنتیکی پیچیده می‌باشد که عوامل داخلی و خارجی فیزیولوژیک گیاه نقش مهمی در آن ایفا می‌کنند (Hagio *et al*., 2002). میزان موفقیت در رشد کالوس و باززایی گیاه در غلات بستگی زیادی به نوع ریزنمونه جدا شده دارد. به‌طور کلی، قسمت‌های رویشی گیاهان نسبت به قسمت‌های زایشی آمادگی بیشتری برای باززایی دارند و قابلیت ژنتیکی باززایی در این خصوص در تمام ارقام وجود دارد (Kumar *et al*., 2017). اگرچه جنین نابالغ یکی از مناسب‌ترین ریز نمونه‌ها در کشت بافت غلات می‌باشد، اما به‌عنوان ریزنمونه دارای برخی از معایب نیز می‌باشد. از جمله در دسترس بودن آن‌ها محدود به دوره کوتاهی از زمان رشد در سال بوده، جداسازی با سختی‌هایی همراه است و مشخص کردن مرحله کشت مناسب آن مشکل می‌باشد (Jun *et al*., 2006). از این‌رو، به‌دلیل سهولت استفاده از جنین رسیده، پژوهشگران ترجیح می‌دهند از این نوع جنین برای مطالعه خود به‌جای جنین نارس استفاده نمایند (Hess & Carman, 1998). جنین‌های بالغ به‌دلیل در دسترس بودن در هر فصل از سال، جداسازی آسان و حداقل تغییرپذیری و وضعیت فیزیولوژیکی آن (Yu *et al*., 2008)، به‌عنوان یک جایگزین مؤثر برای جنین‌های نابالغ

می‌باشد. اما وقتی جنین‌های بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده می‌شوند، فراوانی باززایی از کالوس در مقایسه با جنین‌های نابالغ کم می‌شود (Jun *et al*., 2006).

مناطق خشک و نیمه خشک جهان با تجمع مقادیر زیادی نمک در خاک شناخته شده‌اند (EL-Sabagh *et al*., 2020). اگرچه بسیاری از روش‌های اصلاحی و مدیریتی برای بهبود خاک‌های شور متأثر از نمک برای کشاورزی استفاده می‌شوند، اما بسیار پرهزینه هستند و پاسخی پایدار به مشکل شوری ارائه نمی‌دهند. بنابراین، تنش شوری در چند دهه گذشته به دلیل شواهد تجربی گسترده از آنچه در طبیعت رخ داده است، تکامل اکوتیپ‌های بسیار متحمل به نمک گونه‌های مختلف گیاهی (Munns *et al*., 2020; Isayenkov *et al*., 2019; Basu *et al*., 2021) و همچنین پیشرفت قابل‌توجهی که در بهبود صفات مختلف زراعی از طریق انتخاب مصنوعی انجام شده است (Ashraf & Wu, 1994) بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. کشت بافت گیاهی کارآمدترین روش برای افزایش و تولید تحمل به تنش شوری در گیاهان است (Wijerathna-Yapa & Hiti-Bandaralage, 2023). استفاده از کشت بافت توسط عده زیادی از محققین توان بالقوه سیستم‌های درون شیشه‌ای را در شناسایی ویژگی‌های سلولی مربوط به تحمل تنش شوری نشان می‌دهد (Gonzalez *et al*., 2001). امکان تولید گیاهان بارور و متحمل به شوری در گندم که از لحاظ ژنتیکی ثبات بالایی دارند، نشان می‌دهد که انتخاب در سطح کشت بافت گیاهی می‌تواند به عنوان ابزاری مفید در اصلاح مقاومت به شوری به کار رود (Kintzios *et al*., 1996). ابومهادی و همکاران (Abumhadi *et al*., 2005) در بررسی القاء کالوس و باززایی گیاهچه در جنین بالغ و نابالغ مشاهده شد که ظرفیت باززایی وابسته به ژنوتیپ است و در جنین بالغ ظرفیت باززایی از کالوس و تعداد گیاهان باززایی شده، بیشتر از جنین نابالغ بود. بررسی تشکیل کالوس و باززایی گیاه در جنین‌های بالغ و نابالغ ژنوتیپ‌های گندم زمستانه توسط اوزگن و همکاران (Ozgen *et al*., 1996) نشان داد که جنین‌های بالغ فراوانی کمتری در تشکیل کالوس داشتند اما ظرفیت باززایی بالاتری را دارا بودند. بررسی اثر محیط کشت، تنظیم کننده‌های رشد و ژنوتیپ بر القاء کالوس و باززایی در گندم نان نشان داد که فراوانی القاء کالوس و باززایی در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت است (Rashid *et al*., 2002). در تحقیقی که توسط اوزتورک و همکاران (Ozturk *et al*., 2005) روی کالوس ارقام گندم زمستانه انجام شد، اثر ژنوتیپ روی تشکیل کالوس، وزن تر و خشک، حجم رطوبت کالوس، تشکیل کالوس و فراوانی باززایی گیاه معنی‌دار گزارش گردید. بردلی و همکاران (Bradle *et al*., 2001) در تحقیقی خود روی گیاه علف چاودار چند ساله نشان دادند که اثر ژنوتیپ، تیمار ریز نمونه و محیط کشت در القاء کالوس و باززایی گیاه معنی‌دار است. مائس و همکاران (Maes *et al*., 1996) در آزمایشی اهمیت فاکتورهایی مثل ژنوتیپ، محیط کشت، اندازه ریزنمونه و پیش تیمار سرما در ایجاد جنین‌زایی سوماتیکی و واکنش باززایی در گندم‌های نان و

دوروم را مقایسه و گزارش نمودند که اثر ژنوتیپ مهم‌تر از سایر عوامل مورد بررسی بود. در تحقیقی بیرسین و همکاران (Birsin & Ozgen, 2004) القاء کالوس و ظرفیت باززایی در جنین‌های بالغ تریتیکاله را مورد مطالعه قرار دادند و گزارش نمودند که القاء کالوس و ظرفیت باززایی وابسته به ژنوتیپ می‌باشد ولی همبستگی معنی‌داری بین القاء کالوس و ظرفیت باززایی مشاهده نشد.

بابو و همکاران (Babu *et al.*, 2007) اثر غلظت‌های مختلف کلرور سدیم (۱ -۰/۲ گرم در لیتر) بر القاء کالوس جنین بالغ برنج را بررسی نمودند. نتایج آزمایش نشان داد که تنش شوری بر رشد کالوس تأثیرگذار است و با افزایش غلظت کلرور سدیم، رشد کالوس کاهش خواهد یافت. اختر (Akhtar, 2006) برای ارزیابی واریته‌های گندم از نظر مقاومت به شوری، کالوس‌های حاصل از کشت بذر را در معرض غلظت‌های مختلف کلرور سدیم قرار و نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها از نظر القاء کالوس و باززایی تحت تنش وجود دارد و با افزایش مقدار کلرور سدیم در محیط کشت، القاء کالوس و باززایی کاهش یافت.

از آنجایی که شناسایی و کاربرد ژنوتیپ‌های متحمل شوری در برنامه‌های به‌نژادی تحت شرایط درون شیشه‌ای دارای اهمیت بسزایی است، هدف این مطالعه شناخت واکنش ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم به القاء کالوس حاصل از کشت جنین بالغ و ارزیابی تحمل به شوری کالوس‌های حاصل از کشت جنین در سطوح مختلف شوری بود.

مواد و روش‌ها

مواد ژنتیکی

به منظور بررسی واکنش به القاء کالوس و برر سی تنش شوری در کالوس‌های کشت جنین بالغ در گ ندم دوروم، ۲۰ ژنوتیپ متنوع گندم دوروم شامل ۹ اکسشن بومی، ۹ لاین اصلاحی و دو رقم شاهد زردک و ساجی از معاو نت مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم، سرارود کرمانشاه دریافت شد (جدول ۱). برای به دست آوردن جنین‌های بالغ سالم و مناسب، در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی بذور ژنوتیپ‌های مورد بررسی کشت شدند.

کشت جنین و انتقال کالوس به محیط کشت شوری

به منظور ک شت ج نین، ابتدا بذور ژنوت یپ های مورد مطالعه پس از شست شو با آب، به مدت پنج دقی قه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند سپس سه بار با آب مق طر یک بار تقطیر شستشو داده شدند. در مرح له ب عد، پس از قرار گرفتن در هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۳۰ – ۲۰ دقیقه، سه بار با آب مق طر یک بار تقط یر شست شو داده شدند. به منظور سهولت در جدا نمودن جنین‌ها، بذور به مدت ۳-۱ ساعت در آب مق طر یک بار تقط یر خی سانده شدند. جنین‌های بالغ پس از جداسازی به پتری دیش‌های مح توی م حیط ک شت مورا شیک و ا سکوگ (MS) به انضمام ۲/۵ میلی گرم در لی تر تو فوردی، به ن حوی که

سپرچه[1] در جهت بالا قرار گیرد، انتقال یافتند (شکل ۱). در هر پتری دیش، ۱۰ جنین کشت شد و برای هر ژنوتیپ، هفت پتری دیش (تکرار) در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از چهار هفته، کالوس‌های به دست آمده واکشت[2] شده (شکل ۲) و ۱۴ روز بعد از واکشت، کالوس‌ها به محیط کشت حاوی سطوح مختلف شوری (صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ دسی زیمنس بر متر) منتقل شدند (شکل ۳). در هر پتری دیش حاوی تیمار شوری، پنج قطعه کالوس کشت شد و برای هر سطح تیمار شوری در هر ژنوتیپ، سه پتری دیش (تکرار) به مدت ۱۶ روز در داخل اتاقک کشت با فت در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی واکنش به تنش شوری آزمایشی به صورت فاکتوریل با ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم و شش سطح شوری (۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ دسی زیمنس بر متر) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. در این آزمایش صفات درصد القاء کالوس، سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) در مرحله القاء کالوس (در محیط بدون تنش) و صفات سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر)، درصد کلروز کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر) در شرایط تنش شوری مورد مطالعه و اندازه‌گیری قرار گرفتند.

میزان القاء کالوس چهار هفته بعد از کشت جنین مورد ارزیابی قرار گرفت. سرعت رشد کالوس بر حسب میلی‌متر در روز، در مرحله القاء کالوس پس از اندازه‌گیری قطر کالوس در طی روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از کشت و درشرایط تنش شوری پس از اندازه‌گیری قطر کالوس در روزهای صفر، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ روز پس از کشت در محیط شوری محاسبه گردید. برای محاسبه رشد نسبی کالوس‌ها[3] (RFWG) در محیط تنش و بدون تنش بر اساس وزن تر برای هر ژنوتیپ از رابطه زیر استفاده شد (Karadimova & Djambpva, 1993):

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

که در آن W_1وW_2 به ترتیب وزن اولیه و نهایی کالوس در محیط می‌باشد.

برای محاسبه سرعت رشد نسبی کالوس ها[4] (RGR) در محیط تنش و بدون تنش بر اساس وزن تر برای هر ژنوتیپ، از رابطه زیر استفاده شد (Khayri *et al.*, 2004).

$$RGR= [Ln\ W2- Ln\ W1]/ \text{دوره رشد}$$

برای محاسبه درصد کلروز، ۱۶ روز پس از کشت کالوس‌ها در محیط شور، به طور مشاهده‌ای و همزمان برای تمامی ژنوتیپ‌ها، به هر کالوس رتبه‌ای عددی (از صفر تا ۱۰) که نشانگر میزان کلروز در آن کالوس بود، اختصاص یافت.

[1] -Scutellum
[2] -Subculture
[3]-Relative fresh weight growth
[4]- Relative growth rate

برای داده‌های غیر نرمال از تبدیل مناسب داده‌ها ا ستفاده شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای آماری MSTATC و SAS انجام شد. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و با تعیین ضرایب فاصلهء اقلیدسی، با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

جدول ۱- لیست ژنوتیپ‌های گندم دوروم مورد مطالعه

Table 1. List of the studied genotypes

کد ژنوتیپ Genotype code	نام ژنوتیپ Genotype name	منشأ ژنوتیپ Origin	کد ژنوتیپ Genotype code	نام ژنوتیپ Genotype name	منشأ ژنوتیپ Origin
1	Zardak	کرمانشاه	11	Heider/Mt/Ho	ایکاردا
2	65-12-3-3	کرمانشاه	12	Saji	ایکاردا
3	25-25-1-5	کرمانشاه	13	Waha- B53	ایکاردا
4	75-5-3-5	کرمانشاه	14	Arthar 71/Bcr//ch5	ایکاردا
5	409	کرمانشاه	15	Stj3/4/stn//Hvi/Somo/ 3/yav/ fg//Roh	ایکاردا
6	259	کرمانشاه	16	Gidara-2	ایکاردا
7	15-15-1-3	کرمانشاه	17	Lgt3/4/Bcr/3/ch1//Gta/ stk	ایکاردا
8	240	کرمانشاه	18	Aghrass-2	ایکاردا
9	37-24-2-3	کرمانشاه	19	Quadalete//Erp/mol/3/unk/4/Mrb3/Mnal	ایکاردا
10	249	کرمانشاه	20	Stj3//Bcr/LKS4	ایکاردا

نتایج و بحث

بررسی صفات در مرحله القاء کالوس

نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در مرحله القاء کالوس از کشت جنین بالغ در محیط کشت موراشیک و اسکوگ نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات درصد القاء کالوس، سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز) و رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر) اختلاف معنی‌داری وجود داشت، اما بین آن‌ها از نظر صفت سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) اختلاف معنی‌دار نبود (جدول ۲).

مقایسه میانگین صفات با استفاده از روش دانکن (جدول ۳) انجام و نتایج حاصل از آن نشان داد که ژنوتیپ 25-25-1-5 بومی استان کرمانشاه با ۶۴/۳ درصد القاء کالوس، بالاترین میزان القاء و ژنوتیپ Stj3//Bcr/lks4 از ایکاردا کمترین میزان القاء را با ۴/۳ درصد دارا بود. رقم زردک بالاترین میزان سرعت رشد کالوس (۰/۱۳۷ میلی-متر قطر در روز) و ژنوتیپ 25-25-1-5 پس از زردک، بیشترین سرعت رشد و ژنوتیپ Arthar 71/Bcr//ch5 کمترین میزان سرعت رشد کالوس را نشان دادند. ژنوتیپ 25-25-1-5 بالاترین رشد نسبی (۰/۱۷۰) را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و ژنوتیپ 65-12-3-3 کمترین رشد نسبی را دارا بود. ژنوتیپ Waha-B53

بالاترین و ژنوتیپ 3-3-12-65 کمترین سرعت رشد نسبی کالوس را نشان داد. درصد القاء کالوس در جنین بالغ گندم دوروم از ۴/۲۸ تا ۶۴/۲۸ درصد متفاوت بود. بالاترین درصد القاء کالوس در جنین‌های بالغ مربوط به ژنوتیپ‌های متفاوت بود بنابراین درصد القاء کالوس وابسته به ژنوتیپ می‌باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه جنین بالغ گندم دوروم در مرحله القاء کالوس

Table 2. Analysis of variance for the studied traits of mature embryo of durum wheat in the callus induction stage

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares: رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) Callus relative growth (based on wet weight)	سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) Callus relative growth rate (based on wet weight)	سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطردر روز) Callus growth rate (mm/day)	القاء کالوس (٪) Callus induction (%)
ژنوتیپ Genotype	19	0.089**	1.256ns	0.006 ns	21.31**
خطای آزمایشی Error	120	0.018	0.9433	0.004	1.805
ضریب تغییرات CV%		3.32	19.42	2.92	24.56

ns: غیرمعنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

ns: non-significant; **: significant at 1% level of probability.

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان ژنوتیپ 5-1-25-25 بومی استان کرمانشاه را ژنوتیپ برتر در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر واکنش به کشت جنین بالغ شناخت. نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج سایر محققان که عنوان کردند میزان تشکیل کالوس به نوع ژنوتیپ بستگی دارد، مطابقت داشت (Ganeshan *et al*., 2003; Grigoryeva & Shletser 2006; Ihsanshah *et al*., 2003; Kacem *et al*., 2017).

بررسی صفات در شرایط تنش شوری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات کالوس در سطوح مختلف شوری (جدول ۴) نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر)، سرعت رشد نسبی کالوس (براساس وزن‌تر) و درصد کلروز کالوس اختلاف بسیار معنی‌دار بود. بین سطوح مختلف شوری از نظر این صفات اختلاف بسیار معنی‌داری وجود داشت، همچنین برای این صفات اثر متقابل ژنوتیپ و شوری معنی‌دار شد. اثر سطوح شوری به درجات مختلف رگرسیونی تفکیک شد و روابط مختلف رگرسیونی سطوح مختلف شوری با صفات مورد مطالعه، ارزیابی شد. بین سطوح مختلف شوری و رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) و درصد کلروز کالوس تنها روابط خطی معنی‌دار

شدند. اما روابط خطی، درجه دوم و درجه سوم سطوح مختلف شوری با سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز) و سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر) معنی‌دار شد.

جدول ۳- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات مربوط به واکنش کالوس‌های حاصل از جنین بالغ در مرحله القاء کالوس

Table 3. Mean comparison of investigated genotypes based on traits related to calli from mature embryo culture in the callus induction stage

ژنوتیپ Genotype	رشد نسبی کالوس(بر اساس وزن تر) Callus relative growth (based on wet weight)	سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) Callus relative growth rate (based on wet weight)	سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطردر روز) Callus growth rate (mm/day)	القاء کالوس (٪) Callus induction (%)
Zardak	0.089 abc	0.0039 abc	0.137 a	55.714 a
65-12-3-3	0.043 abc	-0.0077 abc	0.670 ab	45.714 ab
25-25-1-5	0.170 ab	0.0052 ab	0.090 ab	64.286 a
75-5-3-5	0.093 abc	0.0042 abc	0.057 abc	21.429 dc
409	0.163 abc	-0.0071 abc	0.095 abc	28.654 bc
259	-0.018 abc	-0.0013 abc	0.320 bc	28.571 bc
15-15-1-3	0.054 abc	0.0023 abc	0.045 bc	27.143 bc
240	-0.035 abc	-0.0121 abc	0.088 ab	50.0 a
37-24-2-3	-0.004 abc	-0.0052 abc	0.040 bc	51.429 a
249	-0.226 c	-0.0297 c	0.063 abc	45.714 ab
Heider/Mt/Ho	0.031 abc	0.0012 abc	0.060 abc	41.429 ab
Saji	0.063 abc	0.0029 abc	0.052 bc	15.714 cde
Waha- B53	0.163 abc	0.0078 a	0.053 bc	8.571 e
Arthar 71/Bcr//ch5	0.0115 abc	0.0039 abc	0.006 c	15.714 cde
Stj3/4/stn//Hvi/Somo	0.131 ab	0.0046 ab	0.046 bc	7.143 e
Grdara-2	0.164 abc	0.0074 ab	0.057 bc	12.857 de
Lgt3/4/Bcr/3/ch1//Gt	0.057 abc	0.0020 abc	0.057 bc	12.857 cde
Aghrass-2	-0.117 bc	-0.0148 bc	0.031 bc	10.0 de
Quadalete//Erp/mol/3	0.092 abc	0.0029 abc	0.039 bc	14.286 cde
Stj3//Bcr/lks4	0.047 abc	0.0021 abc	0.62 abc	4.286 e

در هر ستون میانگین‌های با حروف مشترک، در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed common letters in each column are not significantly different at 1% probability level.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن نشان داد که در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ژنوتیپ 249 بیشترین سرعت رشد کالوس را دارا بود و پس از آن ژنوتیپ Stj3/4/stn//Hvi/Somo دارای سرعت بالایی بود و ژنوتیپ Quadalete//Erp/mol/3 کمترین سرعت رشد را داشت (جدول ۵). ژنوتیپ 75-5-3-5 دارای بیشترین میزان رشد نسبی کالوس و پس از آن ژنوتیپ 65-12-3-3 دارای رشد نسبی بالایی بود و ژنوتیپ Quadalete//Erp/mol/3 کمترین رشد نسبی کالوس را نشان داد. از نظر درصد کلروز کالوس بین

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ژنوتیپ 240 بیشترین و ژنوتیپ 5-3-5-75 کمترین مقدار کلروز در کالوس را نشان داد. البته ژنوتیپ‌های Lgt3/4/Bcr/3/ch1//Gt و Stj3//Bcr/lks4 بدلیل درصد القاء کالوس پایین تحت سطوح مختلف تنش قرار نگرفتند. ژنوتیپ 5-3-5-75 به‌دلیل داشتن سرعت رشد نسبی و رشد نسبی کالوس بالا و داشتن درصد کلروز پایین در محیط شوری را می‌توان به عنوان ژنوتیپ متحمل‌تر شناسایی نمود. ارقامی که دارای پایین‌ترین رشد نسبی کالوس در محیط کشت تنش شوری بودند را می‌توان به عنوان ارقام با کم‌ترین تحمل نسبت به شوری در سطح کشت بافت گروه‌بندی نمود.

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده بر روی کالوس حاصل از جنین‌های بالغ گندم دوروم تحت تنش شوری

Table 4. Variance analysis of measured traits on callus from durum wheat mature embryo under salinity stress

منابع تغییرات Source of variation	درجات آزادی df	میانگین مربعات Mean squares			
		کلروز کالوس (٪) Callus necrosis (%)	سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر) Callus relative growth rate (based on wet weight)	رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر) Callus relative growth (based on wet weight)	سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز) Callus growth rate (mm/day)
ژنوتیپ Genotype	19	5299.337**	4.413**	4.289**	0.005**
شوری Salinity	5	569.89**	4.206**	4.545**	0.004**
خطی (درجه ۱) Linear	1	2605.003**	16.245**	19.949**	0.014**
درجه ۲	1	2.036ns	4.56**	0.955ns	0.0028**
درجه ۳	1	76.957ns	1.693**	0.892ns	0.003**
انحراف از درجه ۳	2	165.454ns	0.225ns	0.927ns	0.0002ns
شوری x ژنوتیپ Genotype x Salinity	95	303.897**	1.227**	1.159**	0.001**
خطای آزمایشی Error	240	155.131	0.709**	0.05831	0.001
ضریب تغییرات CV%		27.53	16.88	1.8053	0.54

ns: غیرمعنی‌دار، **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

ns: non-significant; **: significant at 1% level of probability.

جدول ۵- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های گندم دوروم از نظر صفات مورد مطالعه در کالوس‌های حاصل از جنین‌های بالغ تحت تنش شوری

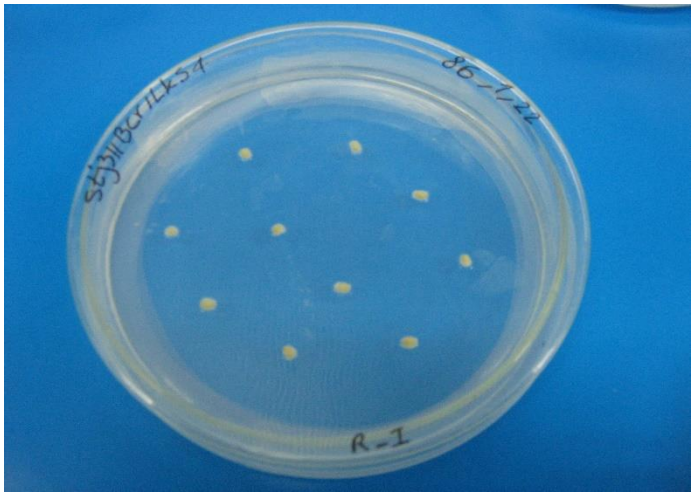
Table 5. Mean comparison of durum wheat genotypes based on traits from calli of mature embryo under salinity stress

ژنوتیپ Genotype	سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطردر روز) Callus growth rate (mm/day)	رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر) Callus relative growth (based on wet weight)	سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر) Callus relative growth rate (based on wet weight)	کلروز کالوس (٪) Callus necrosis (%)
Zardak	-0.184 abc	-0.068 bcd	-0.005 bcd	29.400 ab
65-12-3-3	-0.341 abcd	-0.035 bc	-0.003 bc	26.310 a
25-25-1-5	-0.378 de	-0.147 egf	-0.010 efg	46.670 abc
75-5-3-5	-0.59 dec	-0.025 bc	-0.003 ab	25.800 a
409	-0.027 abcd	-0.083 bcde	-0.006 bcde	38.780 abc
259	-0.035 bcd	-0.122 edf	-0.009 def	42.220 abc
15-15-1-3	-0.022 abcd	-0.071 bcd	-0.005 bcd	34.110 abc
240	-0.660 dec	-0.154 gf	-0.011 fg	62.310 cd
37-24-2-3	-0.045 dec	-0.146 egf	-0.010 efg	48.860 abc
249	-0.010 ab	-0.029 ab	-0.003 ab	35.330 abc
Heider/Mt/Ho	-0.404 bcd	-0.104 edfc	-0.007 cdef	39.500 abc
Saji	-0.194 abcd	-0.062 bc	-0.004 bc	44.260 abc
Waha- B53	-0.370 bcde	-0.114 edfc	-0.008 cdef	41.420 abc
Arthar 71/Bcr//ch5	-0.260 abcd	-0.059 bc	-0.004 bc	48.320 abc
Stj3/4/stn//Hvi/Somo	-0.013 ab	-0.052 bc	-0.004 bc	55.380 abc
Grdara-2	-0.288 abcd	-0.085 bcd	-0.006 bcde	60.970 cd
Lgt3/4/Bcr/3/ch1//Gt	-	-	-	-
Aghrass-2	-0.279 abcd	-0.088 bcde	-0.006 bcde	55.190 abc
Quadalete//Erp/mol/3	-0.065 e	-0.208 g	-0.015 g	59.920 bc
Stj3//Bcr/lks4	-	-	-	-

در هر ستون میانگین‌های با حروف مشترک در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

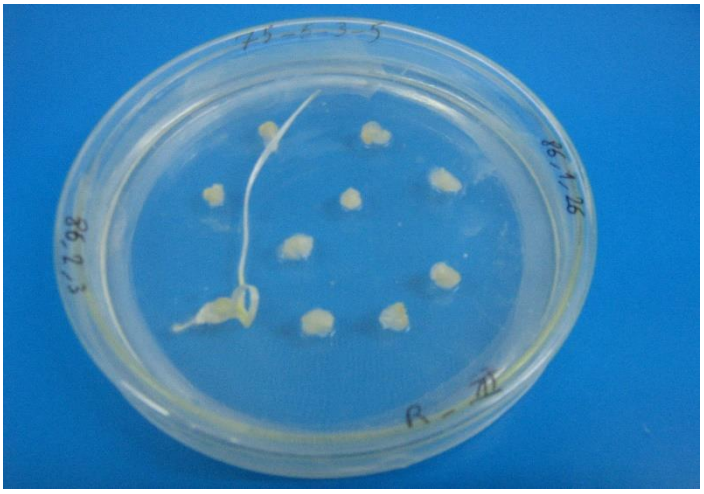
Means followed common letters in each column are not significantly different at 1% probability level.

از معیار سرعت رشد نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس بر اساس وزن تر برای ارزیابی واکنش کالوس نسبت به شوری در محیط درون شیشه‌ای استفاده شد. معنی‌داری اثر متقابل ژنوتیپ و شوری از لحاظ سرعت رشد کالوس و رشد نسبی کالوس حاصل از جنین بالغ حاکی از آن است که هر چند میزان رشد نسبی و سرعت رشد کالوس با افزایش غلظت کلرور سدیم در محیط کشت کاهش یافته، اما روند این کاهش در بین ارقام متفاوت بوده است. در کل، تنوع زیادی که بین ارقام مختلف دوروم از لحاظ سرعت رشد و رشد نسبی کالوس در سطوح مختلف شوری مشاهده شد، ممکن است مربوط به توانایی متفاوت آن‌ها در جذب رطوبت و جلوگیری از ورود عناصر مضر به داخل سلول باشد، چراکه رشد کالوس تحت تأثیر میزان جذب آب و همچنین ورود یون‌هایی که در غلظت‌های زیاد برای سلول سمی هستند و در محیط کشت وجود دارند، قرار می‌گیرد (Saldarriaga *et al*., 2020).



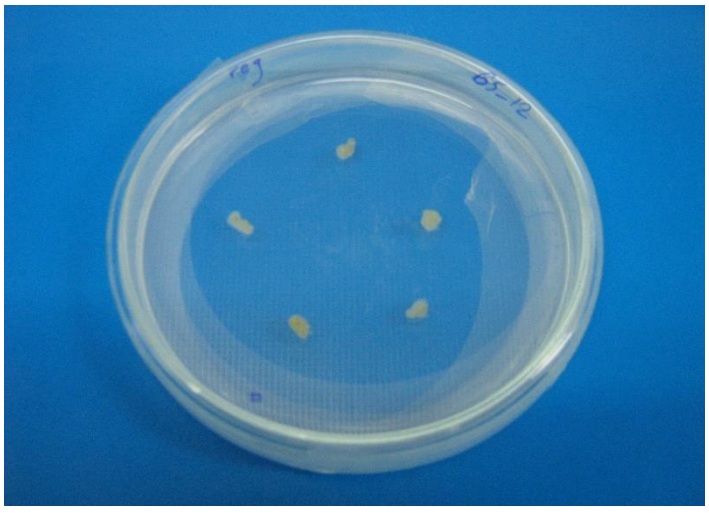
شکل ۱- قرار دادن جنین بالغ در محیط کشت MS

Figure 1. Placing the mature embryo in the MS medium



شکل ۲-کالوس‌های ایجاد شده از کشت جنین بالغ

Figure 2. Calluses created from mature embryo culture



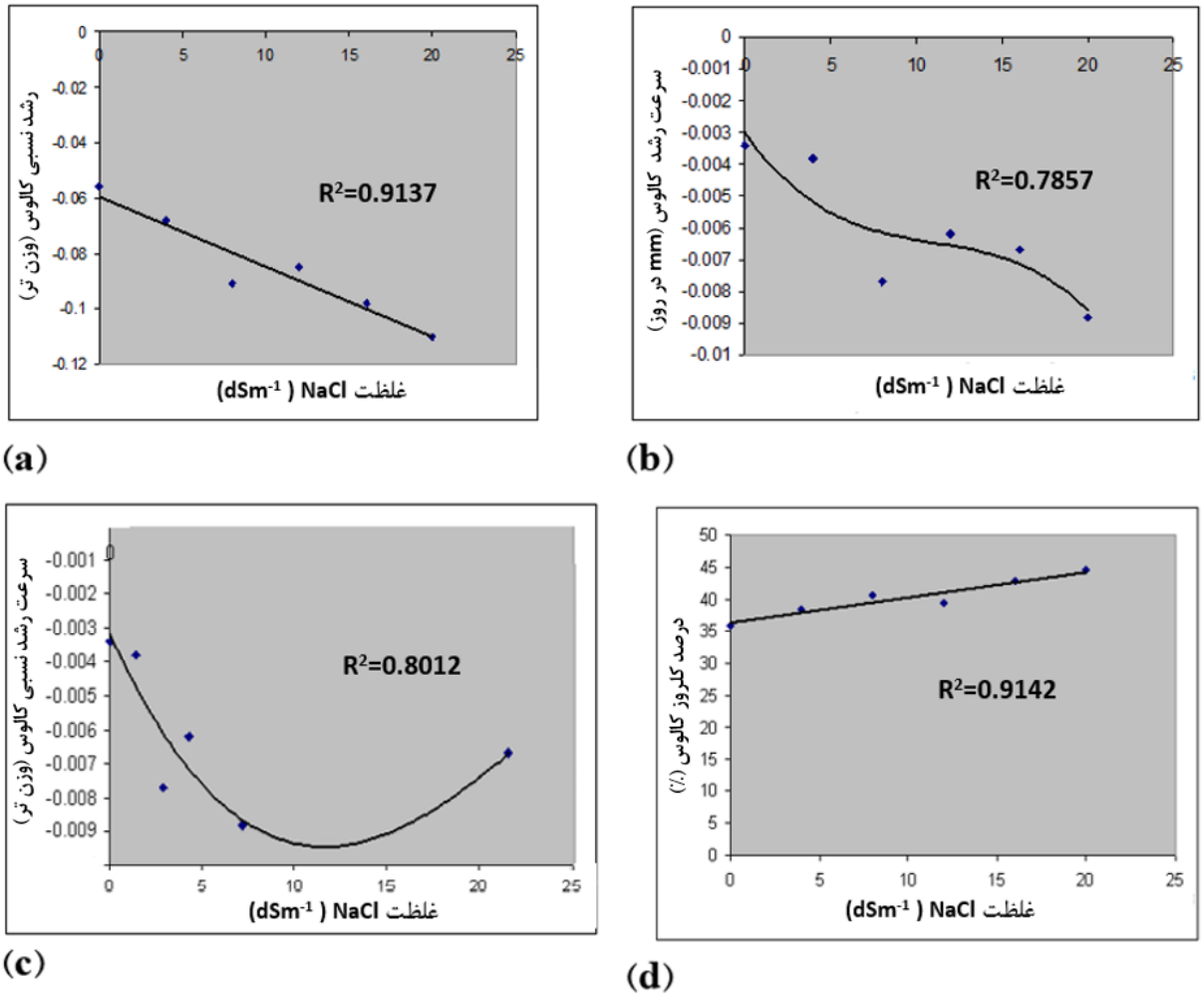
شکل ۳- قرار گرفتن کالوس‌ها در محیط تنش شوری

Figure 3. Placement of calli in salt stress environment

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر سطوح شوری بر روی رشد نسبی کالوس نشان داد که با افزایش سطح شوری رشد نسبی کالوس بصورت خطی کاهش یافت (شکل -۴a). میزان سرعت رشد نسبی کالوس و سرعت رشد کالوس با افزایش درصد کلرور سدیم در محیط کشت تا سطح ۸ دسی زیمنس بر متر، به طور معنی‌داری کاهش یافت، اما در سطوح بالاتر به سوی ثبات یا تقریباً توقف رشد متمایل گردید (شکل ۴-b و ۴-c). صفت درصد کلروز کالوس با افزایش درصد کلرور سدیم افزایش یافت (شکل ۴-d). مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری برای صفات سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و درصد کلروز نشان داد که با افزایش درصد کلرور سدیم در محیط کشت، تا سطح ۱۲ دسی زیمنس بر متر میزان این صفات به طور معنی‌داری کاهش یافت و در سطوح بالاتر ۱۶ و ۲۰ دسی زیمنس بر متر به سوی ثبات یا تقریباً توقف رشد متمایل گردید. علت این امر شاید از آنجا ناشی شود که افزودن نمک به محیط کشت، پتانسیل اسمزی محیط را کاهش داده و باعث کاهش میزان آب قابل دسترس بافت گیاهی می‌شود و به همین دلیل بین تنش شوری و کاهش پتانسیل اسمزی یا به عبارتی تنش خشکی می‌تواند رابطه مستقیمی وجود داشته باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در این آزمایش ژنوتیپ -5-75 3-5 درصد کلروز کالوس کمتر، رشد نسبی بیشتر و سرعت رشد نسبی کالوس بالاتری در محیط کشت شور نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد. بنابراین، این ژنوتیپ را می‌توان به عنوان ژنوتیپ متحمل به شوری شناسایی نمود. البته مطالعات فیزیولوژیک و ژنتیکی بیشتری در رابطه با ژنوتیپ متحمل در شرایط مزرعه یا هیدروپونیک توصیه می‌گردد. همچنین حداکثر ۱/۲ درصد کلرور سدیم در ارزیابی واکنش گندم دوروم به تنش شوری با استفاده از کالوس‌های به دست آمده از جنین بالغ پیشنهاد می‌گردد.

همبستگی صفات در شرایط تنش و بدون تنش

نتایج حاصل از تجزیه همبستگی صفات اندازه گیری شده کالوس‌های حاصل از کشت جنین بالغ در مرحله القاء کالوس و محیط کشت تنش شوری به ترتیب در جداول ۶ و ۷ ارائه شده است. نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که صفت درصد القاء کالوس با صفت سرعت رشد کالوس همبستگی مثبت و معنی‌دار داشت. بین صفت رشد نسبی کالوس با صفت سرعت رشد نسبی کالوس همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۶). در شرایط تنش شوری صفت رشد نسبی کالوس با صفات سرعت رشد نسبی کالوس همبستگی مثبت معنی‌دار و با درصد کلروز کالوس همبستگی منفی و معنی‌داری نشان داد. بین صفت رشد نسبی کالوس و درصد کلروز همبستگی منفی و معنی‌دار مشاهده شد.



شکل ۴ – اثر متقابل صفات مورد بررسی در کشت کالوس و سطوح مختلف شوری. (الف) رشد نسبی کالوس، (ب) سرعت رشد کالوس، (ج) سرعت رشد نسبی کالوس و (د) درصد کلروز کالوس

Figure 4. The interaction effect of investigated traits in callus culture and different salinity levels. (a) Relative callus growth, (b) callus growth rate, (c) relative callus growth rate and (d) percentage of callus chlorosis

اوزگن و همکاران (Ozgen *et al.*, 2017) در آزمایشی روی گونه‌های آجیلوپس و تریتیکوم، بین القای کالوس با وزن کالوس و با ظرفیت باززایی کالوس همبستگی مثبت و معنی‌داری گزارش نمودند. در حالی که بین فراوانی القای کالوس و کارآیی کشت همبستگی معنی‌داری وجود نداشت. آن‌ها گزارش نمودند که جنین‌های بالغ برخی گونه‌های آجیلوپس و تریتیکوم دارای ظرفیت باززایی بالایی هستند و بنابراین می‌توان از آن‌ها به عنوان منبع ریزنمونه‌ای مؤثر برای کاربرد موفق بیوتکنولوژی در بهبود محصول استفاده کرد. در آزمایشی دیگر روی جنین تریتیکاله بیرسین و اوزگن (Birsin & Ozgen, 2004) بین درصد القاء کالوس با وزن کالوس و درصد باززایی کالوس همبستگی غیر معنی‌داری گزارش نمودند.

جدول ۶- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف کالوس حاصل از کشت جنین بالغ گندم دوروم در مرحله القاء کالوس

Table 6. Correlation coefficients between different callus traits obtained from durum wheat mature embryo culture in the callus induction stage

صفت Trait	القاءکالوس (٪) Callus induction	سرعت رشد کالوس Callus growth rate	رشد نسبی کالوس Callus relative growth
سرعت رشد کالوس Callus growth rate	0.85**		
رشد نسبی کالوس Callus relative growth	-0.289	0.044	
سرعت رشد نسبی کالوس Callus relative growth rate	-0.25	-0.051	0.499*

*و**: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

*, **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۷- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف کالوس حاصل از کشت جنین بالغ گندم دوروم در شرایط تنش شوری

Table 7. Correlation coefficients between different callus traits obtained from durum wheat mature embryo culture under salt stress conditions

صفت Traits	رشد نسبی کالوس Callus relative growth	سرعت رشد کالوس Callus growth rate	سرعت رشد نسبی کالوس Callus relative growth rate
سرعت رشد کالوس Callus growth rate	0.310		
سرعت رشد نسبی کالوس Callus relative growth rate	0.773**	0.221	
کلروز کالوس (٪) Callus Necrotic (%)	-0.774**	-0.313	-0.638**

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

: **Significant at 1% level of probability.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات اندازه‌گیری شده کالوس در شرایط تنش

به منظور دسته بندی ارقام و ژنوتیپ‌ها ها، پی بردن به فاصله ژنتیکی آن‌ها و استفاده از تنوع موجود در آن‌ها در برنامه‌های اصلاح نبات از تجزیه خوشه‌ای استفاده می‌شوددر این تحقیق، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر روی صفات سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و درصد کلروز کالوس انجام شد (شکل ۵). تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را در پنج گروه دسته‌بندی نمود که ژنوتیپ‌های زردک، ۲ و ۴ در گروه اول، ژنوتیپ-های ۳، ۸، ۱۶ و ۱۹ در گروه دوم، ژنوتیپ‌های شماره ۵، ۶، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳ در گروه سوم، ژنوتیپ‌های شماره ۹، ۱۴، ۱۵ و ۱۸ در گروه چهارم و ژنوتیپ‌های شماره ۱۷ و ۲۰ در گروه پنجم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های

متحمل در گروه اول قرار داشتند. البته ژنوتیپ‌های ۱۷ و ۲۰ در کشت جنین بالغ بدلیل درصد القاء کالوس پایین به محیط تنش شوری منتقل نشدند. نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص نیز این گروه‌بندی را صد در صد تأیید نمود (جدول ۸). وجود ژنوتیپ‌های زردک، -12-65 3-3 و 5-3-5-75 در یک دسته، بیانگر شباهت بیشتر آن‌ها از نظر صفات مقاومت به شوری کالوس و تحمل آن‌ها نسبت به تنش شوری می‌باشد. این نتایج با نتایج به دست آمده به کمک مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مربوط به کالوس در شرایط تنش مشابه است. این تجزیه قادر به تفکیک ژنوتیپ‌های متحمل از حساس بود.

مقایسه الگوی بیان ژن‌هایی که به تنش شوری در گندم‌های دوروم متحمل و حساس در سطح مولکولی واکنش نشان می‌دهند می‌تواند اطلاعات ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاحی در اختیار قرار دهد. بنابراین آنچه مهم است، شناسایی ژنوتیپ‌هایی است که در دو انتهای حداکثر و حداقل گستره تحمل به شوری قرار داشته باشند تا در برنامه اصلاحی آینده با بررسی الگوی بیان ژن‌های القاء شونده با تنش در این ژنوتیپ‌ها پایه‌های فیزیولوژیکی واکنش آن‌ها به تنش شناخته شود.

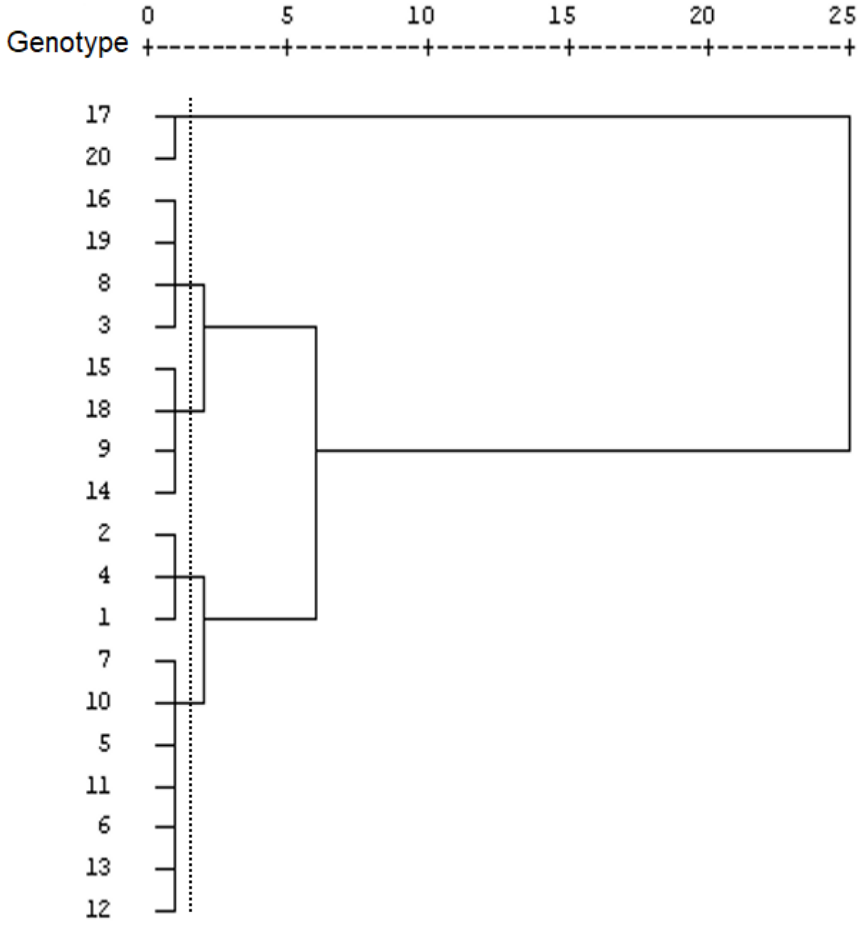
جدول ۸- نتایج تجزیه تابع تشخیص برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات اندازه گیری شده کالوس حاصل از کشت جنین‌های بالغ تحت تنش شوری

Table 7. The results of discriminant analysis for grouping of genotypes based on the measured traits of the callus obtained from the mature embryos culture under salt stress

گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای Groups resulting from cluster analysis	گروه‌های پیش‌بینی‌شده Predicted groups					کل Total
	1	2	3	4	5	
1	3	0	0	0	0	3
2	0	4	0	0	0	4
3	0	0	7	0	0	7
4	0	0	0	4	0	4
5	0	0	0	0	2	2
1	100	0	0	0	0	100
2	0	100	0	0	0	100
3	0	0	100	0	0	100
4	0	0	0	100	0	100
5	0	0	0	0	100	100

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل، رقم زردک و اکسشن‌های 65-12-3-3 و 75-5-3-5-5 به عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ به تنش شوری در شرایط آزمایشگاهی شناسایی شدند. ژنوتیپ 25-25-1-5 دارای بیشترین واکنش به کشت جنین بالغ بود. نتایج بیانگر تنوع قابل‌توجهی برای توانایی القای کالوس در مواد ژنتیکی تحت شرایط تنش شوری بود که می‌تواند در برنامه اصلاحی گندم دوروم مورد استفاده قرار گیرد. پیشنهاد می‌گردد که این ژنوتیپ‌ها در شرایط مزرعه نیز ارزیابی گردند و روابط بین صفات در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد مطالعه قرار گیرد. سلول‌ها و گیاهان انتخاب شده ابزاری برای تعیین مکانیسم‌های دخیل در تحمل به تنش شوری فراهم می‌نمایند. روش غربالگری آزمایشگاهی برای تحمل به تنش شوری ژنوتیپ‌های گیاهی می‌تواند مسیر مناسبی برای توسعه لاین‌های متحمل به شوری در گندم دوروم را فراهم نماید.



شکل ۵- تجزیه خوشه ای حاصل از تجزیه صفات اندازه گیری شده کالوس حاصل از جنین بالغ گندم دوروم تحت تنش شوری به روش UPGMA

Figure 5- Cluster analysis resulting from the analysis of the measured traits of the callus obtained from mature embryos of durum wheat under salt stress by the UPGMA method

References

Abumhadi, N., Kamenarova, K., Todorovska, E., Dimov, G., Trifonova, A., Gecheff, K., & Atanassov, A. 2005. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos (*Hordeum vulgare* L.). Biotechnology and Biotechnological Equipment, 19 (3), 32-38.

Akhtar, N. 2006. Callogenesis and organogenesis response of wheat cultivars under sodium chloride salt stress. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(11), 2092-2096.

Ashraf, M., & Wu, L. 1994. Breeding for Salinity Tolerance in Plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 13, 17-42.

Babu, S., Sheeba, A., Yogameenakshi, P., Anbumalarmathi, J., & Rangasamy, P. 2007. Effect of salt stress in the selection of salt tolerant hybridsin Rice (*oryza sativa* L.) under *in vitro* and *in vivo* condition. Asian journal of plant sciences, 6(1), 137-142.

Basu, S., Kumar, A., Benazir, I., & Kumar, G. 2021. Reassessing the Role of Ion Homeostasis for Improving Salinity Tolerance in Crop Plants. Physiologia Plantarum, 171, 502–519.

Birsin, M., & Ozgen, M. 2004. A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (x triticosecale wittmack). Cellular and molecular biology letters, 9(2), 353-361.

Bradle, D.E., Bruneau, A.H., & Qu, R. 2001. Effects of cultivar explant treatment, and medium supplements on callus induction and plantlet regeneration in perennial ryegrass. International Turfgrass Society Research Journal, 9, 152-156.

EL-Sabagh, A., Hossain, A., Barutçular, C., Iqbal, M.A., Islam, M.S., Fahad, S., Sytar, O., Çig, F., Meena, R.S., & Erman, M. 2020. Consequences of Salinity Stress on the Quality of Crops and Its Mitigation Strategies for Sustainable Crop Production: An Outlook of Arid and Semi-Arid Regions. *In*: Environment, Climate, Plant and Vegetation Growth; Fahad, S., Hasanuzzaman, M., Alam, M., Ullah, H., Saeed, M., Ali Khan, I., Adnan, M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; pp. 503–533. ISBN 978-3-030-49732-3.

Gamborg, O.L. 2002. Plant Tissue Culture. Biotechnology. Milestones. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 38, 84-92.

Ganeshan, S., Baga, M., Harwey, B.L., Rossnagel, B.G., Scoles, G.J., & Chibbar, R.N. 2003. Production of multiple shoots from thiadiazuron- treated mature embryos and leaf- base/ apical meristems of barley (*Hordeum vulgar* l.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73, 57-64.

Grigoryeva, L.P., & Shletser, I.A. 2006. Screening wheat cultures for morphogenesis ability in immature embryo in vitro. Biologe 3-41.

Gonzalez, J.M., Friero, E., & Jouve, N. 2001. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. Plant breeding, 120, 513-517.

Hagio, T., Ichiri, S.S., & Yamada, T. 2002. Efficient plant regeneration through morphogenesis in Japanese commercial variety of wheat. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 38, 1394-1396.

Hess, J.R., & Carman, G. 1998. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant, environment, and endogenous hormone levels. Crop Science, 38, 249-253.

Jun-ying, C., Run-qing, Y., Hai-xian, X.U., & Xin-jian, C. 2006. Study on plant regeneration of wheat mature embryo under endosperm-supported culture. Agricultural Sciences in China, 5(8), 572-578.

Kacem, N.S., Delporte, F., Muhovski, Y., Djekoun, A., & Watillon, B. 2017. In vitro screening of durum wheat against water-stress mediated through polyethylene glycol. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(1), 239-247.

Kumar, R., Mamrutha, H.M., Kaur, A., Venkatesh, K., Grewal, A., Kumar, R., & Tiwari, V. 2017 Development of an efficient and reproducible regeneration system in wheat (Triticum aestivum L.). Physiology and Molecular Biology of Plants, 23(4), 945-954.

Kumar, P.P., & Loh, C.S. 2012. Plant Tissue Culture for Biotechnology. In Plant Biotechnology and Agriculture; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 131-138.

Ihsanshah, M., Jabeen, M., & Ilahi, I. 2003. Invitro callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Tritium aestivum* l.). Pakistan Journal of Botany, 35(2), 209-217.

Isayenkov, S.V. 2019. Genetic Sources for the Development of Salt Tolerance in Crops. Plant Growth Regulation, 89, 1-17.

Kintzios, S.E., Baeberaki, M., Aivalakis, G., S., Drossopoulos, J., & Olevase, C.D. 1996. In vitro morphogenetical response of mature wheat embryo to differential NaCl concentration and growth regulator treatment. Plant Breeding, 166, 113-118.

Karadimova, M., & Djambpva, G. 1993. Increased NaCl- tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. Durum* Desf) through in vitro selection. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 29, 180-182.

Al-Khayri, J.M., & Al-Bahrany, A.M. 2004. Growth, water content and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. Biologia Plantarum: 48(1). 105-108.

Maes, C.O., Chibbar, R.N., Caswell, K., Leung, N., & Kartha, K.K. (1996) Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. Plant Science, 121, 75-84.

Munns, R., Day, D.A., Fricke, W., Watt, M., Arsova, B., Barkla, B.J., Bose, J., Byrt, C.S., Chen, Z.H., & Foster, K.J. 2020. Energy Costs of Salt Tolerance in Crop Plants. New Phycologist, 225, 1072-1090.

Ozgen, M., Turet, M., Ozcan, S., & Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryo of winter durum wheat genotypes. Plant Breeding, 15, 455-458.

Ozgen, M., Birsin, M., & Benlioglu, B. 2017. Biotechnological characterization of a diverse set of wheat progenitors (*Aegilops* sp. and *Triticum* sp.) using callus culture parameters. Plant Genetic Resources, 15(1), 45-50.

Ozturk, A., Bulut, S., Haliloglu, K., & Tosun, M. 2005. Relationship between tissue culture and agronomic traits of winter wheat. Cereal Research Communication, 33, 469-476.

Rashid, H., Ghani, R.A., Chaudhry, Z., Naqvi, S.M., & Quraishi, A. 2002. Effect of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). Biotechnology 1, 46-54.

Saldarriaga, J.F., Cruz, Y., & López, J.E. 2020. Preliminary study of the production of metabolites from in vitro cultures of C. ensiformis. BMC Biotechnology 20, 49.

Tripathi, A.D., Mishra, R., Maurya, K.K., Singh, R.B., & Wilson, D.W. 2019. Estimates for World Population and Global Food Availability for Global Health. *In*: The Role of Functional Food Security in Global Health; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 3–24.

Valoppi, F., Agustin, M., Abik, F., Morais de Carvalho, D., Sithole, J., Bhattarai, M., Varis, J.J., Arzami, A.N., Pulkkinen, E., & Mikkonen, K.S. 2021. Insight on Current Advances in Food Science and Technology for Feeding the World Population. Frontiers in Sustainable Food Systems, 5, 626227.

Wijerathna-Yapa, A., Ramtekey, V., Ranawaka, B., & Basnet, B.R. 2022. Applications of in Vitro Tissue Culture Technologies in Breeding and Genetic Improvement of Wheat. Plants, 11, 2273.

Wijerathna-Yapa, A., & Hiti-Bandaralage, J. 2023. Tissue Culture—A Sustainable Approach to Explore Plant Stresses. Life, 13, 780.

Yu, Y., Wang, J., Zhu, M.L., & Wei, Z.M. 2008. Optimization of mature embryo based high frequency callus induction and plant regeneration from elite wheat cultivars grown in China. Plant Breeding, 127, 249-255.