

## بررسی واکنش ژنوتیپ‌های کلزا به تنش خشکی از طریق کشت کالوس

### Evaluation of Rapeseed Genotypes Response to Drought Stress via Callus Culture

زینب چقاکی‌بودی<sup>۱</sup>، علیرضا زبرجدی<sup>۲\*</sup> و دانیال کهریزی<sup>۲</sup>

#### چکیده

به منظور بررسی واکنش ژنوتیپ‌های کلزا به تنش خشکی در شرایط کشت بافت، آزمایشی با ۱۶ ژنوتیپ از این گیاه در ۵ سطح خشکی (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد پلی اتیلن گلیکول در محیط کشت MS که به ترتیب معادل شاهد، ۰/۱۵، ۰/۴۹، ۰/۰۳ و ۱/۷۶- مگاپاسکال می‌باشند) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. کالوس‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌های هیپوکوتیل در محیط القاء کالوس (محیط MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP) تحت تاثیر سطوح مختلف خشکی قرار داده شدند. ارزیابی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌ها از طریق سنجش معیارهای سرعت رشد نسبی کالوس (RGR)، سرعت رشد کالوس (CGR)، محتوای آب نسبی کالوس (RWC)، شاخص تحمل کالوس (Intol) و محتوای پرولین کالوس (PC) انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که از نظر کلیه صفات مورد مطالعه در بین ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد ژنوتیپ شماره ۷ (Dante) به لحاظ دارا بودن محتوای آب نسبی، سرعت رشد، سرعت رشد نسبی و شاخص تحمل کالوس بالا در شرایط پتانسیل اسمزی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها از ظرفیت ژنتیکی بالاتری از نظر واکنش به تنش خشکی در شرایط آزمایشگاهی برخوردار است، لذا به عنوان ژنوتیپ احتمالی دارای کالوس متحمل به خشکی در شرایط این ویترو معرفی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، پلی اتیلن گلیکول، هیپوکوتیل، کالوس

۱ و ۲. به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات و استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه.

\*: نویسنده مسوول

کوچوو و جورجیو (Kocheva & Georgiev, 2003)

جهت القاء تنش با قرار دادن ریشه‌های دو رقم جو در محیط حاوی پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG6000)، محتوای آب برگ و میزان پرولین را ارزیابی کردند. در نتایج به دست آمده میزان پرولین آزاد در برگ افزایش و محتوای آب کاهش یافته و بیشترین میزان آسیب در محیط حاوی ۲۵ درصد پلی اتیلن گلیکول بوده است.

ساکتیولو و همکاران (Sakthivelu et al. 2008)

کالوس‌های دو رقم سویا را در شرایط درون شیشه‌ای تحت تیمار پلی اتیلن گلیکول قرار دادند. در مقایسه با محیط شاهد، سرعت رشد و سرعت رشد نسبی کالوس‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد. نتایج باراکت و عبدالطیف (Barakat & Abdel-Atif, 1996) در مطالعه کالوس‌های گندم دوروم به سطوح مختلف تنش خشکی نشان داد که با افزایش غلظت پلی اتیلن گلیکول در محیط کشت، از مقادیر رشد نسبی کالوس و محتوای آب نسبی آن کاسته می‌شود.

در بررسی واکنش رقم‌های آفتابگردان در محیط کشت موراشیک-اسکوگ حاوی سطوح متفاوت از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ نشان داده شد که با افزایش غلظت‌های پلی اتیلن گلیکول رشد گیاه کاهش می‌یابد (Hassan et al. 2004). در مطالعه روی کالوس‌های گندم دوروم به سطوح مختلف تنش خشکی نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پلی اتیلن گلیکول در محیط کشت، از مقادیر سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس کاسته می‌شود (Akbari, 2009). نتایج به‌دست آمده در مطالعه عکس‌العمل کالوس‌های نخل روغنی به سطوح مختلف تنش خشکی نشان داد که با افزایش سطوح تنش از میزان محتوای آب و رشد نسبی کالوس کاسته می‌شود در حالی-که مقدار پرولین کالوس با افزایش سطح تنش افزایش می‌یابد (Khayri & Bahrany, 2004). جمشیدی (۲۰۰۹) در بررسی اثر سطوح مختلف تنش خشکی بر کالوس‌های گندم نان نشان داد که تنش اعمال شده باعث کاهش معنی‌دار در مقادیر سرعت رشد کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس می‌گردد.

عکس‌العمل کالوس‌های حاصل از نیشکر در محیط کشت حاوی عامل تنش‌زای خشکی بیان‌گر کاهش محتوای آب نسبی و رشد نسبی کالوس در سطوح بالای تنش و افزایش محتوای پرولین کالوس می‌باشد (Errabii et al., 2007).

کلزا (*Brassica napus* L.) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی به‌دلایل متعدد از اولویت خاصی برخوردار بوده و با توجه به نیاز مبرم ایران به تولید دانه‌های روغنی جهت استحصال روغن گیاهی، سطح زیر کشت آن در حال افزایش می‌باشد

(Pessaraki, 1994). تنش‌های محیطی اعم از تنش‌های زنده و غیر زنده همواره از عوامل اصلی کاهش تولید محصولات زراعی و از موانع اصلی رسیدن به پتانسیل عملکرد محصولات مختلف بوده اند. لذا توجه به مقاومت واریته‌های زراعی به این تنش‌ها از دیدگاه بهنژادی همواره مورد توجه بوده است (Moradi, 2008). گیاهان نه تنها در محیط‌های مختلف رشد می‌کنند، بلکه توانایی سازگاری به درجات مختلفی از تنش را نیز دارند. از این‌رو در درجه اول بهترین راهبرد برای دستیابی به گیاه مقاوم، بررسی و جستجو پیرامون توانایی گیاهان برای تحمل به تنش‌های محیطی است. تکنیک‌های متعددی در جهت گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای تکمیل روش‌های متداول اصلاحی به‌منظور تولید گیاهان مقاوم در برابر تنش، با استفاده از تنوع موجود یا ایجاد شده در کشت بافت صورت گرفته است. سیستم کشت بافت برای ارزیابی تحمل به تنش‌های محیطی مفید است زیرا استرس‌های محیطی در شرایط درون شیشه‌ای<sup>۱</sup> به‌سادگی قابل کنترل هستند (Swati et al., 2003). زمانی که بافت گیاهی در محیط کشت در سطح سلولی در حال رشد است می‌توان آن را تحت تأثیر عوامل تنش قرار داد، بافتی که بتواند در شرایط تنش زنده بماند، می‌تواند با مقاومت به یک صفت از قبل مشخص شده (خشکی، شوری و غیره) به یک گیاه کامل تبدیل شود (Swati et al., 2003).

کشت بافت و سلول گیاهی یک ابزار مفید برای مطالعه مکانیسم‌های تحمل تنش تحت شرایط درون شیشه‌ای است. آزمایش‌های درون شیشه‌ای برای بررسی تحمل تنش و شناسایی ارقام مقاوم در یک محیط مشخص با شرایط کنترل شده، در یک فضای محدود و یک دوره زمانی کوتاه مؤثر هستند (Satyvathi et al. 2004).

تورهان و بیزر (Turhan & Baser, 2004) بیان کردند که وزن تر کالوس‌های آفتابگردان گزینش شده در محیط تنش در مقایسه با کالوس‌های گزینش شده در محیط بدون عامل تنش‌زا کاهش محسوسی را از خود نشان دادند.

جدول ۱: ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در بررسی القاء کالوس و تنش خشکی

Table 1: Names of genotypes used in callus induction and drought stress

نام ژنوتیپ name of genotype	کد ژنوتیپ No genotype
Geronimo	1
Celecious	2
Milena	3
Sahra	4
Sunday	5
Zarfam	6
Dante	7
SLM-046	8
Talaye	9
Talent	10
ARC2	11
Opera	12
ARC5	13
Licord	14
Elite	15
Ebonite	16

بذرها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. بعد از ۵ الی ۷ روز، ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (در حدود یک سانتی‌متر) از گیاهچه‌ها جدا و در محیط کشت القاء کالوس قرار داده شدند.

#### القاء کالوس

به منظور القاء کالوس از محیط کشت MS با مقادیر ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP که حاوی ۰/۳٪ ساکارز، ۰/۸٪ آگار و pH برابر ۵/۸ بود استفاده شد. نمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار به محیط مشابه واکشت<sup>۱</sup> گردیدند و پس از ۴ هفته کالوس‌ها تشکیل شدند. سپس کالوس‌های حاصله به محیط کشت مشابه حاوی غلظت‌های متفاوت پلی اتیلن گلیکول (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، و ۴۰ درصد که به ترتیب فشار اسمزی معادل شاهد، ۰/۱۵، ۰/۴۹، ۰/۰۳، و ۱/۷۶- مگاپاسکال ایجاد می‌کنند) منتقل و صفات مورد نظر مربوط به کالوس‌ها اندازه‌گیری گردید.

صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش کشت هیپوکوتیل:

۱- سرعت رشد نسبی کالوس<sup>۲</sup> (RGR)  
(AL Khayri & AL- Bahrany, 2004)

در آزمایشی که به منظور بررسی اثرات تنش خشکی اعمال شده با استفاده از غلظت‌های مختلف اسمزی مانیتول روی کالوس‌های ایجاد شده از کشت هیپوکوتیل‌های ۵ ژنوتیپ کلزای پاییزه انجام شد، نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار صفات محتوای آب نسبی کالوس، رشد نسبی کالوس و افزایش محتوای پرولین کالوس شده است (Ghasempour *et al.* 2008). در مطالعه انجام شده بر روی کالوس‌های گلرنگ رشد یافته در محیط استرس (ایجاد شده توسط مانیتول) مشخص شد که میزان پرولین در شرایط استرس به طور معنی‌دار افزایش یافته است در حالی- که محتوای آب نسبی (RWC) و سرعت رشد نسبی (RGR) کالوس‌ها کاهش معنی‌داری را نشان داده است (Zebarjadi *et al.* 2011).

نتایج بررسی بر روی پنج رقم گندم ایرانی نشان داد که با افزایش سطح پلی اتیلن گلیکول وزن تر کالوس‌ها کاهش پیدا کرد و در غلظت‌های بالای پلی اتیلن گلیکول بیش‌ترین مقاومت مربوط به رقمی است که با کاهش رشد نسبی همراه است (Ebrahimi, 2002).

هدف از اجرای این آزمایش تعیین ژنوتیپ کلزای پاییزه دارای متحمل‌ترین کالوس تحت تنش خشکی اعمال شده توسط پلی اتیلن گلیکول در شرایط آزمایشگاهی و استفاده از آن در کارهای اصلاحی بعدی می‌باشد.

#### روش بررسی

##### مواد گیاهی

در این پژوهش ۱۶ ژنوتیپ کلزای پاییزه (جدول ۱) به منظور بررسی واکنش ژنوتیپ‌ها به القاء کالوس و تنش خشکی از طریق کشت هیپوکوتیل مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش در آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه در سال ۸۷-۱۳۸۸ انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل ۵×۱۶ در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. در هر پتری ۵ نمونه استفاده گردید. جهت ایجاد تنش خشکی از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در پنج سطح صفر (به‌عنوان شاهد)، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) استفاده گردید. بذور نمونه‌های مورد نظر به مدت ده دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد ضد عفونی گردیده و سپس سه مرتبه هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند. تعداد ۵۰ بذر ضد عفونی شده روی محیط MS حاوی ۳ درصد ساکارز، ۸ درصد آگار و pH برابر ۵/۸ قرار داده شد.

1. Subculture

2. Relative Growth Rate Callus

## بررسی واکنش ژنوتیپ‌های کلزا به تنش خشکی از طریق کشت کالوس

۱٪ اختلاف معنی‌داری داشتند. بین سطوح مختلف تنش خشکی (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد) نیز برای تمامی صفات اختلاف معنی‌داری (سطح احتمال ۱٪) مشاهده شد. همچنین بین سطوح مختلف خشکی و اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی از نظر این صفات اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها از نظر صفات مختلف کالوس بیان‌گر وابستگی این صفات به نوع ژنوتیپ می‌باشد. اورگن و همکاران (Ozgen et al. 1996) در مطالعه القاء کالوس از جنین ارقام مختلف گندم نشان دادند که صفاتی همچون محتوای آب کالوس، درصد القاء کالوس، بازایی کالوس، وزن-تر و خشک کالوس تحت تاثیر نوع ژنوتیپ می‌باشد.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین صفات جدول (۴) نشان می‌دهد که ژنوتیپ شماره ۷ با داشتن ۸۳/۴۵ درصد بیش‌ترین محتوای آب نسبی کالوس (در مجموع) و ژنوتیپ شماره ۱۶ با ۲۱/۹۲ درصد کم‌ترین محتوای آب را داشته است. از نظر صفت سرعت رشد کالوس در ژنوتیپ شماره ۷ بالاترین (۰/۸۵) و ژنوتیپ شماره ۱۶ کم‌ترین سرعت رشد (۰/۲۶) مشاهده گردید. از نظر صفت رشد نسبی کالوس ژنوتیپ شماره ۷ با (۴/۹۲- درصد) بیش‌ترین و ژنوتیپ شماره ۱ با (۸۳/۲۰- درصد) کم‌ترین رشد نسبی را به خود اختصاص دادند. محتوای پرولین کالوس در ژنوتیپ شماره ۱۶ با (۷۳/۲۶) بیش‌ترین و در ژنوتیپ شماره ۱۰ با (۴۸/۴۹) کم‌ترین مقدار بود. شاخص تحمل کالوس نیز در ژنوتیپ شماره ۷ بیش‌ترین (۲۹/۸۳) و در ژنوتیپ شماره ۱ کم‌ترین مقدار (۰/۰۵۵) بود.

اثر متقابل پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای محتوای آب نسبی کالوس (شکل ۱) نشان‌داد که ژنوتیپ‌های مختلف در سطح بدون تنش واکنش کم و تقریباً یکسانی در مواجهه با تنش اسمزی نشان دادند و با کاهش پتانسیل اسمزی به صورت ۴۰ درصد محتوای آب نسبی کالوس تمامی ژنوتیپ‌ها به صورت معنی‌داری (در سطح ۱٪) کاهش یافتند. مقایسه میانگین اثر سطوح خشکی بر محتوای آب نسبی کالوس نشان می‌دهد که با افزایش سطح خشکی محتوای آب نسبی کالوس به صورت خطی کاهش یافت. در آزمایشی که به منظور بررسی اثرات تنش خشکی بر کالوس‌های گلرنگ انجام شد نتایج نشان‌داد که با افزایش سطح خشکی محتوای آب نسبی کالوس، سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و شاخص تحمل کالوس کاهش یافت و محتوای پرولین کالوس با افزایش تنش خشکی افزایش یافت (Sohaili, 2008). نتایج مشابه در خصوص تاثیر تنش خشکی بر کالوس‌های کلزا نیز توسط پژوهش‌گران دیگر گزارش شده است (Ghasempour et al., 2008).

نسبی کالوس  $100 \times \text{وزن اولیه} / (\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}) = \text{سرعت رشد}$

۲- سرعت رشد کالوس<sup>۱</sup> (CGR)

زمان / میانگین قطر کالوس = سرعت رشد کالوس

۳- محتوای آب نسبی کالوس<sup>۲</sup> (RWC)

آب کالوس  $100 \times \text{وزن خشک} / (\text{وزن خشک} - \text{وزن تازه}) = \text{محتوای نسبی}$

۴- شاخص تحمل کالوس<sup>۳</sup> (AL- Khayri & AL- Bahrani, 2004)

۵- INTOL = (تیمار) RGR / (شاهد) RGR

## اندازه‌گیری محتوای پرولین کالوس

به منظور استخراج و اندازه‌گیری محتوای پرولین از هر نمونه میزان پنجاه میلی‌گرم کالوس جدا و به آن ۱/۲ میلی-متر سولفوسالیسیلیک اسید سه درصد اضافه شد، سپس مخلوط حاصله به مدت ده دقیقه با دور ۱۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد از محلول رویی ۵۰۰ میکرولیتر برداشته و به آن یک میلی‌لیتر آب مقطر، یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و یک میلی‌لیتر معرف نین هیدرین اضافه نموده، و به مدت یک ساعت در بن‌ماری (حمام آب گرم) ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن نمونه‌ها را روی یخ گذاشته و پس از این‌که دمای نمونه‌ها به ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق) رسید به آن‌ها ۲ میلی‌لیتر تولوئن اضافه نموده و جذب محلول رویی نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید.

## محاسبات آماری

داده‌های حاصل از صفات مورد نظر توسط نرم افزارهای SAS، SPSS، EXCELL و MSTATC پردازش شدند. تجزیه خوشه‌ای و همبستگی میان صفات نیز انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنی-دار (LSD) در سطوح احتمال یک و پنج درصد استفاده گردید.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس برای صفات اندازه‌گیری شده در کشت کالوس (جدول ۲ و ۳) نشان‌داد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای تمامی صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال

1. Callus Growth Rate
2. Relative Water Content Callus
3. Index Tolerance

جدول ۲: میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده بر روی کالوس تحت تنش خشکی

Table 2: Mean of squares for measured traits on callus under drought stress

میانگین مربعات Mean of Square				درجه آزادی d.f	منابع تغییرات Source of Variation
محتوای پرولین کالوس Proline Content Callus	رشد نسبی کالوس Growth Relative Callus	سرعت رشد کالوس Growth Raite Callus	محتوای آب نسبی کالوس Relative Water Content Callus		
1600.712**	1672.868**	0.215**	1598.353**	15	ژنوتیپ Genotype
12509.803**	25097.287**	1.106**	15636.581**	4	سطوح خشکی Levels of Drought
92.413**	228.474**	۰,۰۱۱**	256.184**	60	ژنوتیپ × خشکی Drought × Genotype
1.984	0.612	0.0002	1.371	160	خطای آزمایشی Error
2.76	2.17	2.288	2.29		CV%

\*\* : Significant at the 1% probability level

\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

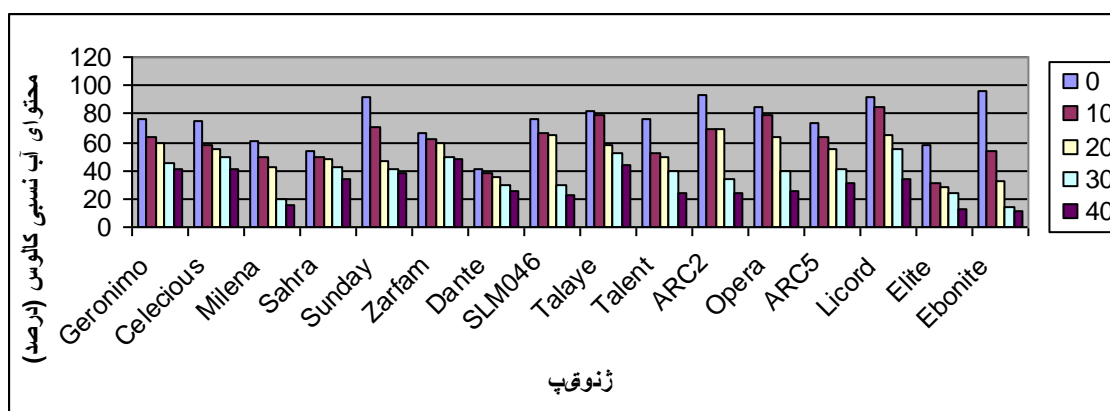
جدول ۳: میانگین مربعات شاخص تحمل کالوس در سطوح مختلف تنش خشکی

Table 3: Mean of squares for callus index tolerance in different levels of drought stress

میانگین مربعات Mean of Square	درجه آزادی d.f	منابع تغییرات Source of Variation
1977.086**	15	Genotype
1153.234**	3	Levels of Drought
50.186**	45	Drought × Genotype
0.149	128	Error
3.36		CV%

\*\* : Significant at the 1% probability level

\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۱: مقایسه میانگین اثر متقابل بین سطوح پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای محتوای آب نسبی کالوس در کلزا

(LSD 5% = ۱/۸۶)

Fig 1: Mean comparison of interaction effects among osmotic potential levels and genotypes for relative water content callus in rapeseed (LSD 5% = 1.86)

بررسی واکنش ژنوتیپ‌های کلزا به تنش خشکی از طریق کشت کالوس

نشان دادند که با افزایش سطوح تنش اعمال شده، صفات سرعت رشد و وزن تر کالوس‌ها به‌طور معنی‌دار کاهش می‌یابد (Arzani & Mirodjagh, 1999).

مقایسه میانگین اثرات متقابل بین پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای محتوای پرولین کالوس (شکل ۴) نشان داد که در سطح بدون تنش ژنوتیپ شماره ۱۲ (Opera) بیش‌ترین محتوای پرولین کالوس را داشت. با افزایش تنش خشکی تا سطح ۴۰ درصد محتوای پرولین کالوس تمامی ژنوتیپ‌ها افزایش یافت.

در مطالعه روی کالوس‌های نخل روغنی به سطوح مختلف تنش خشکی نتایج نشان داد که با افزایش سطوح تنش از میزان محتوای آب نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس کاسته می‌شود ولی مقدار پرولین کالوس با افزایش سطح تنش افزایش می‌یابد (AL- Khayri & AL- Bahrany, 2004).

براساس نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای سرعت رشد کالوس (شکل ۲) مشخص شد که با کاهش پتانسیل اسمزی تا سطح ۴۰ درصد سرعت رشد تمامی ژنوتیپ‌ها به‌صورت معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت. از نظر سرعت رشد نسبی کالوس (شکل ۳) افزایش تنش تا سطح ۴۰ درصد باعث کاهش معنی‌دار رشد نسبی کالوس برای کلیه ژنوتیپ‌ها شد. بیش‌ترین رشد نسبی کالوس در سطح ۴۰ درصد مربوط به ژنوتیپ Dante و کم‌ترین رشد نسبی مربوط به ژنوتیپ Geronimo بود. این نتایج با نتایج لوتس و همکاران (Lutts *et al.* 2004) در خصوص اعمال تنش در مرحله کالوس مطابقت دارد. نامبردگان بیان داشتند که با افزایش غلظت پلی اتیلن گلیکول در محیط کشت، از مقادیر رشد نسبی کالوس و محتوای آب نسبی کالوس کاسته شد (لوتس و همکاران 2004). ارزانی و میراجاق (۱۹۹۹) در مطالعه خود در خصوص تاثیر تنش شوری بر تولید کالوس‌های گندم دوروم

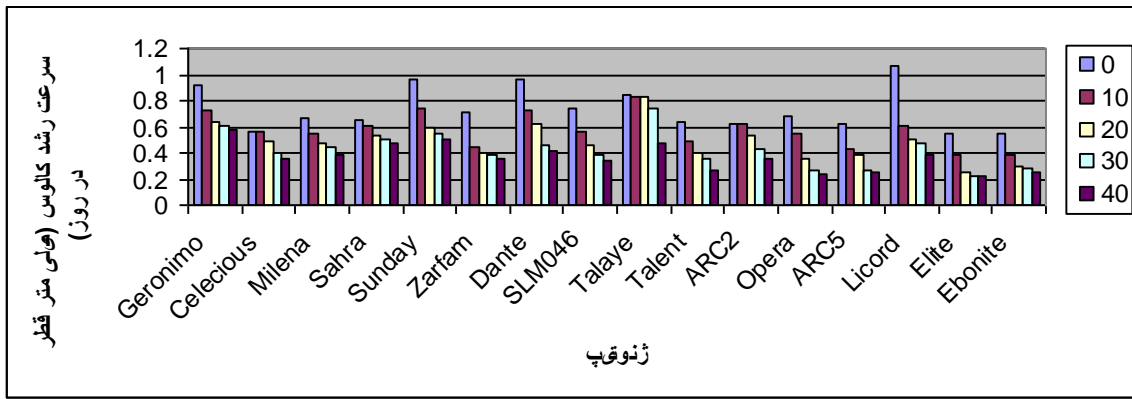
جدول ۴: مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های کلزا در کشت کالوس

Table 4: Mean comparison of rapeseed genotypes in callus culture

شاخص تحمل کالوس INTOL	محتوای پرولین کالوس Proline Content Callus (Mm/gDw)	سرعت رشد نسبی کالوس Growth Relative Callus (%)	سرعت رشد کالوس Growth Raite Callus (mm/day)	محتوای آب نسبی کالوس Relative Water Content Callus (%)	ژنوتیپ Genotype
0/0557 n	61/21bc	-83/20p	0/3800l	24/60m	Geronimo
9/807 e	62/82l	-23/72f	0/7500c	75/62c	Celecious
13/22 d	38/01i	-25/63g	0/5760f	67/02d	Milena
17/24 c	42/45g	-51/31k	0/4600i	65/40 e	Sahra
5/733 f	53/81d	-72/42n	0/3950k	27/28 l	Sunday
13/12 d	61/58b	-75/62o	0/3420m	22/30 n	Zarfam
29/83 a	30/21j	-4/92a	0/8500a	83/45 a	Dante
25/32b	31/62j	-22/81e	0/8100b	80/02 b	SLM-046
1/357 m	43/71fg	-36/21i	0/7500c	59/60 f	Talaye
2/045 l	48/49e	-48/20j	0/6500d	53/08 g	Talent
3/560 i	59/81c	-61/03l	0/4700h	43/02 j	ARC2
4/527 g	25/05k	-15/30d	0/6000e	76/41 c	Opera
2/490 k	39/52h	-7/760b	0/4810g	51/27 h	ARC5
3/044 j	44/20f	-12/59c	0/4010j	48/38 i	Licord
3/545 i	54/12d	-31/03h	0/3400m	38/71 k	Elite
4/076 h	73/26a	-67/02m	0/2600n	21/92 n	Ebonite

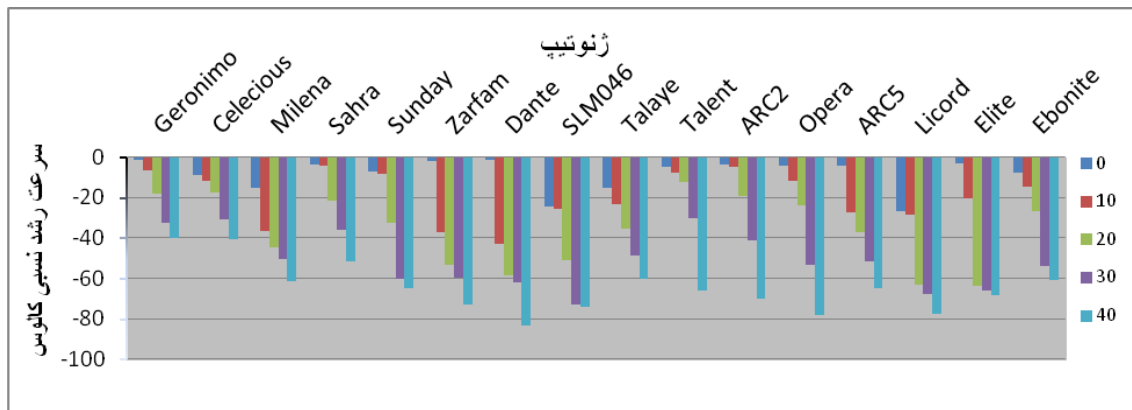
میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Means, in each column, followed by the similar letters are not significantly different at the 1% probability level.



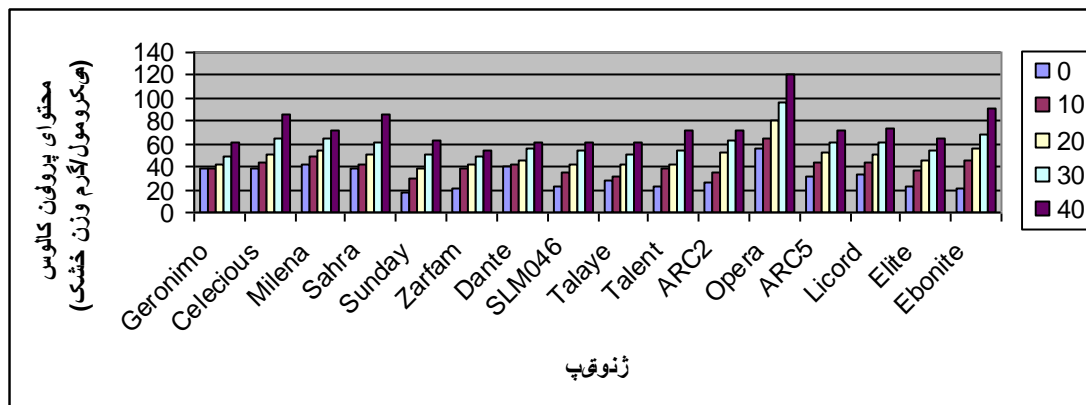
شکل ۲: مقایسه میانگین اثر متقابل بین سطوح پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای سرعت رشد کالوس در کلزا  
(LSD 5% = ۰/۰۱۵)

Fig 2: Mean comparison of interaction effects among osmotic potential levels and genotypes for callus growth rate in rapeseed ( LSD 5% = 0.015 )



شکل ۳: مقایسه میانگین اثر متقابل بین سطوح پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای سرعت رشد نسبی کالوس در کلزا  
(LSD 5% = ۱/۲۵)

Fig 3: Mean comparison of interaction effects among osmotic potential levels and genotypes for relative growth rate callus in rapeseed ( LSD 5% = 1.25 )



شکل ۴: مقایسه میانگین اثر متقابل بین سطوح پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای محتوای پرولین کالوس در کلزا  
(LSD 5% = ۲/۲۵)

Fig 4: Mean comparison of interaction effects among osmotic potential levels and genotypes for proline content callus in rapeseed ( LSD 5% = 2.25 )

بررسی واکنش ژنوتیپ‌های کلزا به تنش خشکی از طریق کشت کالوس

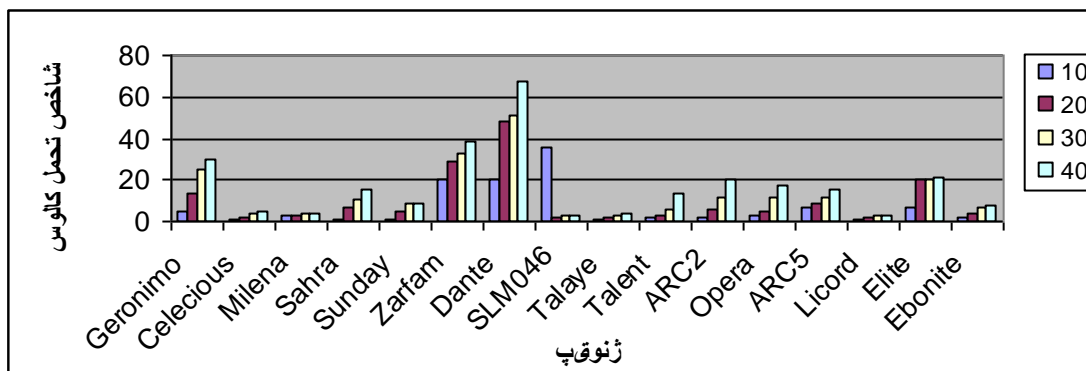
قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر)، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن‌تر)، محتوی آب نسبی کالوس و درصد کلروز کالوس اختلاف بسیار معنی‌دار وجود دارد که این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر هماهنگی دارد.

همبستگی و روابط بین صفات

نتایج تجزیه همبستگی صفات مورد مطالعه در جدول ۵ ارائه شده است. بین صفات محتوی آب نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس همبستگی مثبت و معنی‌داری (\*\* $0/70$ ) در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد. هم‌چنین بین صفات سرعت رشد کالوس و رشد نسبی کالوس همبستگی مثبت و معنی‌داری (\*\* $0/85$ ) در سطح یک درصد وجود دارد. هر چه رشد نسبی کالوس بیشتر باشد سرعت رشد هم بیشتر می‌شود. نتایج به‌دست آمده با نتایج سهیلی (2008) روی گلرنگ و قاسمپور و همکاران (2008) روی کلزا مطابقت دارد.

در مطالعه روی کالوس‌های به‌دست آمده از نیشکر در سطوح مختلف تنش خشکی نتایج به‌دست آمده نشان‌داد که محتوای آب نسبی و رشد نسبی کالوس در سطوح بالای تنش خشکی کاهش می‌یابد ولی محتوای پرولین کالوس با افزایش تنش افزایش می‌یابد (Errabii *et al.*, 2007).

اثر متقابل بین پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای شاخص تحمل معنی‌دار شد. با توجه به شکل ۵ با افزایش سطح تنش تا ۴۰ درصد شاخص تحمل کالوس تمامی ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. در بالاترین سطح تنش خشکی (۴۰ درصد) ژنوتیپ شماره ۷ (Dante) بیش‌ترین مقدار شاخص تحمل و ژنوتیپ‌های شماره ۸ (SLM-046) و شماره ۱۴ (Licord) کم‌ترین مقدار شاخص تحمل را داشت. نتایج حاصل از مطالعه اکبری (۲۰۰۹) در خصوص بررسی مقاومت به خشکی ژنوتیپ‌های گندم دوروم در شرایط آزمایشگاهی نشان‌داد که بین ژنوتیپ‌های مورد نظر، سطوح مختلف تنش و اثر متقابل آن‌ها از نظر صفات سرعت رشد کالوس (میلی‌متر



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر متقابل بین سطوح پتانسیل اسمزی و ژنوتیپ برای شاخص تحمل کالوس در کلزا

(LSD<sub>5%</sub> = ۰/۶۳)

Fig 5: Mean comparison of interaction effects among osmotic potential levels and genotypes for index tolerance in rapeseed ( LSD 5% = 0.63 )

جدول ۵: ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه در کشت کالوس  
Table 5: Correlation coefficient for measured traits in callus culture

(5)	(4)	(3)	(2)	(1)	
				1	محتوای آب نسبی کالوس Relative Water Content Callus (1)
			1	0.401	سرعت رشد کالوس Growth Raite Callus (2)
		1	0.85**	0.70**	سرعت رشد نسبی کالوس Growth Relative Callus (3)
	1	0.167	-0.344	0.015	محتوای پرولین کالوس Proline Content Callus (4)
1	-0.160	-0.293	0.128	-0.393	شاخص تحمل کالوس INTOL (5)

\*\* : Significant at the 1% probability level

\*\* : معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شماره ۳، ۶، ۸، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ در گروه دوم و ژنوتیپ شماره ۷، در گروه سوم قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص نیز این گروه بندی را صد درصد تایید نمود. بر اساس صفات اندازه گیری شده، گروه سه که دارای ژنوتیپ شماره ۷ می باشد دارای بالاترین مقادیر محتوای آب نسبی کالوس، سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و شاخص تحمل کالوس می باشد که از دو گروه دیگر متمایز می باشد.

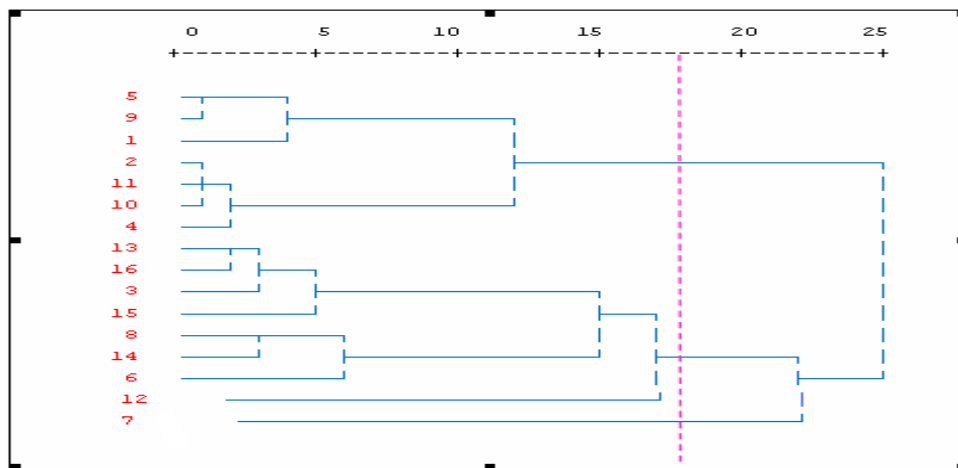
### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حمایت های مالی دانشگاه رازی در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می شود.

هم چنین وجود همبستگی مثبت و معنی دار (\*\* $0/767$ ) بین رشد نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس در شرایط تنش خشکی در ژنوتیپ های گندم دوروم گزارش شده است (اکبری، ۲۰۰۹).

### دسته بندی ژنوتیپ ها

به منظور تفکیک و گروه بندی بین ژنوتیپ های مورد مطالعه از لحاظ عکس العمل به خشکی در محیط کشت اقدام به تجزیه خوشه ای به روش Ward گردید. حاصل این تجزیه در نمودار خوشه ای شکل ۶ منعکس شده است. بر اساس دندروگرام شکل ۶، سه گروه حاصل شد که دسته بندی ژنوتیپ ها در یک گروه بیانگر شباهت بیش تر آن ها از نظر صفات مورد نظر می باشد. بر اساس این تجزیه ژنوتیپ های شماره ۱، ۲، ۴، ۵، ۹، ۱۰ و ۱۱، در گروه اول، ژنوتیپ های



شکل ۶: گروه بندی ژنوتیپ ها با استفاده از تجزیه خوشه ای بر اساس صفات مورد مطالعه کشت کالوس به روش Ward در کلزا

Fig 6: Genotypes clustering with use cluster analysis on based on measured traits callus culture via Ward method in rapeseed

### منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه های ۵-۶ متن انگلیسی مراجعه شود.

## Evaluation of Rapeseed Genotypes Response to Drought Stress via Callus Culture

Chaghakaboodi<sup>1</sup>, Z., Zebarjadi<sup>2\*</sup>, A. R. and Kahrizi<sup>2</sup>, D.

### Abstract

In order to investigate response of rapeseed genotypes (*Brassica napus* L.) to drought stress, an experiment was carried out with 16 genotypes and 5 level of drought induced via polyethylene glycol 6000 (0, 10, 20, 30 and 40% corresponding to osmotic potentials of control, -0.15, -0.49, -1.03 and -1.76 MPa) as a factorial arrangement in CRD template with three replications. Hypocotyl calli derived from cultures on callus induction medium (MS medium supplement with 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP) were subjected to different levels of drought stress. Some traits such as relative growth rate (RGR), relative water content (RWC), INTOL index, callus growth rate (CGR) and proline content (PC) were measured in calli. The results of ANOVA *in vitro* showed that there was a significantly difference between all genotypes for the traits. Results of means comparison revealed that the genotype No. 7 (Dante) had the highest amounts of RWC, CGR, RGR and INTOL, therefore this genotype is introduced because it had drought tolerant calli.

**Keywords:** Rapeseed, Polyethylene glycol, Hypocotyl, Callus

### References

- Akbari, L. 2009. *In vitro* evaluation of drought stress tolerance in durum wheat (*Triticum durum* L.). MSc Thesis. Razi University (In Farsi).
- AL- Khayri, J. M. and AL- Bahrany, A. M. 2004. Growth, water content and proline accumulation in drought- stressed callus of date palm. *Biologia Plantarum*. 48: 105-108.
- Arzani, A. S. and Mirodjagh, Sh. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 58: 67-72.
- Barakat, M. N. and Abdel- Latif, T. H. 1996. *In vitro* selection of wheat callus tolerance to high levels of salt and plant regeneration. *Euphtica*. 91: 127-140.
- Ebrahimi, F. 2002. Evaluation callus induction and regeneration several Iranian wheat for drought tolerance and salt tolerance from tissue culture. MSc Thesis. Mazandaran University (In Farsi).
- Errabii, T., Bernard, J., Essalmani, M. and Skali-Enhaji, I. 2007. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought –induced osmotic stress and its subsequent relief. *African Journal of Biotechnology*. 17:1488-1493.
- Ghasempour, H. R., Zebarjadi, A. R. and Borjian, L. 2008. Molecular aspects of drought tolerance in five genotypes of *Brassica napus*, evaluated with callus cultures under stress. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). 17-22 August. Tampere, Finland. 105-108.
- Hassan, S., Lamis, N. D. and Mmane, S. E. 2004. *In vitro* selection for stress tolerance callus Line of (*Helianthus annuus* L. Myak). *Journal of Agriculture and Biology*. 1560-8530: 13-18.
- Jamshidi, B. 2009. Study on drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. MSc Thesis. Razi University (In Farsi).
- Kocheva, K. and Georgiev, G. 2003. Evaluation of the reaction of two contrasting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars in response to osmotic stress with PEG 6000. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue*. 290- 294.
- Lutts, S., Almansouri, M. and Kinet, J. 2004. Salinity and water stress have contrasting effect on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Science*. 167: 9-18.
- Moradi, A. 2008. Study of genetic diversity wheat (*Triticum durum* L.) genotypes with application molecular marker and traits characters (Morphologic, physiologic and phonologic). Msc Thesis. Razi University (In Farsi).
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Ozgen, M., Turet, M., Ozcan, S. and Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryo of winter durum wheat genotypes. *Plant Breed*. 115(6): 455-458.
- Pessarakli, M. 1994. Plant and crop stress. Handbook, Marcel deckker, New York. 203-226.
- Sakthivelu, G. M., Akitha Devi, K., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G. A., Nedev, T. and Kosturkova, G. 2008. Drought Induced alternations in growth, osmotic potential and *In vitro* regeneration of soybean cultivars. *Plant Physiology. Special Issue*. 34: 103-112.

1 and 2. M. Sc. Student and Assistant Professors respectively, Department of Plant Breeding and Agronomy, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah.

\*: Corresponding author

- Satyvathi, V. V., Juhar, P., Elias, E. M. and Rao, M. B. 2004. Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. *Crop Science*. 44: 1839-1846.
- Sohaili, Zh. 2008. Study of physiological and chemical change due to drought tolerance in ( *Carthamus tinturiosus* ) Safflower in order determination resistance genotypes. MSc Thesis. Razi Univesity (In Farsi).
- Swati, Z., Muhammad, A. I. and Hayataj, F. 2003. *In situ* and *In vitro* studies in wheat (*Triticum aestivum*) genotypes for drought tolerance. Treatment of plant breeding and genetic faculty of crop production Science. 197 pp.
- Turhan, H. and Baser, I. 2004. *In vitro* and *In vivo* water stress in sunflower (*Helianthus annus* L.). *Helia*. 27: 227-236.
- Zebarjadi, A. R., Ghasempour, H. R. and Soheilikhah, Z H. 2011. Effects of drought stress on biochemical and physiological parameters in callus cultures of *Carthamus tinctorius* varieties. *ACTA Agronomica Hungarica*. 58(4): 395-406.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 49-57= ۴۹-۵۷).