ارزیابی تحمل به شوری در ارقام گندم دوروم (*Triticum turgidum* var. *durum*) تحت شرایط این‌ویترو

سید شهرام میراجاق و احمد ارزانی*

چکیده

تحمل به شوری ۲۸ رقم بومی و خارجی گندم دوروم در محیط کشت موراشیک و اسکوگ حاوی نمک طعام مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که کالوس‌های حاصل از اسکوتلوم جنینهای نارس در ارقام مورد مطالعه تحت تأثیر ۸ سطح تیمار شوری صفر، ۰/۳، ۰/۶، ۰/۹، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۸ و ۲/۱ درصد (وزن به حجم) کلرور سدیم قرار داده شدند. گیاهان دهنده جنین نارس در یک سیستم هیدروپونیک با جریان چرخشی و در گلدانهایی در گلخانه و نیز در مزرعه کشت شدند. یادداشت برداری از کالوس‌ها در زمانهای صفر، ۸ و ۱۶ روز پس از کشت در محیط شور انجام شد. ارزیابی تحمل به شوری ارقام از طریق سنجش معیارهای سرعت رشد نسبی و درصد کلروز کالوس در محیطهای کشت حاوی سطوح مختلف کلرورسدیم، به صورت آزمایش فاکتوریل ۲۸×۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی، با نمونه‌برداری در ۳ تکرار و با ۳ نمونه صورت گرفت.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که از میان پارامترهای مورد استفاده در ارزیابی تحمل به شوری کالوس، معیار رشد نسبی از اهمیت و اعتبار بیشتری برخوردار است، لیکن سرعت رشد کالوس، به لحاظ این که یک صفت کاملاً کمّی نمی‌باشد و تا حد زیادی مبتنی بر مشاهدات و احتمالاً همراه با خطای مشاهده‌ای است، اهمیت کمتری دارد. حاصل این بررسی معرفی رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" و رقم "دیپر-۶" به عنوان ژنوتیپ‌های برتر متحمل شوری در شرایط ویترو می‌باشد. این ارقام به لحاظ این‌که رشد نسبی کالوس بالا و درصد کلروز کالوس پایینی را در مقام مقایسه با سایرین داشته‌اند، در شرایط این آزمایش احتمالاً از ظرفیت ژنتیکی برتری برخوردار می‌باشند.

واژه‌های کلیدی *- گندم دوروم، تحمل به شوری، رشد نسبی کالوس، کلرورسدیم*

مقدمه

امروزه یکی از اهداف مهم به نژادی گیاهان، افزایش تحمل به شوری و ایجاد ظرفیت مناسب جهت مقابله با مشکل شوری زمینهای زراعی و آب آبیاری است تا بتوان تولید محصولات کشاورزی را با حداقل زیان تحت شرایط شور امکان پذیر ساخت. از عمده‌ترین محدودیتهای به نژادی گیاهان متحمل شوری، عدم وجود روشهای دقیق و سریع برای تشخیص و ارزیابی منابع ژنتیکی متحمل است. کمیابی ارقام متحمل شوری گواهی بر این ادعاست (۲۱). علل عدم توسعهٔ روشهای

* - به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

انتخاب و ارزیابی تحمل به شوری را می‌توان مربوط به وجود تفاوت در تحمل به شوری گیاهان در مراحل مختلف رشد (۱۲و۲۳)، مکانیسم‌های فیزیولوژیک متعدد درگیر تحمل به شوری (۱۹)، پیچیدگی اثر متقابل محیط و ژنوتیپ (۲۳) و عدم امکان ارزیابی ارقام در مزرعهٔ شور به لحاظ غیریکنواختی (۴و۹) دانست.

در سالهای اخیر تلاشهای زیادی برای تکمیل روشهای متداول اصلاحی به منظور تولید گیاهان مقاوم در برابر تنش و خصوصاً متحمل شوری (۳، ۱۳، ۱۴، ۲۳ و ۲۵)، 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 به نژادی را در جهت بهبود تنش شوری گیاهان تقویت و تکمیل نماید. به طور کلی کاربرد مهم‌تر کشت بافت برای نیل به این هدف، مفروض بر توان استخراج مؤثر تنوع ژنتیکی مفید از طریق استراتژی‌های گزینش بافت یا سلول با بازده بالا، دورگ گیری بدنی[1] و انتقال ژنی می‌باشد (۱۰). در این راستا کاربردهای کشت بافت توسط عدهٔ زیادی از محققین (۱۹۹۱-۱۹۸۱، نقل از ۱۰) توان بالقوهٔ سیستم‌های این ویترو را در تحقیق برای شناسایی ویژگیهای سلولی مربوط به تحمل تنش شوری نشان داده است.

در روش این ویترو، برای گزینش لاین‌های مقاوم مواردی به عنوان توفیق محدود پیشنهاد شده است (۲۶). با این وجود، با توجه به موفقیت اخیر در امر تولید بازیافتهای سالم، بارور و متحمل شوری با ثبات ژنتیکی در گونه‌های متعدد (۷و۲۵)، واضح است که برخی از محدودیتهای موجود نیز کاسته خواهد شد (۷). اگرچه ژنتیک تحمل به شوری پیچیده است، اما اختلاف گیاهان حساس و مقاوم به شوری ضرورتاً به معنی تفاوت در ژن‌های زیاد نیست (۲۶).

تشخیص، جداسازی و باززایی ژنوتیپ‌های متحمل شوری با استفاده از کشت سلول در محیط تعلیقی، به عنوان یک روش مؤثر و معتبر در به نژادی گیاهان متحمل نمک پیشنهاد شده است. در این روش سلول‌های جهش یافته مقاوم به شوری شناسایی شده و سپس گیاهان مقاوم از این سلول ها بازیافت می‌شوند(۶). البته موفقیت در انتخاب مقاومت به شوری با استفاده از این روش، زمانی حاصل می‌شود که مکانیسم‌های متحمل به شوری در سلول با مکانیسم‌های تحمل در گیاه کامل مرتبط باشند.

در ژنوتیپ‌هایی که مکانیسم تحمل به شوری در گیاه کامل مکانیسمی سلولی است، ممکن است تحمل به شوری در آنها با تحمل شوری کالوس در محیط شور همبستگی داشته باشد. استفاده از کشت کالوس متفاوت از روش کشت سلول در محیط کشت تعلیقی است. اساساً در روش کشت کالوس سعی می‌شود که تنوع به وسیلهٔ ارزیابی رشد کالوس در محیط حاوی نمک طعام، در صورتی که از قبل وجود داشته باشد، تشخیص داده شود. در حالی که در روش کشت سلول، برای صفت تحمل به شوری تنوع در سلول‌ها ایجاد شده و سپس انتخاب برای آنها صورت می‌گیرد (۱۷). در روش کشت کالوس معمولاً مشکلات ناشی از تنوع سوماکلونی[2] و یا عدم باززایی گیاه کامل وجود ندارد. موفقیت در این روش نیز بستگی به ارتباط بین بافت کالوس در محیط کشت حاوی نمک طعام و تحمل به شوری در گیاه کامل دارد.

اورتون (۱۶) گزارش کرده است که تحمل به شوری مشاهده شده در کشت کالوس ارقام جو، به طور مشابه در کشت گیاهان بالغ آنها نیز مشاهده می‌شود. کارادیموا و دژامبوا (۱۳) نیز پس از باززایی کالوس‌های مقاوم به شوری ارقام گندم نان و دوروم، تحمل به شوری را در گیاهان نسل R_1 (نسل اول گیاهان باززایی شدهٔ R_0) مشاهده کردند. همچنین اسمیت و مک کام (۲۲) ارتباط مثبتی بین رشد کالوس یونجهٔ معمولی در محیط کشت حاوی نمک طعام و تحمل به شوری در گیاه کامل به دست آوردند. اما مک کوی(۱۴) هیچ ارتباط مثبت معنی‌داری بین بافت کالوس در محیط کشت شور و تحمل به شوری گیاه کامل مشاهده نکرد. اسمیت و همکاران (۲۳) فقط همبستگی فنوتیپی معنی‌داری بین

1- Somatic hybridization 2- Somaclonal variation

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

تحمل نمک طعام در مرحلهٔ جوانه‌زنی و رشد کالوس در محیط حاوی ۵۵۴ میلی‌مول نمک طعام مشاهده نمودند.

از آن‌جایی که شناسایی و کاربرد ژنوتیپ‌های متحمل شوری در برنامه‌های به نژادی آینده دارای اهمیت بسزایی می‌باشد لذا مطالعهٔ حاضر به بررسی و مقایسهٔ واکنش تعدادی ژنوتیپ گندم دوروم، از لحاظ تحمل به شوری کالوس آنها در محیط کشت بافت می‌پردازد.

مواد و روشها

مواد ژنتیکی و کشت گیاهان

بیست و هشت ژنوتیپ گندم دوروم مشتمل بر ۲ رقم بومی منطقهٔ خرم آباد و شهرکرد ("شاهیوندی" و "شهتاس")، ۲۲ رقم از مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج و ۴ رقم سوریه‌ای تهیه شده از ایکاردا[1] به نامهای "Awl_1/Sbl_4"، "Awl_4/Bit"، "ماسارا-۱"[2] و "ام ربیع -۵"[3] در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. این ارقام در سال ۱۳۷۴ در گلخانه و مزرعهٔ تحقیقاتی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان کشت شد. ژنوتیپ‌های گندم دوروم جهت جلوگیری از تراکم کار، در طی تاریخهای کاشت متناوب در گلدان و سیستم جریان چرخشی هیدروپونیک[4] که قبلاً توسط ارزانی و داروی (۱) توصیف شده است، در گلخانه کشت گردید. در این سیستم از محلول غذایی هاگلند(۱۱) استفاده به عمل آمد. گلدانها هر ۴-۳ روز یکبار با این محلول غذایی تغذیه شدند.

تولید کالوس

خوشه‌های حاوی جنینهای نارس، ۱۶-۱۴ روز پس از گرده افشانی برداشت شدند و بذور نارس سبزرنگ ابتدا به مدت ۱۰-۵ دقیقه توسط محلول وایتکس ۲۰ درصد (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم) و سپس به وسیلهٔ الکل سفید ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه ضد عفونی سطحی گردیدند و توسط آب مقطر استریل مورد شستشو قرار گرفتند. جنینهای نارس پس از جداسازی، به پتری دیش‌های محتوی محیط کشت موراشیک و اسکوگ به انضمام ۲/۵ میلیگرم D- ۴، ۲ و ۰/۱ میلیگرم کاینتین[5] در لیتر، به نحوی که اسکوتلوم در جهت بالا قرار گیرد، منتقل شدند. کشتها در دمای ۲۸ درجهٔ سانتیگراد و شرایط تاریکی در انکوباتور نگهداری گردیدند.

انتقال کالوس‌ها به محیط کشت

دو هفته پس از کشت جنین، کالوس‌های سالم و با قطر مناسب در محیط کشت MS (۱۵) شور (حاوی کلرورسدیم) به انضمام ۲ میلیگرم در لیتر D-۴، ۲، ۰/۱ میلیگرم در لیتر کاینتین (۱۳) و ۳۰ گرم در لیتر سوکروز مورد کشت مجدد قرار گرفتند. براساس دامنهٔ شوری توصیه شده در مطالعات قبلی (۵، ۸ و ۱۳)، ارقام مورد مطالعه تحت تأثیر ۸ سطح تیمار شوری صفر، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ گرم در لیتر کلرور سدیم قرار داده شدند.

در هر پتری دیش ۵ سانتیمتری حاوی محیط کشت شور، ۴ قطعه کالوس کشت شد و برای هر سطح تیمار شوری در هر رقم ۳ پتری دیش (تکرار) در نظر گرفته شد. ظروف پتری پس از علامت گذاری، در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجهٔ سانتیگراد در داخل انکوباتور نگهداری شدند. برای جامد نمودن محیط کشت از آگارز (نوع IA - سیگما[6]) به مقدار ۲/۸ گرم در لیتر استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این آزمایش از صفات درصد کلروز، سرعت رشد کالوس (میلیمتر قطر در روز) و رشد نسبی کالوس براساس وزن تر[7] به عنوان معیارهایی برای تشخیص تحمل به شوری ارقام استفاده شد. برای محاسبهٔ درصد کلروز، ۱۶ روز پس از استقرار کالوس‌ها در محیط شور، به طور مشاهده‌ای و همزمان برای کلیهٔ ارقام، به هر کالوس رتبه‌ای که نشانگر میزان کلروز در آن

1- ICARDA 2- Massara-l 3- Omrabi-5 4- Hydroponic recirculating system 5- Kinetin
6- Sigma type lA 7- Relative fresh weight growth (RFWG)

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده بر روی کالوس ارقام تحت مطالعه در محیط شور

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات		
		سرعت رشد کالوس (میلیمتر قطر در روز)	رشد نسبی کالوس (براساس وزن تر)	درصد کلروز کالوس
رقم	۲۷	۰/۰۰۸**	۱۰/۶۱**	۳۵۰۲/۷۲**
شوری	۷	۰/۲۴۱**	۱۳/۴۱**	۵۹۶۷/۰۲**
رقم× شوری	۱۸۹	۰/۰۰۵**	۰/۶۱**	۳۶۳/۴۶**
خطای آزمایشی	۴۴۸	۰/۰۰۲**	۰/۲۲**	۱۹۰/۴۶**
خطای نمونه‌برداری	۱۳۴۴	۰/۰۰۱	۰/۱۳۵	۴۴/۹۷

** - در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

کالوس بود اختصاص یافت. سرعت رشد کالوس برحسب میلیمتر در روز، پس از اندازه‌گیری قطر کالوس در طی صفر، ۸ و ۱۶ روز پس از کشت در محیط شور محاسبه گردید. جهت محاسبهٔ رشد نسبی کالوس‌ها براساس وزن تر[1] (RFWG)، برای هر رقم از روش مورد استفاده کارادیموا و دژامبوا (۱۳) استفاده شد:

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

که در آن W_1 و W_2 به ترتیب وزن اولیه و نهایی کالوس در محیط شور می‌باشد.

در این مطالعه به منظور تجزیهٔ واریانس از آزمایش فاکتوریل ۲۸×۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی نمونه‌برداری با ۳ تکرار و ۳ نمونه استفاده گردید. تجزیهٔ واریانس و مقایسه میانگینها با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار(LSD) و با استفاده از نرم افزار کامپیوتری اس.ا.اس (۲۰) اجرا گردید. تجزیهٔ خوشه‌ای صفات با روش UPGMA[2] و با تعیین ضرایب فاصلهٔ اقلیدسی[3]، با استفاده از نرم افزار اس.پی.اس.اس.[4] صورت گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر کلرور سدیم بر رشد کالوس

ارقام گندم دوروم مورد آزمایش از لحاظ سرعت رشد (میلیمتر قطر در روز) و رشد نسبی کالوس در محیط کشت شور اختلاف بسیار معنی‌داری ($P<0/01$) نشان دادند (جدول ۱).

رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" با ۰/۰۲۶ و رقم "ال واگ -۲" با ۰/۰۶۴ میلیمتر در روز به ترتیب کمترین و بیشترین رشد نسبی کالوس را در محیط کشت شور دارا بودند. در حالی که "استرمسوال -۱" و "پی.آی ۴۰۱۰۰" با مقادیر ۰/۱ و ۲/۱۵ به ترتیب ازکمترین و بیشترین رشد نسبی کالوس در محیط کشت شور برخوردار بودند (جدول ۲). ملاحظه می‌شود که رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" واکنشی غیرقابل انتظار نشان داده است، بدین ترتیب که دارای کمترین سرعت رشد کالوس و بیشترین رشد نسبی کالوس در

1- Relative fresh weight growth (RFWG)
2- Unweighted pair-group method using arithmatic average
3- Euclidean distance coefficients
4- Statistical program for social science (SPSS)

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

جدول ۲- مقایسه‌میانگین‌سرعت رشد، رشد نسبی و درصد کلروز کالوس ارقام تحت مطالعه در محیط کشت شور*

رقم	سرعت رشد کالوس (میلیمتر قطر در روز)	رشد نسبی کالوس (براساس وزن تر)	درصد کلروز کالوس
ام ربیع -۵	۰/۰۵۳ a-e	۰/۳۳ efg	۲۳/۳ c-g
Awl_1/Sbl_4	۰/۰۳۸ d-g	۰/۲۱ fgh	۱۷/۱ h-k
Awl_4/Bit	۰/۰۵۶ a-d	۰/۳۲ efg	۲۲/۲ e-i
ماسارا-۱	۰/۰۶۳ a	۰/۳۲ efg	۲۱/۸ e-j
آلتار-۸۴	۰/۰۴۹ a-f	۰/۱۸ fgh	۱۳/۹ kl
ال واگ-۲	۰/۰۶۴ a	۰/۳۱ fg	۲۲/۳ d-i
کوریفلا	۰/۰۴۴ a-g	۰/۱۸ fgh	۱۱/۲ lm
آکانچی	۰/۰۴۶ a-g	۰/۳۲ efg	۵۲/۲ b-f
دیپر-۶	۰/۰۵۷ a-d	۱/۳۸ b	۱۳/۷ kl
مکزیکال-۷۵	۰/۰۵۲ a-d	۰/۲۵ fgh	۲۳/۹ c-f
استرمسوال -۱	۰/۰۲۹ fg	۰/۱۰ h	۲۷/۵ b-e
سلتا	۰/۰۴۱ c-g	۰/۱۳ gh	۱۷/۴ h-k
بومر-۲۴	۰/۰۳۷ d-g	۰/۲۶ fgh	۱۳/۸ kl
شهتاس	۰/۰۳۹ d-g	۰/۲۶ fgh	۴۶/۴ a
شاهیوندی	۰/۰۴۳ a-g	۰/۱۳ gh	۵۱/۱ a
بلیخ -۲	۰/۰۳۸ d-g	۰/۲۵ fgh	۳۰/۱ b
نیل	۰/۰۴۲ b-g	۰/۲۱ fgh	۱۷/۶ g-k
هاگلا	۰/۰۴۳ a-g	۰/۲۷ fgh	۲۵/۷ c-f
پی.آی ۴۰۱۰۰	۰/۰۲۶ g	۲/۱۵ a	۷/۴ m
ستورک	۰/۰۴۲ b-g	۰/۳۱ def	۲۸/۱bcd
راسکان-۳۹	۰/۰۵۷ a-d	۰/۵۴ cd	۲۲/۸ c-h
استرومسوا	۰/۰۴۵ a-g	۰/۲۵ fgh	۲۰/۸ f-j
آفن کیل	۰/۰۴۶ a-g	۰/۳۴ def	۱۶/۷ i-l
پاردلا-۱	۰/۰۶۳ a	۰/۶۱ c	۱۶/۳ jkl
پریون-۱	۰/۰۶۲ abc	۰/۵۲ cde	۲۲/۶ d-h
نلی-۱	۰/۰۵۶ a-d	۰/۳۲ fg	۱۷/۲ h-k
آسته‌گاتا	۰/۰۳۲ efg	۰/۱۸ fgh	۲۸/۴ bc
MT/HO/حیدر	۰/۰۵۸ a-d	۰/۳۳ ef	۱۲/۱ klm

* - در هر ستون اعدادی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند براساس آزمون LSD دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند ($P<0/01$).

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف (در محیط کشت شور و غیرشور) برای ارقام مورد مطالعه*

صفت	۱	۲	۳	۴	۵
۱- سرعت رشد کالوس (میلیمترقطردرروز)	۱				
۲- رشد نسبی کالوس(براساس وزن تر)	۰/۲۷-	۱			
۳- سرعت رشد کالوس در شوری (میلیمترقطردر روز)	۰/۱۷	۰/۲۴-	۱		
۴- رشد نسبی کالوس در شوری (براساس وزن تر)	۰/۵۲-	۰/۳۷	۰/۱۸-	۱	
۵- درصد کلروز کالوس در شوری	۰/۲۲-	۰/۰۳	۰/۲۵-	۰/۳۷-	۱

*- ضریب همبستگی بزرگتر از ۰/۳۷+ و کوچکتر از ۰/۳۷- در سطح احتمال ۵ درصد و ضرایب همبستگی بزرگتر از ۰/۴۸+ و کوچکتر از ۰/۴۸- در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشند (n=۲۸).

محیط حاوی کلرور سدیم بوده است. علیرغم همبستگی منفی (البته غیر معنی‌دار) مشاهده شده بین معیارهای سرعت رشد و رشد نسبی کالوس در محیط شور (جدول ۳)، این انتظار منطقی به نظر می‌رسد که ارقام با رشد نسبی کالوس بیشتر، از سرعت رشد کالوس بالاتری نیز برخوردار باشند. اما این نکته در مورد برخی از ارقام به ویژه رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰ " صادق نمی‌باشد. بنابر اظهارات تایلور و سکور (۲۷) دلیل این مسئله ناشی از این است که معیار سرعت رشد کالوس صفتی کاملاً کمّی نمی‌باشد، زیرا از طریق مشاهده و اندازه‌گیری قطر کالوس محاسبه شده و تا حد زیادی مبتنی بر مشاهده و احتمالاً همراه با خطای مشاهده‌ای است. برکت و عبدالطیف (۳) و کارادیموا و دژامبوا (۱۳) نیز از معیار رشد نسبی برای ارزیابی واکنش کالوس ارقام نسبت به شوری در محیط ویترو استفاده نموده و چنین نتیجه‌گیری کرده‌اند که معیار ارزیابی رشد نسبی کالوس چون براساس وزن تر کالوس محاسبه می‌گردد یک صفت کمّی است و نتایج حاصل از آن به واقعیت نزدیک‌تر است. در این مطالعه همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد (r=۰/۳۷) بین رشد نسبی کالوس در شوری و رشد نسبی کالوس در محیط غیر شور مشاهده گردید، در حالی که بین سرعت رشد کالوس در محیط فاقد کلرور سدیم و رشد نسبی کالوس در محیط شور همبستگی منفی و بسیار معنی‌داری (r=۰/۵۲) وجود داشت (جدول ۳).

برتری بسیار بارز و معنی‌دار رشد نسبی کالوس رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" در محیط کشت شور، نسبت به سایر ارقام مشهود بود (جدول ۲)، به طوری که بالاترین رتبه در تحمل به شوری را در میان ارقام مورد آزمایش در محیط ویترو به خود اختصاص داد. از طرف دیگر ارقامی از قبیل "استرمسوال-۱"، "سلتا" و "شاهیوندی" راکه دارای پایین‌ترین میزان رشد نسبی کالوس در محیط کشت شور بودند می‌توان به عنوان کم تحمل‌ترین ارقام نسبت به شوری در سطح سلولی دسته بندی نمود. بنا به اظهارات تال (۲۶)، هر چند تحمل به شوری تشخیص داده شده برای ارقام در این مرحله (کالوس) الزاماً بدین معنی نیست که رقم مربوطه در مرحلهٔ گیاه کامل و در طی مراحل رشد خود تحمل مشابهی نسبت به شوری نشان خواهد داد، لیکن حداقل نشان دهندهٔ وجود یا فقدان ظرفیت ژنتیکی تحمل به شوری در دو دستهٔ ارقام مزبور می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که تفاوت بین سطوح مختلف شوری از نظر سرعت رشد و رشد نسبی کالوس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین سطوح شوری بر روی هر کدام از صفات نشان می‌دهد که با افزایش درصد کلرور سدیم در محیط کشت، سرعت رشد و

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

نیز رشد نسبی کالوس تا سطح ۱/۵ درصد کلرور سدیم به طور معنی‌داری کاهش یافته، ولی در سطوح بالاتر از ۱/۸ و ۲/۱ درصد کلرور سدیم به سوی ثبات یا تقریباً توقف رشد متمایل می‌گردد (اشکال ۱و۲). کاهش رشد کالوس با افزایش سطوح شوری در محیط ویترو توسط سایر محققین (۳، ۶، ۱۳، ۲۲ و ۲۴) نیز گزارش شده است. علت این امر شاید از آن‌جا ناشی شود که افزودن نمک به محیط کشت، پتانسیل اسمزی محیط را کاهش می‌دهد و به همین دلیل بین تنش شوری و تنش خشکی رابطه‌ای مستقیم و غیرقابل تفکیک وجود دارد (۲). ممکن است در این حالت تودهٔ کالوس گیاهی برای حفظ تورژسانس خود به تجمع مواد آلی و معدنی بپردازد که لازمهٔ آن صرف انرژی و در پی آن کاهش رشد کالوس است. البته برخی از پژوهشگران (۲۵) صدمهٔ ناشی از غلظت زیاد نمک بر رشد سلول‌های گیاهی را نتیجهٔ پتانسیل اسمزی پایین ندانسته‌اند، بلکه دلیل آن را نفوذ یون‌های سمی زیاد به درون سلول و تخریب غیرقابل برگشت آنها می‌دانند. تال (۲۵) معتقد است که اثر یون Na^+ از طریق به هم زدن تعادل عناصر غذایی و همچنین سمی بودن آن در شرایط شور، رشد کالوس را محدود می‌کند.

در اشکال ۱ و ۲ مشاهده می‌شود که شاهد (بدون شوری) با بقیهٔ سطوح شوری از نظر سرعت رشد و رشد نسبی کالوس ارقام تفاوت معنی‌دار داشته و چهار سطح شوری بعد از آن نیز به ترتیب تفاوت معنی‌داری از لحاظ کاهش در معیارهای مزبور داشته‌اند. در صورتی که سه سطح شوری آخر (۱/۵، ۱/۸ و ۲/۱ درصد کلرورسدیم) با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشته و نتیجه حاکی از این است که به منظور ارزیابی تحمل به شوری ارقام مورد مطالعه گندم دوروم تحت شرایط این آزمایش، شش سطح شوری اول کفایت می‌کند. لازم به ذکر است، با توجه به شوری حداکثر ۳/۲ درصد آب دریا، می‌توان گفت تا حدود نصف شوری آب دریا به عنوان حد ماکزیمم برای مقایسه تحمل به شوری ارقام دوروم در شرایط این آزمایش کافی به نظر می‌رسد. البته برای آزمایشهای موتاسیون و یا دستیابی به واریانت‌های سوماکلون از طریق انتخاب در محیط شور ویترو، سطوح بالاتری نیز کاربرد دارد. در همین ارتباط کارادیموا و دژامبوا (۱۳) حداکثر ۰/۷ درصد نمک طعام و برکت و عبدالطیف (۲۱) حداکثر ۱/۲ درصد نمک طعام را برای ارزیابی کالوس‌های گندم در شوری توصیه نموده‌اند.

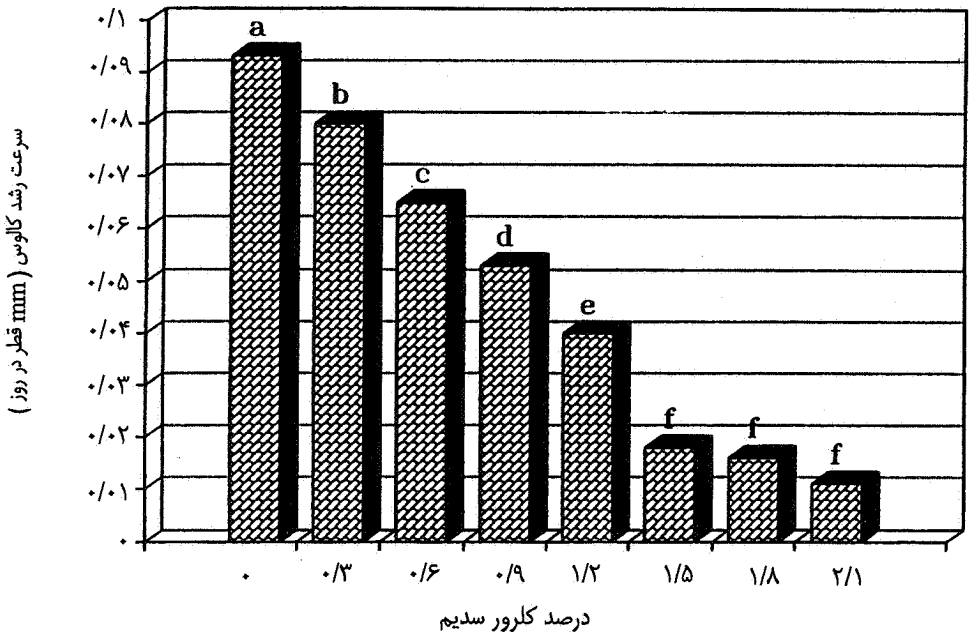
نتایج تجزیه واریانس مندرج در جدول ۱، اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد برای اثر متقابل رقم و شوری از لحاظ سرعت رشد و رشد نسبی کالوس نشان می‌دهد. این اثر متقابل حاکی از آن است که هر چند میزان رشد نسبی و سرعت رشد کالوس با افزایش غلظت کلرور سدیم در محیط کشت کاهش یافته، لیکن روند این کاهش در بین 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، زیرا 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 (۱۸). احتمالاً مکانیسم فوق بر یک مبنای ژنتیکی استوار است. با وجود این‌که ژنتیک تحمل به شوری کاملاً روشن نیست ولی وجود تنوع ژنتیکی در تحمل شوری در گیاهان، امری بدیهی است. اگر چه در مواردی گزارشهایی در زمینهٔ کنترل تک ژنی تحمل به شوری وجود دارد، با این حال صفت مذکور یک خصوصیت چند ژنی به حساب می‌آید و به احتمال قوی این صفت توسط ژن‌های مکانهای مختلف ژنی، در یک یا چند کروموزوم کنترل می‌شود (۸).

تأثیر کلرور سدیم بر میزان کلروز کالوس

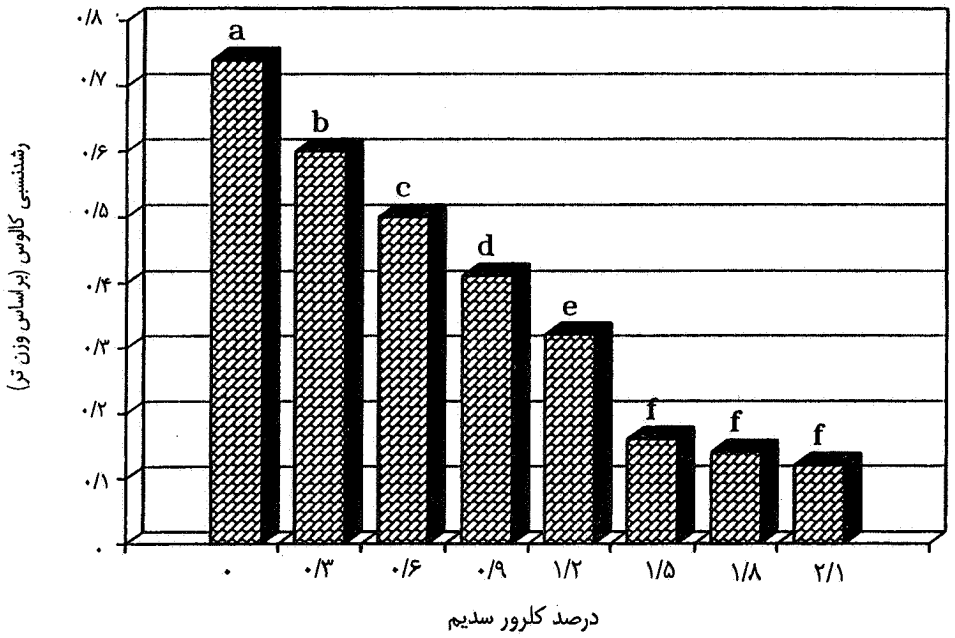
ارقام مورد مطالعه گندم دوروم برای درصد کلروز کالوس در محیط کشت شور اختلاف بسیار معنی‌داری داشتند. بیشترین درصد کلروز کالوس در محیط کشت حاوی کلرور سدیم مربوط به ارقام بومی "شاهیوندی" و "شهتاس" به ترتیب با ۵۱/۱ و

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]



شکل ۱- مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری از لحاظ سرعت رشد کالوس ارقام تحت مطالعه



شکل ۲- مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری از لحاظ میزان رشد نسبی کالوس ارقام تحت مطالعه

۴۶/۴ درصد بوده که با اختلاف بسیاری نسبت به بقیه ارقام از لحاظ تحمل شوری به عنوان پست‌ترین شناسایی شدند. در ضمن همین ارقام از رشد نسبی کالوس بسیار پایینی نیز برخوردار بودند. از طرف دیگر رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" که با ۷/۴ درصد دارای کمترین درصد کلروز کالوس بود، همان طوری که قبلاً ذکر گردید، بیشترین رشد نسبی کالوس را در محیط شور از خود نشان داده است (جدول ۲). از این موارد می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که معیارهای رشد نسبی و میزان کلروز کالوس

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین سطوح مختلف کلرور سدیم برای رشد نسبی و درصد کلروز کالوس در محیط کشت شور*

درصد کلرورسدیم	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
میزان رشد نسبی								
۱-	۰/۰	۱						
۲-	۰/۳	۰/۸۲	۱					
۳-	۰/۶	۰/۶۶	۰/۸۵	۱				
۴-	۰/۹	۰/۶۱	۰/۸۱	۰/۸۶	۱			
۵-	۱/۲	۰/۶۲	۰/۸۷	۰/۸۳	۰/۸۷	۱		
۶-	۱/۵	۰/۵۳	۰/۷۸	۰/۷۶	۰/۸۷	۰/۹۲	۱	
۷-	۱/۸	۰/۵۴	۰/۷۷	۰/۷۶	۰/۸۷	۰/۹۲	۰/۹۹	۱
۸-	۲/۱	۰/۵۶	۰/۷	۰/۷۶	۰/۸۷	۰/۹۱	۰/۹۸	۰/۹۹	۱
کلروز								
۱-	۰/۰	۱						
۲-	۰/۳	۰/۷۳	۱					
۳-	۰/۶	۰/۶۶	۰/۷۸	۱				
۴-	۰/۹	۰/۶۲	۰/۶۴	۰/۶۵	۱			
۵-	۱/۲	۰/۵۱	۰/۴۴	۰/۵۸	۰/۵۵	۱		
۶-	۱/۵	۰/۴۵	۰/۳۹	۰/۳۰	۰/۴۴	۰/۵۸	۱	
۷-	۱/۸	۰/۶۷	۰/۶۳	۰/۴۹	۰/۳۵	۰/۲۴	۰/۴۳	۱
۸-	۲/۱	۰/۷۰	۰/۷۲	۰/۵۶	۰/۵۸	۰/۶۰	۰/۵۶	۰/۷۹	۱

*- ضریب همبستگی‌بزرگ‌تر از ۰/۳۷- و کوچک‌تر از ۰/۳۷- در سطح احتمال ۵ درصد و ضریب همبستگی بزرگ‌تر از ۰/۴۷- وکوچک‌تر از ۰/۴۷- در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشند (n=۲۸).

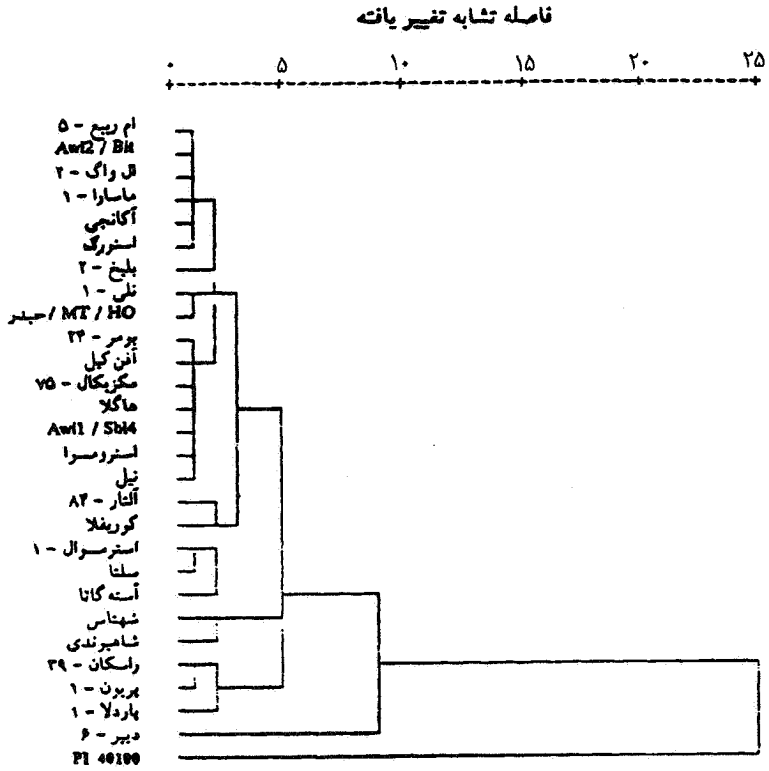
در محیط شور دارای همبستگی منفی بوده (جدول ۳)، به طوری که کلروز کمتر کالوس، رشد نسبی کالوس بیشتری را به همراه دارد. از این دو معیار می‌توان به عنوان ارزیابی و یا انتخاب تحمل به شوری کالوس در محیط ویترو استفاده نمود. علاوه براین، رقم"پی.آی ۴۰۱۰۰" به عنوان متحمل‌ترین ارقام موردآزمایش نسبت به شوری در سطح سلولی در شرایط این آزمایش معرفی می‌گردد. لازم به ذکر است سطوح کلرور سدیم، درصد کلروز کالوس متفاوتی را در بین ارقام ایجاد نمود (جدول ۱)، به طوری که با افزایش درصد شوری در محیط کشت، درصد کلروز ارقام افزایش یافت.

همبستگی و روابط ترکیبی صفات

ضرایب همبستگی بین میزان شوری (درصد کلرورسدیم) و معیارهای اندازه‌گیری تحمل به شوری ارقام در محیط کشت، که

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]



شکل ۳- نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه صفات اندازه‌گیری شده از کالوس ارقام تحت مطالعه در محیط کشت شور؛ در این شکل فاصله تشابه ۲۵ (کل مقیاس نمودار) برابر با مقدار واقعی ۱/۹۱۲ می‌باشد.

قبلاً به عنوان معیارهای مطلوب (رشد نسبی و درصد کلروز کالوس) معرفی گردیدند، محاسبه و در جدول ۴ آورده شده است. بیشتر تیمارهای شوری برای صفت "درصد کلروز کالوس" و همگی تیمارهای شوری برای صفت "میزان رشد نسبی کالوس" به طور بسیار معنی داری ($P<0/01$) با یکدیگر همبستگی داشتند. البته تیمارهای شوری با معیار "میزان رشد نسبی کالوس" همبستگی نسبتاً بالاتری را نشان دادند. این نتایج باگزارش کارادیموا و دژامبوا (۱۵)، مبنی بر این‌که "رشد نسبی کالوس" معیار مطمئن‌تری برای ارزیابی تحمل به شوری ارقام در محیط کشت می‌باشد، مطابقت دارد.

به منظور تفکیک و تشخیص گروههای واقعی بین ارقام گندم دوروم تحت مطالعه، از لحاظ عکس العمل به شوری در محیط کشت، اقدام به تجزیه خوشه‌ای بر روی صفات اندازه‌گیری شدهٔ کالوس این ارقام گردید. حاصل این تجزیه در نمودار خوشه‌ای شکل ۳ منعکس شده است. نکتهٔ قابل توجهی که در این نمودار نمایان است، افزایش تدریجی تنوع ژنتیکی از ارقام بالای نمودار به سمت ارقام پایین آن است. البته استثناهایی نیز وجود دارد. به هر حال در پایین این نمودار ارقام "دیپر-۶" و "پی.آی ۴۰۱۰۰" تنوع ژنتیکی بسیار متفاوتی را از نظر عکس العمل به محیط کشت حاوی کلرور سدیم، نسبت به بقیهٔ ارقام دارا هستند، به طوری که حتی در فواصل تشابه بالا نیز گروههای مجزا و منحصر به فردی را تشکیل داده‌اند. علت تشکیل گروههای جداگانهٔ این ارقام را می‌توان به درصد کلروز کالوس پایین و رشد نسبی کالوس بالای آنها، به ویژه رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" در محیط کشت شور نسبت داد (جدول ۲).

لازم به ذکر است، اگر نمودارهای خوشه‌ای جداگانهٔ هرکدام

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

از هشت سطح شوری مورد آزمایش را رسم نماییم (نمودارها آورده نشده‌اند) به خوبی مشخص می‌شود که رقم "دیپر -۶" تا قبل از سطح شوری ۰/۶ درصد همراه با رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" یک گروه مجزا و بسیار متنوعی را نسبت به سایر ارقام در پایین‌ترین قسمت نمودارهای خوشه‌ای تشکیل می‌دهند. از آن‌جایی که "دیپر-۶" نسبت به اکثر ارقام تا قبل از سطح شور ۰/۶ درصد از میزان رشد نسبی کالوس بالا و درصد کلروز کالوس پایینی در محیط کشت شور برخوردار است، لذا می‌توان گفت تحت شرایط این آزمایش رقم مزبور از یک تحمل شوری نسبی تا مرز ۰/۶ درصد کلرورسدیم برخوردار است. اما مشاهده خواهد شد که رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" در تمام نمودارهای خوشه‌ای، گروه جداگانه‌ای را به خود اختصاص می‌دهد، به گونه‌ای که حتی در سطوح شوری بالا (۱/۵، ۱/۸ و ۲/۱ درصد کلرور سدیم)، که می‌توان ۲۸ رقم دوروم حاضر را با فاصلهٔ تشابه مناسب به سه دستهٔ متمایز تفکیک نمود، یکی از سه دستهٔ متشکله مربوط به رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" خواهد بود. اکنون تحت شرایط این آزمایش، باتوجه به سابقه‌ای که از رقم اخیر در مباحث قبلی کسب شد، می‌توان تحمل شوری نسبی قابل ملاحظه‌ای را در تمام سطوح شوری مورد بررسی برای آن رقم قایل شد. جالب توجه است که رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" از لحاظ خصوصیات ظاهری در مزرعه و گلخانه نیز نسبت به بقیهٔ ارقام منحصر به فرد بوده است. به‌عنوان مثال، تنها رقمی بوده است که در میان ۴۰۰ رقم و لاین مورد آزمایش در سال ۱۳۷۶ دارای خوشهٔ کاملاً سیاه بوده است. اگرچه صفت ریشک سیاهی در برخی از ارقام گندم دوروم معمول است اما صفت خوشه سیاهی (کل خوشه) نادر است (ارزانی، گزارش منتشرنشده). علاوه بر این، رقم "پی.آی ۴۰۱۰۰" تعداد زیادی پنجه تولید نمود و از لحاظ زمان رسیدگی دیررس تر از سایر ارقام بود. جالب این که صفت سیاه بودن ریشکها در رقم "دیپر-۶" نیز مشاهده شد. بنابراین احتمال دارد بین صفات مزبور و به ویژه ریشکهای تیره رنگ با تحمل شوری رابطهٔ قوی وجود داشته باشد، که مطالعات آتی بیشتری می‌طلبد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که از میان پارامترهای مورد استفاده در ارزیابی تحمل شوری کالوس، معیار "رشد نسبی" از اهمیت و اعتبار بیشتری برخوردار است. حاصل دیگر این بررسی، معرفی ارقام "پی.آی ۴۰۱۰۰" و "دیپر-۶" به عنوان ژنوتیپ‌های برتر متحمل شوری در شرایط ویترو بوده است. این ارقام به لحاظ این که در شرایط شوری، رشدنسبی کالوس بالا و درصد کلروز کالوس پایینی از خود نشان دادند، ممکن است پتانسیل ژنتیکی لازم برای تولید دوروم در محیط شور را داشته باشند. سایر ارقام نیز که رشد نسبی کالوس بالاتری نسبت به بقیهٔ ارقام تحت شرایط شور داشته‌اند، ممکن است بعد از استقرار در خاک شور عملکرد قابل توجهی از خود نشان دهند. اگر در این ارقام قدرت رشد و باززایی در محیط شور به وسیلهٔ انتخاب بهبود یابد، ممکن است به عنوان یک منبع ژنتیکی مهم در برنامه‌های اصلاح و تولید گندم دوروم برای محیطهای شور مورد استفاده قرار گیرند. ارقامی نیز که دارای رشد نسبی پایین و حساسیت به شوری بودند (مانند "استرمسوال-۱"، "سلتا" و "شاهیوندی") احتمالاً در مطالعات فیزیولوژیک و ژنتیکی تحمل شوری به عنوان شاهد مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

نظر به این‌که به طور ظاهری رابطهٔ بین ریشکهای قهوه‌ای تیره یا سیاه رنگ و یا کل خوشه سیاه‌رنگ و تحمل شوری در این آزمایش مشاهده می‌شود، لذا مطالعات ژنتیکی و فیزیولوژیک بیشتری در این رابطه با استفاده از دو رقم دوروم "پی.آی ۴۰۱۰۰" و "دیپر -۶" به عنوان متحمل‌ترین ارقام نسبت به شوری در محیط ویترو که حایز این صفت هستند، توصیه می‌گردد. لازم به ذکر است در صورت تأیید این مطلب از نقطه نظر ژنتیکی (آزمون نتایج)، می‌توان از این صفت مورفولوژیک به عنوان شاخص انتخاب مقاومت به شوری استفاده نمود.

با توجه به این‌که این بررسی از بین ارقام مورد مطالعه، "پی.آی ۴۰۱۰۰" و "دیپر-۶" را به عنوان ژنوتیپ‌های برتر

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

متحمل شوری معرفی می‌کند، بنابراین توصیه می‌شود این ارقام در برنامه‌های به نژادی آینده گندم دوروم، پس از آزمون نمودن آنها در سطح گیاه بالغ در مزرعه یا هیدروپونیک برای تحمل شوری به طرق ذیل به کار گرفته شوند:

الف- پس از تلاقی با یکدیگر، نتاج نسل F_1 یا نسلهای متعاقب آن برای دستیابی و گزینش تغییرات سوماکلونی در محیط ویترو، که سطوح بسیار بالاتری از شوری را تحمل نمایند، به کار رفته و در صورت استفاده از نسلهای اولیه پس از خودگشنی و رسیدن به خلوص مورد نظر به همراه انتخاب، ممکن است لاین‌های با سطوح بسیار بالاتری از تحمل شوری ایجاد گردد.

ب- دو رقم مزبور را همچنین می‌توان از طریق روش هیبریداسیون و با استفاده از انتخاب شجره‌ای در مزرعهٔ شور یا محیط غذایی هیدروپونیک شور، جهت دستیابی به تفکیک یافته‌های متجاوز متحمل شوری و در نهایت لاین‌های با تحمل شوری بیشتر به کار گرفت.

سپاسگزاری

هزینه‌های مربوط به طرح، بخشی از محل اعتبارات دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و بخشی دیگر از سوی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تأمین گردیده است که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Arzani, A. and N.L. Darvey. 1993. Hydroponic and anther culture : Tools for rapid breeding in forage cereals. pp. 83-91. *In* : B.C. Imrie and I.B. Hacker (Eds.). Focused plant improvement : toward responsible and sustainable agriculture. Proc. 10th, Australian Plant Breeding Conf., April, 1993.

2- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. Critical Rev. in Plant Sci. 13: 17-42.

3- Barakat, M.N. and T.H. Abdel-latif. 1996. *In vitro* selection of wheat callus tolerance to high levels of salt and plant regeneration. Euphytica, 91: 127-140.

4- Blum, A. 1988. Plant breeding for stress environments. CRC Press., Boca Raton/FL.

5- Cano, E.A., F. Perez-Alfocea, V. Moreno and M.C. Bolanin. 1996. Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus culture. Plant Cell Rep. 15:791-794.

6- Croughon, T.P., S.J. Stavarek and D.W. Rains. 1978. Selection of NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. Crop Sci. 18:959-963.

7- Dix, P.J. 1993. The role of mutant cell lines in studies on environmental stress tolerance: an assessment. Plant. J. 3:309-313.

8- Galiba, B., G. Kocsy, R. Kaur-Sawhney, J. Sutka and A.W. Galston. 1993. Chromosomal localization of osmotic and salt stress-induced differential alternation in polyamine content in wheat. Plant Sci. 92:203-211.

9- Hajrasuliha, S.N., J. Baniabbassi, J. Metthey and D.R. Nielson. 1980. Special variability in soil sampling for salinity studies in southwest Iran. Irrig. Sci. 1:197-208.

10- Hasegawa, P.M., R.A. Bressan, D.E. Nelson, Y. Samaras and D. Rhodes. 1993. Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plants. PP. 83-89. *In* : A.R. Yeo and T.J. Flowers (Eds.). Monographs on theoretical and applied genetics.

11- Hoagland, D.R. and D.I. Arnon. 1950. The water culture method for growing plant without soil. California Agric. Exp. Stn. Circu., PP. 307-332.

12- Johnson, D.W., S.E. Smith and A.K. Dobrenz. 1992. Genetic and phenotypic relationships in reponse to

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]

NaCl at different development stages in alfalfa. Theor. Appl. Genet. 83: 833 -838.

13- Karadimova, M. and G. Djambova. 1993. Increased NaCl-tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L. and *T.durum* Desf.) through *in vitro* selection. In Vitro Cell Dev. Biol. 29P: 180-182.

14- McCoy, T.J. 1987. Tissue culture evaluation of NaCl-tolerance in medicago species : cellular versus whole plant response. Plant Cell Rep. 6:31-34.

15- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

16- Orton, T.J. 1980. Comparison of salt tolerance between *Hordium vulgare* and *H. jubatum* in whole plants and callus culture. Z. Pflanzenphysiol. 98:105-118.

17- Parrot, W.A. and J.H. Bouton. 1990. Aluminum tolerance in alfalfa as expressed in tissue culture. Crop Sci. 30:387-389.

18- Piqueras. A., E. Olmos and E. Hellin. 1994. Cytological changes related with salt tolerance in embryogenic callus of *Citrus limon*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 39:13-18.

19- Rahman, M., H.S. Krishnaraj and T.A. Thorpe. 1995. Selection for salt tolerance *in vitro* using microspore-derived embryo of *Brassica napus* CV. Topas, and characterization of putative tolerant plants. In Vitro Cell Dev. Biol. 31:116-121.

20- SAS Institute. 1993. SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th Ed., SAS Inst. Cary., NC.

21- Shannon, M.C. 1984. Breeding, selection and the genetic salt tolerance. PP. 231-254. *In* : R.C. Staples and G.H. Toenniessen (Eds.). Salinity Tolerance in Plants. John Wiley, New York.

22- Smith, M.K. and J.A. McComb. 1981 Use of callus cultures to detect NaCl tolerance in cultivars of three species of pasture legumes. Aust. J. Plant Physiol. 8:437-442.

23- Smith, E.S., M. Meiners, N. Putzar and A.K. Dobrenz. 1989. Potential use of measurements of callus and male gametophyte for NaCl tolerance in lucerne breeding. Euphytica, 43:245-251.

24- Spiegel-Roy, P. and G. Ben-Hayyim. 1985. Selection and breeding for salinity tolerance *in vitro*. Plant and Soil, 89:243-252.

25- Tal, M. 1993. *In vitro* methodology for increasing salt tolerance in crop plants. Acta Hortic. 336:69-79.

26- Tal, M. 1994. Invited review-*In vitro* selection for salt tolerance in crop plants: theoretical and practical consideration. In Vitro Cell Dev. Biol. 30P:175-180.

27- Taylor, R.J. and G.A. Secor. 1992. Average tissue diameter as a nondestractive determinant of potato protoplast-derived callus growth. Envir. Expt. Bot. 32: 43-48.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-10-14]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1378.3.1.7.3]