نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ص. ۱۶۹-۱۵۶
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 2, Summer 2011, P. 156-169
ISSN: 2008 - 4730

بهره‌گیری از تنوع سوماکلون جهت ایجاد لاین‌های مقاوم به خشکی در ارقام هویج (*Daucus carota* L.)

کرامت ربیعی[1*]- محمود خدامباشی[2]- منصور امیدی[3]

تاریخ دریافت:۸۹/۲/۱۵
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۱/۱۲

چکیده

جهت استفاده از تنوع سوماکلون در ایجاد لاین‌های مقاوم به خشکی در ارقام هویج (*Daucus carota* L.)، تحقیقی در گروه بیوتکنولوژی موسسه ملی تحقیقات سبزیجات روسیه در سال ۸۸-۱۳۸۷به انجام رسید. بذور چهار رقم هویج که در ایران مورد کشت قرار می‌گیرند از موسسه تحقیقات سبزی و صیفی دزفول تهیه شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها در محیط گلدان، قطعات هیپوکوتیل جدا شده و با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم با غلظت ۱ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه استریل شده و در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D جهت رشد کالوس قرار گرفتند. کالوس‌های تکثیر یافته، به قطعاتی به اندازه ۲۵ میلی‌گرم تقسیم شده و برای افزایش ایجاد تنوع ژنتیکی با موتاژن شیمیایی نیتروزواتیل اوره در غلظت های صفر، ۰/۵، ۲ و ۸ میلی‌مولار تیمار شدند. این قطعات سپس در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول شامل صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد قرار گرفتند. میزان تغییر در خواص مورفوژنی و باززایی ریز نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده حاکی از آن بود که افزایش غلظت مواد فوق باعث کاهش رشد کالوس‌ها، از بین رفتن توانایی مورفوژنی و باززایی و حتی از بین رفتن کالوس‌ها می‌شود به نحوی که در غلظت ۲۰ و ۲۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول هیچ گیاهچه‌ای باززایی نشد و در غلظت ۸ میلی‌مولار موتاژن، تقریباً تمام کالوس‌ها از بین رفتند. با توجه به اینکه میزان فعالیت پراکسیداز و محتوای آب در برگ در لاین‌های مقاوم به خشکی بیشتر از لاین‌های حساس می‌باشند به همین دلیل از این دو آنالیز جهت تعیین میزان مقاومت لاین‌های باززایی شده استفاده شد. نتایج نشان داد که لاین‌های حاصل از غلظت‌های بالاتر پلی‌اتیلن-گلایکول که انتظار می‌رود لاین‌های مقاوم به شرایط تنش آبی باشند، میزان فعالیت پراکسیدازی و نیز میزان نگهداشت آب بیشتری نسبت به لاین‌های حاصل از غلظت‌های پایین داشتند.

واژه های کلیدی: تنوع سوماکلونال، پلی‌اتیلن‌گلایکول، هویج

مقدمه

هویج یک گیاه مدل برای انجام تحقیقات کشت بافت بوده است و در سال ۱۹۶۰ به عنوان یکی از اولین گیاهان برای تشریح توتیپتانسی (۴۳) و پس از آن به طور گسترده برای مطالعه باززائی مورد استفاده قرار گرفته است (۳۴). از طرفی تنش آبی یکی از بزرگترین محدودیت‌ها در رشد محصولات در نواحی خشک و نیمه‌خشک در تمامی نقاط جهان می‌باشد، چرا که نقش حیاتی در متابولیسم گیاه در همه مراحل رشد دارد (۴۵). هویج به تغییرات محیطی از جمله تنش خشکی بسیار حساس است و وقوع این تنش در هر مرحله‌ای از رشد عملکرد اقتصادی آن را تحت تأثیر شدید قرار می‌دهد (۴۷). بر اساس گزارش سورنسن (۴۰) تنش خشکی تنها به مدت ۳ هفته در هر مرحله از رشد هویج، عملکرد کل را به میزان زیاد کاهش می‌دهد.

مشکلات زیادی در ارزیابی‌های مزرعه‌ای برای مقاومت به خشکی وجود دارد، که از جمله آن‌ها می‌توان به شرایط اقلیمی غیر قابل کنترل، نایکنواختی خاک، نیاز به تعداد بوته زیاد، هزینه‌های آزمایشگاهی و صرف زمان زیاد اشاره نمود (۴۵). روش‌های غربال‌سازی آزمایشگاهی (یعنی در سطح پروتوپلاست، سلول، ریشه، ساقه و گیاهچه) آزمون‌های سریع و آسانی برای ارزیابی پاسخ ژنوتیپ‌ها به تنش خشکی می‌باشد. دو نیاز اساسی در اصلاح گیاهان، وجود تنوع ژنتیکی کافی و دسترسی به روش‌های انتخاب مناسب

۱و۲- استادیار و دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده مسئول: (Email: k_rabiei@yahoo.com
۳- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

می‌باشد. در مواردی که تنوع داخل گونه‌ای کم باشند، استفاده از اقوام وحشی، گونه‌های غیرخویشاوند و تکنیک‌های موتاسیونی روش‌هایی برای افزایش میزان تنوع می‌باشد (۱۴). اما در دهه‌های اخیر منبع دیگری از تنوع قابل استفاده، یعنی تنوع حاصل از کشت سلول و بافت‌های گیاهی (تنوع سوماکلونی) بوجود آمده است (۲۷). گزینش گیاهان مقاوم به تنش‌های مختلف می‌تواند از طریق قرار دادن عامل تنش‌زا در محیط کشت، با استفاده از سوسپانسیون سلولی، کالوس‌ها و بافت‌های تمایز نیافته عملی گردد (۱). تنوع سوماکلونی همراه با به کارگیری موتاژن‌ها در شرایط این‌ویترو، برای جداسازی لاین‌های متحمل به شوری و خشکی در زمان کم می‌تواند سودمند باشد (۳۷).

پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG) با وزن مولکولی بالا (MW ۶۰۰۰) از مدت ها پیش به عنوان عامل اسمزی که بدون نفوذ به داخل سلول گیاهی (مشابه با شرایط تنش که در خاک وجود دارد) ایجاد تنش کم آبی می‌کند، در انتخاب لاین‌های مقاوم در بسیاری از گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲، ۱۳ و ۲۶). پلی‌اتیلن‌گلایکول می‌تواند با جلوگیری از ورود آب به داخل گیاه شرایطی را مشابه تنش خشکی بوجود آورد به نحوی که به جز سلول‌هایی که دارای مکانیسمی ویژه برای جذب آب می‌باشند بقیه سلول‌ها آب کافی در اختیار نداشته باشند (۱۷). در محیط کشت، پلی‌اتیلن‌گلایکول قادر است تنش خشکی را مشابه با شرایط موجود در مزرعه و گلخانه اعمال نماید (۳۸).

یک سیستم انتخاب سلولی با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلایکول طی مرحله جنین‌زایی در یونجه به کار گرفته شد. شروع تولید فرآیند تولید جنین‌های سوماتیکی از شروع تا مرحله تولید جنین‌های کروی شکل، در محیط کشت حاوی پلی‌اتیلن‌گلایکول به انجام رسید. رشد و نمو جنین‌ها در مراحل بعدی تنها با حذف پلی‌اتیلن‌گلایکول امکان‌پذیر بود. در این آزمایش فقط چهار گیاهچه باززایی شده که پس از تکثیر به محیط گلدان انتقال داده شدند. مطالعات اولیه حاکی از تحمل بالای گیاهچه‌ها به تنش اسمزی در مقایسه با گیاهان پایه بود (۱۸).

سه لاین متحمل به خشکی در سویا با اعمال ۲۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول و از طریق جنین‌های سوماتیکی باززایی شدند (۲۲). انتخاب برای کالوس‌های چندین واریته گندم در محیط حاوی پلی‌اتیلن‌گلایکول با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد به طور موفقیت‌آمیزی باعث ایجاد پنج گیاهچه متحمل به خشکی گردید. پلی‌اتیلن‌گلایکول به مقدار معنی‌داری باعث کاهش رشد کالوس‌ها نیز شد (۳۳). آزمایش دیگر در برنج با استفاده از واریته های مختلف و با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلایکول با غلظت ۲۰ درصد انجام شد. ۲۲ گیاهچه از تمامی واریته‌ها به دست آمد که با بررسی آنها در شرایط گلخانه به شرایط خشکی متحمل بودند (۲۸). تنوع سوماکلون در ایجاد ارقام مقاوم به تنش خشکی در آرابیدوپسیس (۴۹)، آفتابگردان (۴۵)، گوجه (۲۵)، برنج (۶ و ۱۱) و در بسیاری از تحقیقات دیگر مورد استفاده قرار گرفته است.

از روش‌های مختلفی برای ارزیابی میزان مقاومت گیاهان به تنش کم‌آبی استفاده می‌شود که از جمله این روش‌ها می‌توان به میزان فعالیت پراکسیدازی و میزان توانایی نگهداشت آب اشاره نمود. قابلیت ساختاری گیاه برای مقابله با فعالیت‌های اکسیداتیو در شرایط تنش، می‌تواند از خسارت ناشی از تنش جلوگیری نماید و با مقاومت گیاه به این شرایط ارتباط دارد. بنابراین انتظار می‌رود مکانیسم‌هایی که تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (از جمله فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز) نقش مهمی را در ایجاد تحمل گیاه به شرایط تنش ایفا نمایند (۴۱). افزایش میزان فعالیت پراکسیداز در گیاهان تحت تنش خشکی توسط محققان بسیاری گزارش شده است (۱۹، ۲۰، ۲۴ و ۴۲).

توانایی حفظ آب در برگ نیز می‌تواند به عنوان روشی برای ارزیابی مقاومت به تنش خشکی موثر باشد ولی مفید بودن آن به عنوان تنها شاخص ارزیابی، مورد سوال است. این شاخص با نمونه‌برداری از برگ‌ها معمولاً در اوایل روز و تعیین میزان وزن آن بعد از قرار دادن آنها در شرایط تنش خشکی اندازه‌گیری می‌شود. درصد نگهداشت آب با در نظر گرفتن وزن اولیه و نهایی برگ‌ها محاسبه می‌گردد. مقدار بیشتر نگهداشت آب نتیجه مثبتی از مقاومت به تنش خشکی است (۳۹). بررسی میزان نگهداشت آب در لاین‌های باززایی شده بسیار مهم است چرا که طبق نتایج ارائه شده برگ‌های بریده شده از گیاهان حاصل از محیط این ویترو به خاطر ناتوانی آنها در بستن صحیح روزنه‌ها و یا نقص در کوتیکول به طور ممتد آب از دست می‌دهند (۲۳). چهار رقم گندم دوروم (*Triticum turgidum* spp. *durum*) با منشأ متفاوت جهت ارزیابی مقاومت به خشکی با در نظر گرفتن میزان نگهداشت آب در برگ‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. گیاهان در شرایط گلخانه و در محیط گلدان رشد یافتند و بلافاصله پس از رشد و نمو کامل برگ پرچم، این برگ‌ها برای بررسی میزان توانایی نگهداشت آب از گیاه جدا شدند. نتایج نشان داد که تفاوت‌های بارزی بین ارقام قابل مشاهده بود و ارقام مقاوم به خشکی نسبت به ارقام حساس از این نظر برتر بودند. ارقامی که عملکرد ضعیفی در شرایط مزرعه داشتند از نظر میزان نگهداشت آب در برگ نیز ضعیف بودند (۴۸).

هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان استفاده از تکنیک کشت بافت و تنوع سوماکلون در ایجاد لاین‌های مقاوم به شرایط تنش کمبود آب در هویج زراعی می‌باشد.

مواد و روش ها

بذور چهار رقم هویج که در ایران به طور رایج کشت می‌گردند از موسسه تحقیقات سبزی و صیفی دزفول تهیه شدند. این ارقام شامل مونارچ، نانتس ایمپرود، تم تم و ویلمورن هستند. تمامی مراحل این

تحقیق در گروه بیوتکنولوژی موسسه ملی تحقیقات سبزیجات روسیه (RAAS) واقع در شهر مسکو در سال ۸۸-۱۳۸۷ به انجام رسید.

بذور در محیط گلدان کشت شده و پس از سه هفته که گیاهچه‌ها رشد کافی نمودند، قسمت‌های هیپوکوتیل گیاهچه‌ها جدا شده و تحت عمل گندزدایی با استفاده از اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و محلول ۱٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. قطعاتی به طول ۰/۵ تا ۰/۷ سانتیمتر از قسمت هیپوکوتیل جدا شده و در محیط کشت MS که حاوی هورمون 2,4-D با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، ساکارز ۳۰ گرم در لیتر و آگار به میزان ۵ گرم در لیتر بود قرار داده شدند و تحت دمای ۲۵±۱°C، رطوبت ۸۰-۷۰ درصد و دوره نوری ۱۶/۸ (تاریکی/روشنایی) و در شدت نور ۱۰۰۰μmol m^{-2} sec^{-1} نگهداری شدند. پس از گذشت یک ماه، کالوس‌های حاصله به قطعات کوچک‌تر تقسیم شده و به محیط کشت جدید برای تکثیر انتقال یافتند.

جهت انجام انتخاب سلولی برای مقاومت به خشکی آزمایشی به صورت فاکتوریل (شامل غلظت‌های مختلف موتاژن و غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول) در قالب طرح کاملاً تصادفی و با اختصاص ۱۰ قطعه کالوس برای هر تیمار انجام شد. محیط‌های کشت مورد نظر شامل MSm، ساکارز (۳ درصد)، هورمون 2,4-D (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر)، آگار (۰/۵ درصد) و غلظت های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول (با وزن مولکولی ۶۰۰۰) شامل صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ درصد بودند. قرار دادن کالوس‌ها در محیط کشت، طبق روش موهمند و مورای (۳۱) به انجام رسید. جهت افزایش میزان تنوع ژنتیکی از موتاژن نیتروزواتیل اوره که یک موتاسیون‌زای قوی است با غلظت های صفر، ۰/۵، ۲ و ۸ میلی‌مولار طبق روش مصطفی و همکاران (۳۲) استفاده شد. نتایج حاصله شامل میزان ریخت‌زایی و جنین‌زایی پس از گذشت ۱ ماه ثبت شدند.

بعد از باززایی، گیاهچه‌های حاصل از مورفوژنی و جنین‌زایی از محیط کشت جدا شده و برای رشد بیشتر و تولید ریشه یا تقویت ریشه موجود، در لوله‌هایی که حاوی محیط MS (۵۰ درصد)، بدون هورمون و همراه با ۱۵ گرم در لیتر ساکارز بودند بر روی کاغذهای صافی قرار گرفتند. پس از اینکه گیاهچه‌ها رشد کافی نمودند به محیط گلدان حاوی خاک استریل انتقال داده شدند و مراحل سازگار نمودن گیاهچه‌ها به شرایط گلخانه انجام شد. پس از رشد کافی گیاهچه‌ها به مدت یک ماه، نمونه‌های برگ از گیاهچه‌های سالم جهت ارزیابی میزان فعالیت پراکسیداز و محتوای آب برگ جدا شدند. این آنالیزها جهت تعیین میزان مقاومت لاین‌ها به شرایط تنش خشکی مورد استفاده قرار گرفتند. انتظار می‌رود لاین‌هایی که دارای مقادیر بالاتری از این شاخص‌ها باشند دارای میزان مقاومت بیشتری باشند.

آنالیز پراکسیداز با استفاده از روش برگمیر و همکاران (۹) و با تهیه محلول‌های پیروگالول، پراکسیداز و بافر فسفات انجام شد. محصول واکنش پراکسید هیدروژن با پیروگالول در حضور آنزیم پراکسیداز، ماده‌ای تیره رنگ به نام پورپورگالین است که توانایی جذب نور UV با طول موج ۴۳۰ نانومتر را دارا می باشد. به همین دلیل از اسپکتروفتومتری برای برآورد میزان جذب نور در طول موج ۴۳۰ نانومتر و در نتیجه برآورد میزان پورپورگالین تولید شده استفاده می‌شود. با توجه به اینکه میزان جذب نور UV برای یک میلی‌مولار ماده تولید شده (پورپورگالین) برابر با ۲/۴۷ نانومتر می‌باشد (ε_{430} = 2.47 mM min^{-1} g^{-1})، پس از رابطه زیر می‌توان میزان غلظت پورپورگالین را بر حسب (μM min^{-1} g^{-1}) محاسبه نمود:

$$C_{\mu M\ min^{-1}g^{-1}} = \frac{D \times 10^4}{2.47 \times 5}$$

که در آن، D میزان جذب نور بدست آمده پس از گذشت ۵ دقیقه، ε = ۲/۴۷ و t = ۵ می‌باشند. مقدار بدست آمده برای هر لاین نیز به میزان غلظت پورپورگالین در رقم والد مربوط به هر لاین تقسیم می‌شود تا با لاین‌های دیگر قابل مقایسه باشد.

به دلیل اینکه از کلیه لاین‌های باززایی شده در آزمایش‌های انتخابی، جهت استخراج عصاره و اندازه‌گیری میزان فعالیت پراکسیدازی استفاده شد، به همین دلیل داده‌های حاصله به صورت طرح کاملاً تصادفی نامتعادل جهت تجزیه واریانس مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت برآورد میزان نگهداری آب در برگ نیز از روش دامی و هوگز (۱۷) استفاده شد. ابتدا آزمون بهینه‌سازی برای بدست آوردن غلظت مناسب پلی‌اتیلن‌گلایکول و زمان مناسب تیمار برگ‌ها انجام شد. برگ‌های تازه و بدون لکه در ابتدای صبح از ۳ گیاه سالم جدا شده و در غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول و در سه زمان ۱، ۲ و ۳ ساعت قرار داده شدند و مقدار تغییر در وزن برگ‌ها در ابتدا و انتهای آزمایش مشاهده و یادداشت‌برداری شد. تفاوت در نگهداری آب در برگ از تفاضل وزن ثانویه و اولیه محاسبه شد. پس از مشخص شدن غلظت و زمان اپتیمم این آزمایش برای تمامی لاین‌های باززایی شده، تکرار و با انجام تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل میزان تغییر در وزن برگ مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت‌های پلی‌اتیلن‌گلایکول بر مورفوژنی و رشد کالوس‌ها

استفاده از غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول در کشت کالوس چهار رقم هویج نشان داد که افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول، کاهش میزان ریخت‌زایی را در پی داشته است (جدول ۱). تفاوت قابل ملاحظه‌ای پس از اعمال غلظت ۱۵ درصد با دیگر تیمارها در تمامی

ارقام وجود دارد. به عنوان مثال در رقم مونارچ، درصد ریخت‌زایی از ۹۶ درصد در تیمار شاهد به ۵۶ درصد در تیمار ۱۵ (بدون اعمال موتاژن) کاهش یافته است. در اغلب موارد تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای صفر، ۵ و۱۰ و نیز بین تیمارهای ۲۰ و ۲۵ از این نظر مشاهده نشد. فشار اسمزی ۲۵ درصد بیشترین تأثیر را در کاهش ریخت‌زایی ایجاد نموده است چرا که وقتی کالوس‌ها با غلظت ۲ میلی‌مولار از موتاژن تیمار شده و تحت فشار اسمزی ۲۵ درصد نیز قرار گرفته‌اند توانایی باززایی به میزان زیادی کاهش یافته است به نحوی که در ارقام مونارچ و ویلمورن به طور کامل از بین رفته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از غلظت ۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول فشار انتخابی مناسبی را ایجاد می‌کند.

نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نسبت مورفوژنی بدست آمده در مقایسه با نمونه شاهد (در حالتی که از پلی‌اتیلن‌گلایکول در کشت کالوس‌ها استفاده نشده است) به ترتیب برای غلظت های مختلف موتاژن اعمال شده شامل صفر، ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار را نشان می‌دهند. همانطور که از این نمودارها مشهود است فقط در غلظت ۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول تفاوت قابل توجهی بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد و تنها این غلظت است که می‌تواند ژنوتیپ‌ها را از نظر میزان واکنش آنها به پلی‌اتیلن‌گلایکول اعمال شده متمایز نماید.

انجام تجزیه واریانس برای تغییر در وزن کالوس (اختلاف بین وزن کالوس‌ها قبل و بعد از اعمال موتاژن و پلی‌اتیلن‌گلایکول) و نیز مقایسات میانگین در جدول ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که در تمامی ارقام تفاوت معنی‌داری بین سطوح موتاژن، سطوح پلی‌اتیلن‌گلایکول و اثر متقابل بین آنها وجود دارد. مقایسات میانگین نشان می‌دهند که در همه ارقام به جز در رقم ویلمورن اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۵ و صفر درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول وجود ندارد. اما بقیه سطوح در تمامی ارقام و تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد هستند که دلیل بر نقش بازدارنده غلظت‌های بالای پلی‌اتیلن‌گلایکول در رشد کالوس دارد. در رقم ویلمورن، اختلاف معنی‌داری بین تفاوت وزن در غلظت ۵ درصدی پلی‌اتیلن‌گلایکول با نمونه شاهد مشاهده می‌شود که می‌تواند دلیل بر ضعف این رقم در تحمل تنش اسمزی باشد. با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول رشد کالوس‌ها به مقدار قابل توجهی کاهش پیدا نموده است به نحوی که به عنوان مثال در رقم مونارچ میزان تفاوت وزن کالوس در نمونه شاهد ۱۵/۹ میلی‌گرم است در صورتی که این مقدار برای غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد به ترتیب به مقادیر ۱۵/۲، ۹/۸، ۷/۹، ۴ و ۲/۱ کاهش پیدا کرده است. وقتی که کالوس‌ها تحت تنش اسمزی به میزان ۲۵ درصد و نیز تحت تأثیر موتاژن با غلظت ۲ میلی‌مولار قرار گرفتند، رشد کالوس به طور کامل متوقف شده است.

نتایج این آزمایش حاکی از آن بود که افزودن پلی‌اتیلن‌گلایکول به محیط کشت MS پتانسیل اسمزی را در محیط کاهش داده و باعث تنش رطوبتی گردید و در نتیجه منجر به کاهش رشد کالوس و توانایی باززایی شد. در سویا (۳۵)، گندم (۵) و یونجه (۲) نیز نشان داده شد که افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول، کاهش در تعداد گیاهچه‌های زنده و پایدار را منجر می‌شود (۲۵). کاهش در میزان رشد کالوس و میزان باززایی گیاهچه‌ها در حضور پلی‌اتیلن‌گلایکول در گزارشات دیگر نیز اعلام شده است (۶، ۱۰، ۱۵، ۲۱، ۲۹ ، ۳۰ و ۴۴).

میزان تغییر در باززایی به عنوان پارامتر مناسبی جهت ارزیابی تأثیر تنش خشکی بر گیاه در آزمایش انتخاب سلولی گندم نیز مورد استفاده قرار گرفت و نیز نشان داده شد که وزن نسبی کالوس‌ها به طور بسیار معنی‌داری تحت تأثیر تفاوت های ژنتیکی بین ارقام و نیز غلظت های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول بود (۴).

در محیط‌های انتخابی دیگر از جمله محیط انتخابی برای شوری نیز توقف رشد کالوس گزارش شده است به نحوی که با افزایش تیمار تنش شوری، اندازه کالوس در ارقام حساس کاهش یافت در صورتی که تنش شوری تأثیری بر اندازه کالوس ارقام مقاوم نداشت (۳).

در کل آزمایش انتخاب سلولی برای مقاومت به تنش خشکی ناشی از اعمال پلی‌اتیلن‌گلایکول تعداد ۱۳۴ لاین باززایی شدند. با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول تعداد نمونه‌های باززایی شده کاهش یافت. تعداد ۴۳، ۳۷، ۲۸ و ۲۶ لاین به ترتیب از محیط حاوی صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول به دست آمدند. در تیمار نمونه‌ها با غلظت ۲۰ و ۲۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول هیچ لاینی باززایی نشد که دلیل بر تأثیر منفی غلظت‌های بالای پلی‌اتیلن‌گلایکول بر توانایی باززایی در محیط کشت دارد. در این تیمارها نیز ساقه‌ها و جنین‌های سوماتیکی ضعیفی به دست آمده‌اند که امکان تبدیل آنها به گیاهچه‌های کامل وجود نداشت.

تأثیر غلظت‌های موتاژن بر مورفوژنی و رشد کالوس‌ها

میزان تولید کالوس‌های مورفوژن همچنین تحت تأثیر موتاژن قرار گرفته است به نحوی که هرچه غلظت موتاژن اعمال شده بیشتر بوده است، درصد مورفوژنی کاهش پیدا کرده است (جدول ۱). استفاده از موتاژن با غلظت ۸ میلی‌مولار منجر به از بین رفتن تمامی کالوس‌ها در همه ارقام شد. به همین دلیل توصیه می‌شود از غلظت ۸ میلی‌مولار این موتاژن (NEU) در تحقیقات آتی استفاده نشود.

در حالتی که از پلی‌اتیلن‌گلایکول در محیط کشت استفاده نشده، مقایسه کالوس‌هایی که تحت تیمار با غلظت‌های مختلف موتاژن قرار گرفته‌اند نشان می‌دهد که با افزایش غلظت موتاژن میزان مورفوژنی کاهش پیدا کرده است. به عنوان مثال در رقم مونارچ درصد کالوس-های مورفوژن در حالتی که در محیط بدون پلی‌اتیلن‌گلایکول رشد

کرده و تحت تیمار با موتاژن قرار نگرفته‌اند ۹۶ درصد می‌باشد، در حالیکه در کالوس‌های تحت تیمار با ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار موتاژن این مقدار به ترتیب به ۹۰ و ۴۷ درصد کاهش پیدا کرده است. در همه ارقام تفاوت بین تیمارهای صفر و ۰/۵ میلی‌مولار از نظر آماری معنی-دار نیست اما تفاوت بین ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار معنی‌دار است.

زمانی که از پلی‌اتیلن‌گلایکول با غلظت ۵ درصد در محیط کشت استفاده شد، میزان مورفوژنی کالوس‌ها کاهش یافت. نقش موتاژن در کاهش میزان مورفوژنی در کالوس‌های رشدیافته دراین محیط مشابه با حالت قبل قابل توجه است. کالوس‌های حاصل از رقم مونارچ در این محیط زمانی که تحت تیمار با موتاژن نبوده‌اند میزان ۹۰ درصد مورفوژنی نشان دادند، در حالیکه کالوس‌های تحت تیمار با موتاژن با غلظت ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار به ترتیب دارای ۸۶ درصد و ۴۰ درصد مورفوژنی بودند. در اینجا نیز تفاوت بین تیمارهای صفر و ۰/۵ میلی-مولار موتاژن معنی‌دار نیستند اما تفاوت بین غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار معنی‌دار است. روند مشابهی در بین کالوس‌های بقیه ارقام (رشدیافته در محیط حاوی ۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول) مشاهده شد. با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول در محیط کشت به غلظت‌های بالاتر باز هم روند مشابهی از نظر کاهش میزان مورفوژنی با افزایش غلظت موتاژن مشاهده می‌شود. در اینجا هم می‌توان به امکان استفاده از غلظت ۲ میلی‌مولار موتاژن جهت القاء موتاسیون قابل استفاده در محیط کشت اشاره نمود.

مقایسه میانگین وزن کالوس‌هایی که در محیط کشت بدون پلی-اتیلن‌گلایکول رشد کرده‌اند (جدول ۳) نشان می‌دهد که با افزایش غلظت موتاژن، وزن کالوس‌های تولید شده به مقدار معنی‌داری کاهش پیدا کرده است. باید توجه داشت به دلیل اینکه پلی‌اتیلن-گلایکول نیز در روند رشد کالوس‌ها تأثیر می‌گذارد، در مقایسه اثر غلظت‌های مختلف موتاژن، می‌بایست میزان وزن کالوس را در غلظت ثابتی از پلی‌اتیلن‌گلایکول مدنظر قرار داد. به عنوان مثال در رقم مونارچ میانگین تغییر در وزن کالوس‌های رشد یافته در محیط شاهد ۱۵/۹ میلی‌گرم می‌باشد که این مقدار به ۱۴/۲ و ۸/۱ میلی‌گرم برای کالوس‌هایی که تحت تیمار موتاژن با غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار و در محیط بدون پلی‌اتیلن‌گلایکول رشد یافته‌اند کاهش پیدا کرده است. تفاوت بین وزن کالوس‌های تیماریافته با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار تفاوت معنی‌داری با غلظت صفر میلی‌مولار ندارند، اما تفاوت معنی-داری بین غلظت‌های ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار مشاهده می‌شود. روند مشابهی برای کالوس‌های رشدیافته در محیط‌های حاوی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول وجود دارد و در هر کدام از محیط‌های ذکر شده با افزایش غلظت موتاژن توقف رشد کالوس‌ها بیشتر بوده است. این موضوع برای رقم تم تم در غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول مستثنی است چرا که تفاوت معنی-داری بین میانگین کالوس‌های تیمار شده با غلظت صفر و ۰/۵ میلی-مولار موتاژن مشاهده می‌شود. علت این موضوع می‌تواند تفاوت ژنوتیپ‌ها در واکنش به موتاژن باشد. رشد کالوس‌های ارقام نانتس ایمپرود، تم تم و ویلمورن، پس از تیمار با موتاژن (غلظت ۲ میلی-مولار) و قرار گرفتن در محیط کشت حاوی ۲۵ درصد پلی‌اتیلن-گلایکول به طور کامل متوقف شد. رشد کالوس‌های این ارقام در حالتی که تحت تیمار با موتاژن قرار نگرفتند و یا غلظت ۰/۵ میلی-مولار موتاژن استفاده شد و در محیط کشت حاوی ۲۵ درصد پلی-اتیلن‌گلایکول قرار گرفتند نیز کاهش یافت اما متوقف نشد. نکته قابل توجه نبود تفاوت معنی‌دار بین میانگین وزن کالوس‌های رشد یافته رقم مونارچ در محیط حاوی ۲۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول در حالتی که تحت تیمار موتاژن با غلظت ۲ میلی‌مولار قرار گرفتند (۱ میلی‌گرم) با تیمار بدون اعمال موتاژن (۲/۱) است. هرچند باز هم کاهش تولید کالوس مشاهده می‌شود اما تفاوت معنی‌دار نیست. به نظر می‌رسد موتانت‌های حاصل از به کارگیری موتاژن در این رقم، توانایی بالایی جهت رشد در شرایط تنش دارند. کاهش جزئی وزن کالوس‌ها در این مورد می‌تواند به دلیل اثرات منفی تیمار کالوس‌ها با موتاژن باشد. به طور کلی با توجه به این مشاهدات می‌توان نتیجه گرفت که موتاژن باعث کاهش میزان مورفوژنی و رشد کالوس‌ها شده است.

تأثیر منفی موتاژن بر میزان رشد و توسعه کالوس‌ها در تحقیقات دیگر نیز بیان شده است. در تحقیقی توسط ویکاس (۴۶) از دو نوع موتاژن شیمیایی در قالب آزمایش‌های جداگانه در محیط انتخابی برای یافتن لاین‌های مقاوم به شوری در شبدر قرمز استفاده شد. آنها نشان دادند که موتاژن تأثیر منفی بر توسعه کالوس‌ها داشت به نحوی که رشد کالوس‌ها را کاهش داده و باعث ظهور نقاط نکروزی بر روی سطح آنها شد. در این تحقیق بر لزوم حصول نسل بعد برای بررسی انتقال و بروز مقاومت در نسل جدید تأکید شد.

افراسیاب و اقبال (۷) از موتاژن جهت افزایش تنوع ژنتیکی در کالوس‌های کشت شده در محیط کشت استفاده کردند و نشان دادند که میزان تنوع در لاین‌های باززایی شده تحت تأثیر ژنوتیپ می‌باشد. آنها همچنین بیان نمودند که رشد کالوس‌هایی که تحت تیمار با موتاژن قرار گرفته‌اند نسبت به کالوس‌های رشدیافته در محیط شاهد کاهش پیدا نموده که علت آن را تأثیر مخرب موتاژن در تولید و فعالیت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از جمله سیتوکینین‌ها دانستند.

از موتاژن و انتخاب سلولی برای تولید لاین‌های مقاوم به شوری در برنج استفاده شد (۳۶). تعداد کالوس‌های متحمل به شرایط تنش شوری و میزان رشد کالوس‌ها در کالوس‌هایی که تحت تیمار موتاژن (اشعه گاما) قرار گرفته بودند به مقدار معنی‌داری بیشتر از کالوس‌هایی بود که تحت تیمار با موتاژن قرار نگرفته بودند. رشد کالوس‌هایی که تحت تیمار با موتاژن بودند در مقایسه با دیگر کالوس‌ها، در غلظت‌های بالاتری از نمک متوقف شدند. در شرایط وجود تنش شوری کالوس‌های موتانت به میزان ۵ درصد باززایی نشان دادند در صورتی که کالوس‌های دیگر هیچ‌گونه باززایی مشاهده نشد. از مجموع ۲۷ لاین باززایی شده از کالوس‌هایی که تحت تیمار با موتاژن بوده‌اند، فقط ۲ لاین در نسل بعد مقاومت حدواسطی را به تنش

شوری در محیط مزرعه نشان دادند.

جهت تعیین مهمترین فاکتورهای مؤثر در ایجاد تغییر وزن کالوس‌ها و توجیه بهتر این روابط، از رگرسیون مرحله‌ای وزن کالوس به عنوان متغیر تابع و غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول، موتاژن و ارقام به عنوان متغیرهای مستقل استفاده شد (جدول ۴). نتایج نشان می‌دهند که موتاژن با ضریب رگرسیونی ۰/۶۳- ، ۳۹ درصد از تغییرات وزن را نیز توجیه می‌کند. علامت منفی ضریب رگرسیون نشان دهنده این است که افزایش غلظت موتاژن باعث کاهش رشد کالوس‌ها شده است. متغیر دیگری که وارد مدل شده است، غلظت-های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول است که با ضریب رگرسیونی ۰/۵۸- و با توجیه ۳۴ درصدی تغییرات، پس از موتاژن، نقش موثری را در تغییرات وزن کالوس داشته است. با توجه به این بررسی، نوع ژنوتیپ تأثیرات معنی‌داری در تغییرات وزن کالوس نداشته و به همین دلیل در مدل رگرسیونی وارد نشده است.

میزان فعالیت پراکسیداز در لاین‌های حاصل از محیط انتخابی با پلی‌اتیلن‌گلایکول

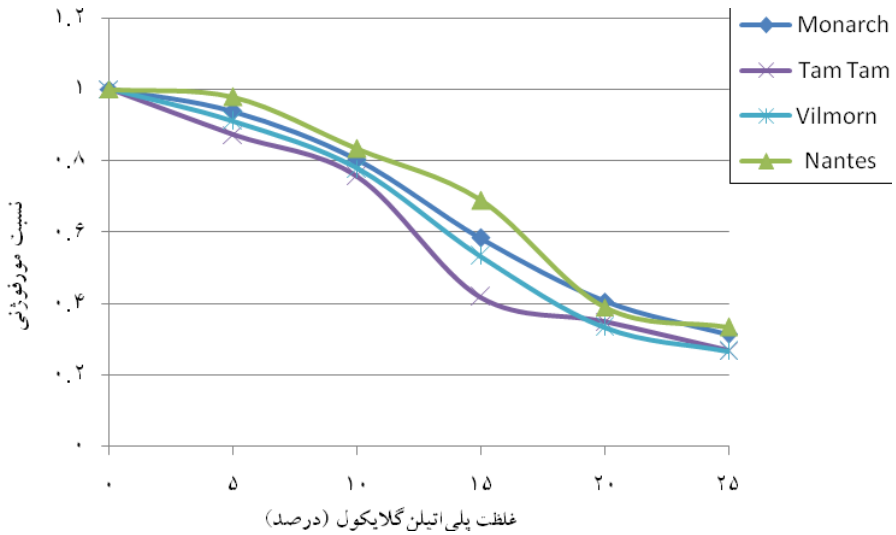
در این آزمایش از چهار رقم مختلف استفاده شده است که به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی هر کدام دارای میزان فعالیت پراکسیدازی متفاوتی هستند و بالطبع این موضوع بر مقدار بروز این صفت در لاین‌های بدست آمده از این ارقام تأثیر می‌گذارد. به همین دلیل مقادیر بدست آمده برای میزان فعالیت پراکسیداز در لاین‌ها به مقدار آن در گیاه پایه (والد) تقسیم شد تا نسبتی از میزان فعالیت پراکسیدازی بدست آید و کلیه تجزیه و تحلیل های آماری بر مبنای داده های جدید انجام شد.

نتایج جدول ۵ نشان دهنده آن است که تفاوت معنی‌داری بین لاین‌های حاصل از محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول و نیز بین لاین‌هایی که تحت تیمار با غلظت‌های مختلف موتاژن بوده‌اند، وجود دارد. جدول ۶ مقایسه میانگین تیمارهای مختلف را نشان می‌دهد. میانگین فعالیت پراکسیدازی (POA) گیاهچه‌هایی که از محیط حاوی ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول باززایی شده‌اند تفاوت معنی‌داری با سطح شاهد دارند. وجود فعالیت پراکسیدازی در لاین‌های باززایی شده از محیط شاهد دلالت بر وجود این مکانیسم در کلیه سلول‌هایی گیاهی حتی در شرایط بدون تنش می‌باشد.

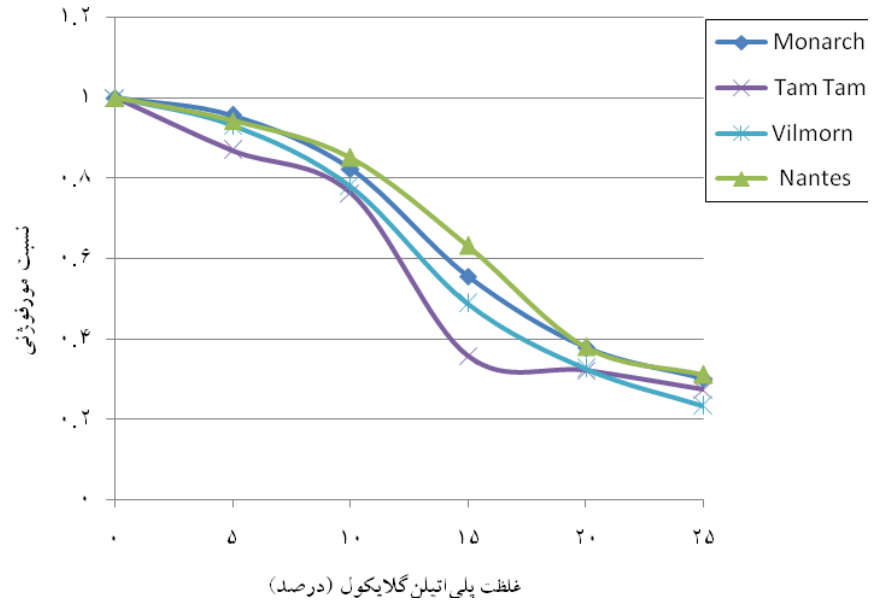
جدول ۱- درصد کالوس‌های مورفوژن بدست آمده پس از اعمال موتاژن و پلی‌اتیلن‌گلایکول در چهار رقم هویج

غلظت موتاژن (میلی‌مولار)	غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول (٪)	ارقام			
		تم تم	مونارچ	نانتس‌ایمپرود	ویلمورن
۰	۰	۹۰	۹۶	۹۰	۸۶
	۵	۸۲	۹۰	۸۸	۷۵
	۱۰	۷۰	۷۷	۷۵	۶۵
	۱۵	۴۸	۵۶	۶۲	۳۶
	۲۰	۳۰	۳۹	۳۵	۳۰
	۲۵	۲۴	۳۰	۳۰	۲۳
۰/۵	۰	۸۶	۹۰	۸۷	۸۴
	۵	۸۰	۸۶	۸۲	۷۳
	۱۰	۶۷	۷۴	۷۴	۶۴
	۱۵	۴۲	۵۰	۵۵	۳۰
	۲۰	۲۸	۳۴	۳۳	۲۷
	۲۵	۲۰	۲۷	۲۷	۲۳
۲	۰	۵۲	۴۷	۴۰	۳۶
	۵	۴۳	۴۰	۳۶	۳۰
	۱۰	۳۶	۳۳	۳۲	۲۶
	۱۵	۲۱	۱۰	۲۰	۱۰
	۲۰	۱۷	۷	۱۴	۷
	۲۵	۱۰	۰	۶	۰

$LSD_{0.05}$ = ۱۲/۳ , $LSD_{0.01}$ = ۱۶/۱



شکل ۱- مورفوژنی ارقام هویج در غلظت‌های پلی‌اتیلن‌گلایکول در مقایسه با تیمار بدون پلی‌اتیلن‌گلایکول در غلظت صفر میلی‌مولار موتاژن (NEU)

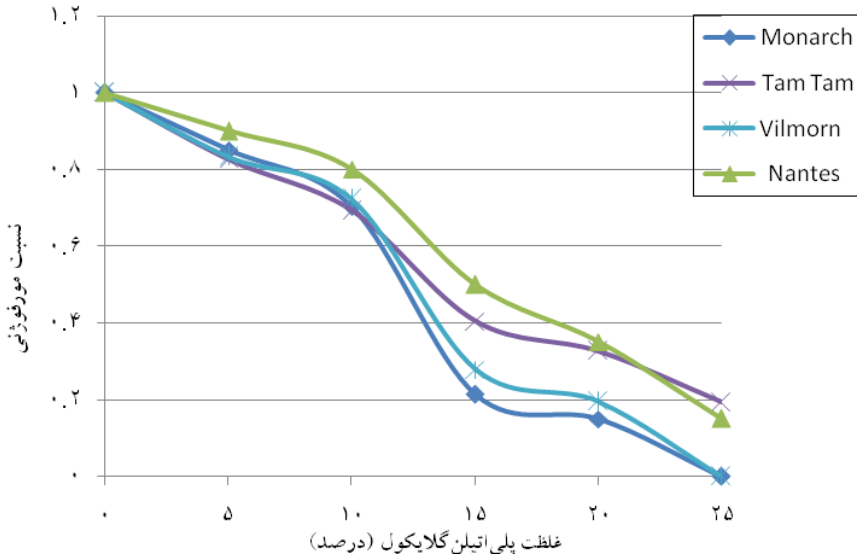


شکل ۲- مورفوژنی ارقام هویج در غلظت‌های پلی‌اتیلن‌گلایکول در مقایسه با تیمار بدون پلی‌اتیلن‌گلایکول در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار موتاژن (NEU)

فعالیت پراکسیدازی، یکی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه است که سلول را در مواجهه با شرایط تنش، یاری می‌کند. هرچه میزان تنش محیطی بیشتر باشد سلول‌هایی که دارای میزان فعالیت پراکسیدازی بیشتری باشند (سلول‌های مقاوم) پتانسیل بیشتری جهت غلبه بر شرایط دارند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که میزان فعالیت پراکسیدازی در لاین‌های باززایی شده از محیط‌های با غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول متفاوت است. لاین‌هایی که از محیط با غلظت بالاتر پلی‌اتیلن‌گلایکول باززایی شدند دارای میزان فعالیت پراکسیدازی بیشتری نسبت به لاین‌های باززایی شده از غلظت‌های پایین‌تر می‌باشند. به همین دلیل با توجه به میزان فعالیت پراکسیدازی

بیشتر در لاین‌های حاصل از محیط حاوی ۱۵ درصد پلی‌اتیلن-گلایکول، انتظار می‌رود این لاین‌ها نسبت به لاین‌های باززایی شده از محیط با ۱۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول و غلظت‌های پایین‌تر، به شرایط تنش خشکی متحمل‌تر باشند. برتری لاین‌های حاصل از غلظت‌های بالاتر، به علت تغییرات ژنتیکی ناشی از تنوع سوماکلون یا تنوع القا شده توسط موتاژن می‌باشد و پلی‌اتیلن‌گلایکول نقشی در ایفای مقاومت به سلول‌ها ندارد و تنها به عنوان عامل انتخاب و ایجاد کننده تنش اسمزی جهت غربال‌سازی سلول‌های مقاوم در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفته است.

با دقت بر میانگین فعالیت پراکسیدازی در لاین‌های حاصل از اعمال تیمارهای موتاژن و لاین‌های حاصل از محیط شاهد (بدون اعمال موتاژن) مشاهده می‌شود که غلظت ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار موتاژن تفاوت معنی‌داری با همدیگر ندارند، اما متوسط میزان فعالیت پراکسیدازی در لاین‌های حاصل از این تیمارها تفاوت معنی‌داری با لاین‌های حاصل از محیط شاهد دارند (جدول ۶). می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از موتاژن در ایجاد تغییرات ژنتیکی برای افزایش فعالیت پراکسیداز موثر بوده است. با توجه به اینکه براساس توضیحات قبل، لاین‌هایی از محیط حاوی غلظت ۱۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول باززایی شده‌اند که دارای فعالیت پراکسیدازی بالایی هستند، انتظار می‌رود افزایش فعالیت پراکسیدازی در این لاین‌ها ناشی از تغییرات ژنتیکی القا شده توسط موتاژن باشد و تنوعات سوماکلونال یا اثرات اپی‌ژنتیکی در این زمینه نقش کمتری داشته باشند.



شکل ۳- مورفوژنی ارقام هویج در غلظت‌های پلی‌اتیلن‌گلایکول در مقایسه با تیمار بدون پلی‌اتیلن‌گلایکول در غلظت ۲ میلی‌مولار موتاژن (NEU)

جدول ۲- تجزیه واریانس تغییر در وزن کالوس پس از تیمار کالوس‌ها با غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
رقم	۳	۲۱۰/۳۲**
موتاژن	۲	۱۵۳۷/۱۲**
پلی‌اتیلن‌گلایکول	۵	۲۶۶۱/۰۵**
رقم × موتاژن	۶	۹۰/۰۸**
رقم × پلی‌اتیلن‌گلایکول	۱۵	۴۱/۴۲**
موتاژن × پلی‌اتیلن‌گلایکول	۱۰	۶۰/۷۹**
رقم × موتاژن × پلی‌اتیلن‌گلایکول	۳۰	۱۴/۵۱**
خطا	۶۴۸	۲/۲۲

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۳- مقایسه میانگین وزن کالوس پس از تیمار کالوس‌ها با غلظت‌های پلی‌اتیلن‌گلایکول و موتاژن (NEU)

موتاژن (میلی‌مولار)	پلی‌اتیلن‌گلایکول (٪)	ارقام			
		مونارچ	نانتس ایمپرود	تم تم	ویلمورن
۰	۰	۱۵/۹	۲۰/۹	۱۴/۸	۱۲/۸
	۵	۱۵/۲	۱۹/۳	۱۴/۱	۱۰/۸
	۱۰	۹/۸	۱۴/۹	۱۱/۵	۸/۷
	۱۵	۷/۹	۵/۱	۱۰/۸	۵
	۲۰	۴	۳/۲	۵/۱	۳/۲
	۲۵	۲/۱	۲/۲	۳/۱	۲/۲
۰/۵	۰	۱۴/۲	۱۹/۳	۱۳	۱۱/۷
	۵	۱۳/۷	۱۸/۳	۱۱/۶	۹/۲
	۱۰	۸/۸	۱۳/۲	۹/۹	۸/۳
	۱۵	۷	۵/۲	۵/۲	۳/۸
	۲۰	۳/۸	۳/۲	۴	۱/۹
	۲۵	۱	۲/۱	۲/۱	۱/۷
۲	۰	۸/۱	۹/۵	۷/۲	۱۰/۳
	۵	۷/۱	۹/۴	۶/۷	۸/۳
	۱۰	۴/۱	۵/۶	۴/۳	۶/۷
	۱۵	۱/۱	۳/۳	۱/۹	۳/۳
	۲۰	۲	۲/۲	۰	۲/۹
	۲۵	۱	۰	۰	۰

$LSD_{0.05}$ = ۱/۳, $LSD_{0.01}$ = ۱/۷

جدول٤- رگرسیون مرحله‌ای وزن کالوس به عنوان متغیر تابع و غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول، موتاژن و ارقام به‌عنوان متغیرهای مستقل

مرحله	متغیر وارد شده به مدل	پارامترهای استاندارد مدل	R^2 جزء	R^2 مدل
۱	موتاژن	-۰/۶۳**	۰/۳۹	۰/۳۹
۲	پلی‌اتیلن‌گلایکول	-۰/۵۸**	۰/۳۴	۰/۷۳

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

بنابراین جهت افزایش تولید پراکسیداز در بافت لاین‌های حاصل از محیط این ویترو و در نتیجه امکان تولید لاین‌های متحمل‌تر به شرایط تنش خشکی استفاده از غلظت ۰/۵ یا ۲ میلی‌مولار موتاژن (نیتروزو اتیل اوره) توصیه می‌شود. مقایسه میانگین اثرات پلی‌اتیلن‌گلایکول× موتاژن نشان می‌دهد که بیشترین مقدار فعالیت پراکسیداز در لاین‌های باززایی شده از محیط حاوی ۱۵ درصد پلی-اتیلن‌گلایکول که تحت تیمار با موتاژن با غلظت ۲ میلی‌مولار حاصل شده‌اند وجود دارد. در هر سطح پلی‌اتیلن‌گلایکول تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای موتاژن وجود ندارد که نشان‌دهنده این است که هرچند استفاده از غلظت ۲ میلی‌مولار موتاژن تأثیر بیشتری در افزایش فعالیت پراکسیدازی داشته، اما تنوعات سوماکلونی هم می‌توانند در ایجاد تغییرات ژنتیکی تأثیر داشته و ایجاد جهش‌های مفید از جمله باعث افزایش فعالیت پراکسیدازی شوند. در همه تیمارها نیز تفاوت معنی‌دار از این نظر با تیمار شاهد وجود دارد. تحقیقات انجام شده در گیاهان دیگر نیز نشان‌دهنده این است که لاین‌های مقاوم انتخاب شده طی فرایند انتخاب سلولی نسبت به لاین‌های حساس دارای فعالیت پراکسیدازی بیشتری هستند (۱۹ و ۴۲).

آزمون توانایی حفظ آب در برگ در لاین‌های حاصل از انتخاب برای مقاومت به پلی‌اتیلن‌گلایکول

از این آزمون به عنوان معیاری جهت ارزیابی لاین‌ها در مقابل تنش اسمزی و تعیین مقاوم‌ترین آنها استفاده شد. پیش از انجام این آزمون لازم بود شرایط ایجاد تنش رطوبتی از نظر غلظتی از پلی‌اتیلن‌گلایکول که می‌بایست اعمال شود و نیز مدت زمانی که نمونه‌های برگ در معرض این عامل اسمتیک قرار گیرند تعیین می-شد. به همین خاطر آزمایشی با تهیه غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۵ درصد از محلول پلی‌اتیلن‌گلایکول انجام شد. نمونه‌های برگ

(تقریباً ۱۵۰ میلی‌گرم) از سه لاین ۲۰، ۲۱ و ۲۲ به عنوان نمونه جدا شده و به مدت ۱، ۲ و ۳ ساعت در معرض این ماده قرار گرفتند. نتایج این آزمایش در جدول ۷ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصله غلظت‌های صفر، ۵ و ۱۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول مکش اسمزی لازم را جهت ایجاد تنش در بافت برگ‌های هر سه لاین و در هر سه زمان ۱، ۲ و ۳ ساعت ایجاد نکرده است و برگ‌ها آب جذب کرده‌اند. این حالت در غلظت ۱۵ درصد و زمان‌های ۱ و ۲ ساعت و نیز غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ درصد در زمان ۱ ساعت نیز وجود دارد.

با افزایش غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول و مدت زمانی که برگ‌ها تحت تنش اسمزی حاصل از این ماده قرار گرفته‌اند میزان تنش اسمزی افزایش یافته است و برگ‌ها آب کمتری جذب کرده‌اند به نحوی که در غلظت ۲۰ و ۲۵ درصد و در زمان‌های ۲ و ۳ ساعت مشاهده شد که برگ‌ها آب از دست داده‌اند. بیشترین میزان آب از دست دادگی در غلظت ۲۵ درصد و زمان ۳ ساعت مشاهده شد. به همین دلیل جهت ایجاد تنش اسمزی کافی برای تمایز بین لاین‌های مختلف از نظر میزان مقاومت آن‌ها به آب از دست دادگی ناشی از فشار پلی‌اتیلن‌گلایکول، غلظت ۲۵ درصد پلی‌اتیلن‌گلایکول و مدت زمان ۳ ساعت برای ادامه آزمایش انتخاب شدند.

جداول ۸ و ۹ نتایج تجزیه واریانس و مقایسات میانگین برای نسبت آب از دست دادگی در تمامی لاین‌های باززایی شده در این آزمایش را نشان می‌دهد. چون لاین‌ها از گیاهان پایه متفاوتی باززایی شده‌اند و توانایی ژنتیکی ارقام اولیه در نگهداشت آب متفاوت است به همین دلیل میزان آب از دست دادگی ارقام پایه نیز اندازه گیری شد و در نهایت میزان از دست رفتن آب در لاین‌های مختلف نسبت به رقم پایه مورد محاسبه قرار گرفت و اعداد به دست آمده مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند ولی در جدول مقایسه میانگین مقادیر اصلی آب از دست دادگی نشان داده شده است.

نتایج نشان می‌دهند که تنها در لاین‌هایی که از سطوح مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول باززایی شده‌اند تفاوت معنی داری از نظر میزان نگهداشت آب وجود دارد و اعمال موتاژن نقشی در ایجاد تغییر در این صفت در لاین‌های بدست آمده نداشته است. از نظر سطوح مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول نیز فقط در سطح ۱۵ درصد تفاوت معنی‌دار بین میانگین آب از دست دادگی لاین‌ها با سطح شاهد وجود دارد.

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس برای مقدار فعالیت پراکسیداز در لاین‌های حاصل از محیط انتخابی حاوی پلی‌اتیلن‌گلایکول

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
پلی‌اتیلن‌گلایکول	۳	۲/۰۰۳**
موتاژن	۲	۰/۰۶۶*
پلی‌اتیلن‌گلایکول × موتاژن	۶	۰/۰۰۴**
خطا	۱۲۲	۰/۰۱۸

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ٦- مقایسه میانگین مقادیر فعالیت پراکسیداز در تیمارهای مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول و موتاژن

پلی‌اتیلن-گلایکول (٪)	موتاژن (میلی‌مولار)	فعالیت پراکسیداز ($\mu M\ min^{-1}g^{-1}$)	موتاژن (میلی‌مولار)	فعالیت پراکسیداز ($\mu M\ min^{-1}g^{-1}$)	پلی‌اتیلن-گلایکول (٪)	فعالیت پراکسیداز ($\mu M\ min^{-1}g^{-1}$)
۰	۰	۷۵/۲ g	۰	۱۰۱/۲ b	۰	۷۶/۹ d
۰	۰/۵	۷۷/۹ g	۰/۵	۱۰۴/۹ a	۵	۹۴/۲ c
۰	۲	۷۸/۵ fg	۲	۱۰۷/۲ a	۱۰	۱۱۵/۹ b
۵	۰	۷۸/۳ ef			۱۵	۱۳۰/۸ a
۵	۰/۵	۹۳/۷ de				
۵	۲	۱۰۱/۶ cd				
۱۰	۰	۱۱۳/۱ bc				
۱۰	۰/۵	۱۱۵/۹ b				
۱۰	۲	۱۱۸/۸ ab				
۱۵	۰	۱۲۹/۳ a				
۱۵	۰/۵	۱۳۱/۰ a				
۱۵	۲	۱۳۲/۱ a				

جدول ۷- میزان تغییر در محتوای آب برگ (میلی‌گرم) در سه لاین باززایی شده که تحت تنش اسمزی در محیط حاوی پلی‌اتیلن‌گلایکول قرار

گرفته‌اند

زمان (ساعت)	لاین	غلظت پلی‌اتیلن‌گلایکول (٪)					
		۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵
۱	۲۰	۹	۸	۷	۶	۲	۰
۱	۲۱	۱۱	۱۰	۸	۷	۵	۲
۱	۲۲	۶	۶	۵	۴	۳	۱
۲	۲۰	۹	۸	۷	۵	−۱	−۳
۲	۲۱	۹	۶	۴	۳	−۲	−۴
۲	۲۲	۷	۶	۴	۱	−۳	−۵
۳	۲۰	۸	۶	۳	−۱	−۳	−۶
۳	۲۱	۱۰	۷	۱	−۳	−۵	−۸
۳	۲۲	۷	۵	۲	−۲	−۷	−۹

جدول ۸- تجزیه واریانس برای نسبت آب از دست رفته از برگ

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
پلی‌اتیلن‌گلایکول	۳	۰/۳۳**
موتاژن	۲	۰/۰۵ ns
پلی‌اتیلن‌گلایکول × موتاژن	۶	۰/۰۲ ns
اشتباه آزمایشی	۱۲۲	۰/۰۷

** و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیر معنی‌دار

جدول ۹- مقایسه میانگین نسبت آب از دست رفته برگ (میلی‌گرم) در تیمارهای مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول و موتاژن

پلی‌اتیلن‌گلایکول (٪)	موتاژن (میلی‌مولار)	آب از دست رفته (میلی‌گرم)	موتاژن (میلی‌مولار)	آب از دست رفته (میلی‌گرم)	پلی‌اتیلن‌گلایکول (٪)	آب از دست رفته (میلی‌گرم)
۰	۰	۷/۴ a	۰	۷/۰ a	۰	۷/۶ b
۰	۰/۵	۷/۶ A	۰/۵	۶/۷ a	۵	۷/۶ ab
۰	۲	۷/۷ A	۲	۶/۷ a	۱۰	۶/۵ a
۵	۰	۷/۹ A			۱۵	۵/۶a
۵	۰/۵	۷/۳ A				
۵	۲	۷/۶ A				
۱۰	۰	۶/۸ A				
۱۰	۰/۵	۶/۶ A				
۱۰	۲	۶/۰ A				
۱۵	۰	۵/۸ A				
۱۵	۰/۵	۵/۴ A				
۱۵	۲	۵/۷ a				

اعداد هر ستون که دارای حرف مشابه باشند، از نظر آماری (آزمون LSD) تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ندارند

آزمون محتوای آب برگ در گیاهان دیگر نیز جهت تفکیک ارقام مقاوم و حساس به خشکی به کار رفته است. هشت رقم گندم دوروم و ۱۰رقم گندم هگزاپلوئید با منشأ متفاوت با سه روش مختلف شامل مقاومت به ریزش برگ، دمای برگ و میزان خشک شدن برگ‌های جدا شده مورد آنالیز قرار گرفتند. دو روش اول تکنیک‌های مناسبی برای ارزیابی میزان مقاومت به تنش خشکی شناخته نشدند اما تفاوت بین ارقام در میزان از دست دادن آب از برگ‌های منقطع قابل تشخیص بود. توانایی نگهداشت آب در اوایل فصل زیاد بود اما بعد از مرحله گلدهی این میزان کاهش یافت. ارقام مقاوم به خشکی دوروم بهترین نتیجه را در میزان نگهداشت آب نشان دادند (۱۶).

در برخی از گزارشات نیز استفاده از میزان توانایی نگهداشت آب در برگ‌ها به عنوان شاخصی برای ارزیابی مقاومت به خشکی مناسب

تشخیص داده نشده است. به عنوان مثال می‌توان بـه تحقیـق انجـام شده در دو لاین مقاوم بـه خشـکی و دو لایـن حسـاس بـه خشـکی سورگوم در آزمایشی تحت شرایط گلخانه و با کشت در محیط گلـدان اشاره نمود. با محاسبه میزان کاهش در وزن برگ‌های بریده شده طی ۵ ساعت قرار گرفتن در شرایط تنش‌زا، رابطه منفی بـین مقاومـت بـه خشکی و توانایی نگهداشت آب در هر چهـار لایـن مشـاهده شـد. دو لاین مقاوم نسبت به دو لاین حساس توانایی نگهداشت آب کمتـری داشتند. آنها ابراز نمودند کـه محاسـبه میـزان توانـایی نگهداشـت آب نمی‌تواند به عنوان یک شاخص انتخاب قابل اعتمـاد بـرای شناسـایی ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی در گیاه سورگوم مورد استفاده قرار گیـرد (۸).

به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می توان گفت در جریان انتخاب سلولی، اگر فشار انتخابی به حد کافی نباشد، امکـان انتخاب لاین‌های سلولی که به شرایط تنش مقاوم باشند وجود نـدارد. از طرفی این فشار نباید به انـدازه‌ای باشـد کـه باعـث از بـین رفـتن کالوس‌ها یا عدم باززایی گیاهچه‌ها شـود. در انجـام انتخـاب سـلولی برای مقاومت به تنش خشکی با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلایکول غلظـت ۱۵ درصد از این ماده اسمتیک کفایت می کنـد. در بـین ارقـام مـورد استفاده در این تحقیق نیز، تفاوت معنی‌داری از نظر میـزان بـاززایی و مقاومت به پلی‌اتیلن‌گلایکول، سطح پراکسیداز و محتوای آب برگ در شرایط تنش در بین ارقام مشاهده شد کـه در ایـن بـین رقـم نـانتس ایمپرود به عنوان بهترین رقم جهت انجام انتخـاب سـلولی و حصـول لاین‌های مقاوم معرفی می‌شود.

منابع

۱- ارزانی ا. ۱۳۷۸. اصلاح گیاهان زراعی. مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان. ۶۰۶ صفحه.

۲- عسکری ح.، صفرنژاد ع.، کاظمی‌تبار ک. و حمیدی ح. ۱۳۸۲. بررسی افـزایش تحمـل یونجـه (*Medicago sativa* L.) در برابـر خشـکی بـا استفاده از تنوع سوماکلونال. فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۲: ۱۳۰-۱۱۷.

۳- قنادها م.، امیدی م.، عبدالشاهی ر. و پوستینی ک. ۱۳۸۴. شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به شوری گندم نـان از طریـق کشـت بافـت و آزمـون جوانه‌زنی. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۶: ۸۵-۷۵.

4- Abdel-Hady M.S., and El-Naggar M.H. 2007. Wheat genotypic variation and protein markers in relation with in Vitro Selection for drought tolerance. Journal of Applied Sciences Research, 3(10): 926-934.

5- Abdelsamad A., El-Sayed O.E., and Hayam F.I. 2007. Development of Drought Tolerant Double Haploid Wheat Using Biochemical Genetic Markers on In vitro Culture. Journal of Applied Sciences Research, 3(11): 1589-1599.

6- Adkins S.W., Kunanuvatchaidach R., and Godwin I.D. 1995. Somaclonal variation in rice drought tolerance and other agronomic characters. Australian Journal of Botany, 43: 201–209.

7- Afrasiab H., and Iqbal J. 2010. In vitro thechniques and mutagenesis for the genetic improvement of potatao cvs. Desiree and Diamant. Pakistan Journal of Botany, 42: 1629-1637.

8- Ashraf M., and Ahmad M.M. 1998. Relationship between water retention capability and osmotic adjustment in sorghum (*sorghum bicolor*) grown under drought stress. Arid Land Research and Management, 12(3): 255-262.

9- Bergmeyer H.U., Gawehn K., and Grassl M. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. 1: 473-474.

10- Binh D.Q., Heszky L.E., Gyulai G., and Csillag A. 1992. Plant regeneration of NaCl pretreated cells from long-term suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.) in high saline conditions. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 29: 75–82.

11- Biswas B., Chowdhurry B., Bhattacharya A., and Mandal B. 2002. *In vitro* screening for increasing drought tolerance in rice. In Vitro Cell Development Biology of Plant, 38: 525-530.

12- Bouslama M., and Schapaugh W.T. 1984. Stress tolerance in soybean. I. Evaluation on three screening techniques for heat and drought tolerance. Crop Science, 24: 993-937.

13- Bressan R.A., Hasegawa P.M., and Handa A.K. 1981. Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress. Plant Science Letters, 21: 23–30.

14- Bulk R.W. 1991. Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance breeding - a review. Euphytica, 56: 269-285.

15- Cano E.A., Perez A., Moreno V., Caro M., and Bolarin M. 1998. Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through in vitro shoot apex culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 53(1): 19-26.

16- Clarke J.M., and McCaig T.N. 1982. Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. Crop Science, 22:503-506.

17- Dami I., and Hughes H.G. 1997. Effects of PEG-induced water stress on in vitro hardening of "valiant" grape. Plant cell, tissue, and organ culture, 47: 97-101.

18- Dragisga R., Djilianov D., Dencher P., and Atanassov A. 1996. In vitro selection for somatic tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Bulgarian Journal of Plant Physiology, 22 (3-4): 30-39.

19- Fazeli F., Ghorbanli M., and Niknam V. 2007. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and

antioxidant enzymes in two sesame cultivars. Biologia Plantarum, 51 (1): 98-103.
20- Ghorbanli M., Ebrahimzadeh H., and Sharifi M. 2004. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean. Biologia Plantarum, 48: 575-581.
21- Gopal J., and Iwama K. 2007. In vitro screening of potato against water stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. Plant Cell Report, 26: 693-700.
22- Husni A., Hutami S., Kosmiatin M., and Mariska I. In: Lestari E.G. 2006. *In Vitro* Selection and Somaclonal Variation for Biotic and Abiotic Stress Tolerance. Biodiversitas, 7(3): 297-301.
23- Klerk G.J., and Wijnhoven F. 2005. Water retention capacity of tissue-cultured plants: performance of leaves from in vitro germinated mungbean seedlings. Propagation of Ornamental Plants,5:14-18.
24- Kukreja S., Nandval A.S., Kumar N., Sharma S.K., Sharma S.K., Unvi V., and Sharma P.K. 2005. Plant water status, H_2O_2 scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. Biologia Plantarum, 49: 305-308.
25- Kulkarni M., and Deshpande U. 2007. In Vitro screening of tomato genotypes for drought resistance using polyethylene glycol. African Journal of Biotechnology, 6 (6): 691-696.
26- Larher F., Leport L., Petrivalsky M., and Chappart M. 1993. Effectors for the osmoinduced praline response in higher plants. Plant Physiology and Biochemistry, 31(6): 911–922.
27- Larkin P.J., and Scowcroft W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60: 197-214.
28- Lestari E.G. 2006. In Vitro Selection and Somaclonal Variation for Biotic and Abiotic Stress Tolerance. Biodiversitas, 7(3): 297-301.
29- Mercado J.A., Sancho C., Jimenez B.S., Peran U.R., Pliego A.F., and Quesada M.A. 2000. Assessment of in vitro growth of apical stem sections and adventitious organogenesis to evaluate salinity tolerance in cultivated tomato. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 62: 101-106.
30- Mohamed M.A.H., Harris P.J.C., and Henderson J. 2000. In vitro selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. Plant Science, 159 (2): 213-222.
31- Mohmand A.S., and Murray W.N. 1991. Comparison of two methods for callus culture and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 26 (3): 185-187.
32- Moustafa R.A.K., Duncan D.R., and Widholm J.M. 1989. The effect of gamma radiation and N-ethyl-N-nitrosourea on cultured maize callus growth and plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 17 (2-3): 121-132.
33- Prakash A.H., Vajranabhaiah S.N., and Chandrashekhara R. 1994. Changing patterns in water relation and solukte contens during callus development under stress in sunflower (*Helianthus annum* L.) Advanced in Plant Science, 7: 223-225.
34- Prohens J., and Nuez F. 2008. Handbook of plant breeding, VEGETABLES II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae. Springer Science.
35- Sakthivelu G., Akitha Devi M.K., Giridhar P., Rajasekaran T., Ravishankar G.A., Nedev T., and Kosturkova G. 2008. Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and in in vitro regeneration of soybean cultivars. General and Applied Plant Physiology, 34 (1-2): 103-112.
36- Saleem M.Y., Mukhtar Z., Cheema A.A., and Atta B.M. 2005. Induced mutation and in vitro techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). International Jouranl of Environmental Science and Technology, 2: 141-145.
37- Samad M.A., Begum S., and Majid M.A. 2001. Somaclonal variation and irradiation in sugarcane calli for selection against red rot, water logged conditions and delayed or non-flowering characters. IAEA Technical Documents, 1227: 45-50.
38- Short K., Warburton C.I., and Roberts A.V. 1987. In vitro hardening of cultures cauliflower and Chrysanthemum plantles to humidity. Acta Horticultura, 2 (120): 319-324.
39- Singh R. 2003. Resistance of chickpea to Fusarium. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 38: 13-19.
40- Sorensen J.N., Jorgensen U., and Kuhn B.F. 1997. Drought effects on the marketable and nutritional quality of carrots. Journal of the Science of Food and Agriculture, 74: 379–391.
41- Sreenivasulu N., Ramanjulu S., Rmachandra-Kini K., Prakash H.S., Shekar-Shetty H., Savithri H.S., and Sudhakar C. 1999. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. Plant Science, 141: 1-9.
42- Srivalli B., Sharma G., and Khanna-Chopra R. 2003. Antioxidative defence system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. Physiologia Plantarum, 119: 503-512.
43- Steward F.C., Mapes M.O., Kent A.E., and Holsten R.D. 1964. Growth and development of cultured plant cells. Science, 143: 20-27.
44- Taghian A.S. 2002. Expression of Mutual tolerance to drought and salt stresses of the *in vitro* selected clones of sugarcane, Proceeding of the 3rd Scientific Conference of Agriculture Sciences, October, Egypt, pp. 441-462.
45- Turhan H., and Baser I. 2004. In vitro and In vivo water stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Helia, 27(40): 227-236.

46- Vicas G. 2009. Using in vitro selection to distinguish red clover mutations that tolerate salinity. Bulletin UASMV Agriculture 66: 187-192.
47- Wicks G. 2004. Commercial carrot production in Labrador. Agricultural Business Profiles. Canada - Newfoundland and Labrador, Agricultural Policy Framework (APF).
48- Work T. 1995. Water-retention capability as selection criteria for drought resistance in wheat. Journal of Plant Nutrition, 18(10): 2105-2109.
49- Xing W., and Rajashekar C.B. 2001. Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. Environmental and Experimental Botany, 46: 21-28.