بررسی افزایش تحمل یونجه در برابر خشکی (*Medicago sativa* L.) با استفاده از تنوع سوماکلونال

حسین عسکری[۱]، عباس صفرنژاد[۲]، سیدکمال کاظمی‌تبار[۱] و حسن حمیدی[۲]

چکیده

تنش خشکی در مناطق خشک و نیمه خشک پدیده‌ای غیر قابل اجتناب می‌باشد. انتخاب این‌ویترو با استفاده از کشت بافت به شناسایی دقیق ژنوتیپهای متحمل دربرابر خشکی کمک می‌کند و به‌عنوان مکمل روشهای کلاسیک اصلاحی توان زیادی را برای ایجاد، نگهداری و کاربرد ژرم‌پلاسم عرضه می‌نماید. در این آزمایش بذرهای یونجه یزدی که در قبل برای تحمل دربرابر خشکی انتخاب شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. شناسایی و انتخاب ژنوتیپهای متحمل دربرابر خشکی یونجه (*Medicago sativa* L.) در دو آزمایش از طریق تکنیک هیدروپونیک و کشت بافت در شرایط آزمایشگاه انجام شد. ارزیابی کالوسها در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای شاهد و غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلایکول (۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) با ۱۰ تکرار در هر تیمار بررسی شد. در مرحله بعد میزان باززایی و انتخاب این‌ویترو برای تحمل دربرابر خشکی با ٤۰ تکرار در هر تیمار بررسی شد. گزینش گیاهان متحمل دربرابر خشکی در آزمایش هیدروپونیک در توان منفی ۱۲ بار (۳۲٦/۲٦۱ گرم در لیتر PEG) صورت گرفت. در مرحله آخر مقاومت دربرابر خشکی در نتایج گیاهان گزینش شده (یزدی-م و R1) به همراه ژنوتیپ اولیه (یزدی) در شرایط هیدروپونیک و ریزازدیادی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بدست آمده از کشت بافت نشان دادند که غلظت‌های کم PEG تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر کالوس نداشته، به‌طوری‌که خصوصیات کالوس در آنها به‌صورت نرمال و مشابه با محیط بدون تنش بود. در بررسی اثرات تنش خشکی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها، ژنوتیپهای مختلف بذری (یزدی، یزدی-م و R1) از نظر بسیاری از صفات بررسی شده تفاوت معنی‌داری را نشان نداده و میزان تحمل به خشکی در شرایط تنش ناشی ازPEG تقریباً یکسان بود.

واژه‌های کلیدی: یونجه *Medicago sativa* L.، خشکی Drought، کشت بافت Tissue culture، تنوع سوماکلونال Somaclonal variation و پلی اتیلن گلایکول PEG

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات و عضو هیأت علمی دانشگاه مازندران.

۲- عضو هیأت علمی و کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان، صندوق پستی ۱۱٤۸-۹۱۷۳۵، مشهد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

خشکی یک عامل مهم محدود کننده رشد گیاهان می‌باشد که از یک طرف باعث کاهش سطح زیر کشت گیاهان زراعی شده و از طرف دیگر باعث کاهش عملکرد می‌گردد. در مناطق خشک و نیمه خشک جهان آب قابل دسترس گیاه به اندازه کافی موجود نیست و این امر به طرق مختلف باعث کاهش تولید محصولات زراعی می‌شود. بارندگی در این مناطق هم از نظر کمی و هم از جهت پراکنش غیر قابل پیش‌بینی است. بنابراین ارقامی که در دامنه وسیعی از شرایط رطوبتی بتوانند پاسخهای مناسبی بدهند مورد توجه اصلاح‌گران گیاه و فیزیولوژیستها می‌باشند. به همین جهت امروزه بخش وسیعی از مطالعات به‌نژادی به مطالعه در زمینه واکنش گیاهان به کمبود آب و تنش خشکی اختصاص یافته است (Thomas، ۱۹۹۷). در این راستا استفاده از تکنیک کشت بافت می‌تواند مکمل روشهای به‌نژادی معمول و در جهت افزایش تحمل گیاهان دربرابر تنشهای حیاتی و غیرحیاتی باشد (Zhu و همکاران، ۲۰۰۰). Punia و Jain (۲۰۰۲) استفاده از گزینش این ویترو را برای مقاومت به خشکی در آفتابگردان، مؤثر و با صرف هزینه و زمان کمتر معرفی کردند. کاربرد موفقیت‌آمیز تنوع سوماکلونال به‌وسیله فراوانی ایجاد گونه‌های ویژه پایدار و کارآمدی روشهای گزینش در این گونه‌ها تعیین می‌شود (Van Den Bulk، ۱۹۹۱). تنوع سوماکلونال فقط هنگامی که تغییرات به‌عنوان تنوع فنوتیپی در گیاهان بروز نماید، آشکار می‌گردد و علاوه بر ارزشمند بودن، فراوانی تنوع سوماکلونال برای گزینش صفات مطلوب می بایست بالا بوده و لاینهای گزینش شده نیز تحت شرایط مختلف به خوبی عمل نمایند (Remotti، ۱۹۹۸). 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 (ارزانی، ۱۳۷۸). مزیت گزینش در سطح سلولی این است که میلیونها سلول را می‌توان در فضایی محدود کشت نمود و با بکارگیری تنش مناسب در کشت سلولی به‌طور

Archive of SID

www.SID.ir

یکنواخت آن سلولها را برای مقاومت به تنش غربال نمود (ارزانی، ۱۳۷۸). Duncan و همکاران (۱۹۹۵) به‌وسیله جداسازی گیاهان باززایی شده سورگوم تحت شرایط مزرعه، گیاهان مقاوم با عملکرد بالاتری در شرایط تنش خشکی نسبت به والدینشان بدست آوردند. صفرنژاد (۱۹۹٦) به منظور انتخاب گیاهان مقاوم به شوری یونجه، از انتخاب این ویترو به روش جدید استفاده نمود. وی با استفاده از گزینش سوماکلونهای بدست‌آمده از کشت بافت و انتخاب این ویترو که براساس استفاده از کشتهای در حال تمایز بود، ژنوتیپهای مقاوم به شوری یونجه را در مرحله باززایی گیاه شناسایی کرد. Penkova و همکاران (۱۹۹۵) دو واریته یونجه را برای تحمل دربرابر خشکی با استفاده از تکنیک کشت بافت انتخاب کردند. تحت شرایط ٤۰٪ ظرفیت نهایی رطوبت مزرعه، گیاهانی که از طریق کشت بافت انتخاب شده بودند به‌طور معنی‌داری بهتر از گیاهان شاهد ظاهر شدند و از رشد بیشتری برخوردار بودند. Mohamed و همکاران (۲۰۰۰) گزارش نمودند که گیاهانی که تحت شرایط خشکی به‌صورت این ویترو در گیاه جعفری گزینش شده بودند در شرایط مزرعه‌ای مقاومت دربرابر خشکی را نشان داده و همچنین عملکرد و رشد نسبی آنها تحت شرایط استرس آبی از دیگر کلونهای باززایی شده و گیاهان والد بیشتر بود. Zair و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی افزایش مقاومت در برخی از ارقام گندم، بهبود مقاومت به خشکی را در نتایج گیاهان حاصل از کالوسهایی که در محیطهای حاوی غلظت‌های بالای NaCl بدست آمده بودند، گزارش کردند. آنها ارزشمند بودن روش گزینش را در بالا بردن تحمل به شوری اعلام کردند. ثابت شده است که در اثر تنش تظاهر بعضی از ژنها افزایش و بعضی دیگر کاهش می‌یابد، بنابراین این تغییرات غیر ساختاری ممکن است باعث عدم ثبات مقاومت در مراحل یا نسلهای بعد شود، بنابراین جهت دستیابی به ژنوتیپ مقاوم، بررسی در نسلهای بعد ضروری است (Coulombe و Van Scoyoc، ۱۹۹۰).

هدف از این مطالعه بررسی اثرات تنش خشکی ناشی از غلظت‌های مختلف PEG

Archive of SID

www.SID.ir

بر خصوصیات کالوس و برآورد غلظت مناسب PEG به‌عنوان عامل گزینش در محیط کشت بافت می‌باشد. علاوه بر این افزایش مقاومت به خشکی در نتایج گیاهان گزینش شده از سیستمهای کشت بافت و هیدروپونیک نسبت به ژنوتیپ اولیه در شرایط تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این طرح بذرهای ژنوتیپ یونجه یزدی که درقبل برای تحمل به خشکی به‌صورت این‌ویوو انتخاب شده بودند (آخوندی، ۱۳۸۲) به‌عنوان مواد اولیه جهت بررسی افزایش تحمل آن مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله اول، گزینش ژنوتیپهای مقاوم به خشکی با استفاده از کشت هیدروپونیک انجام شد. به منظور تهیه گیاهچه‌های مورد نیاز برای کشت هیدروپونیک، بذرهای بعد از ضدعفونی در ظرفهای حاوی بیدز همراه محلول غذایی هویت[1] کشت داده شدند. ده روز پس از کاشت، گیاهچه‌های حاصل به گلدانهای مورد نظر (محیط هیدروپونیک) منتقل گشت و برای استقرار آنها بر روی گلدان از صفحات یونولیت استفاده شد. تنش مورد نظر (منفی ۱۲ بار) با استفاده از پلی‌اتین‌گلایکول ٦۰۰۰ و به روش Michel و Kaufmann (۱۹۷۳) تهیه گردید. مقدار PEG لازم برای ایجاد تنش در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برابر با ۳۲٦/۲٦۱ گرم در لیتر می‌باشد که به محلول غذایی اضافه گشت. در نهایت پس از ٤ هفته گیاهچه‌های باقیمانده جهت بذرگیری به خاک منتقل شدند. در مرحله بعد گزینش ژنوتیپهای مقاوم به خشکی از طریق کشت بذرهای یونجه یزدی تحت شرایط این‌ویترو انجام شد. به‌منظور شناسایی و گزینش ژنوتیپهای متحمل به خشکی با استفاده از انتخاب این‌ویترو از طریق کشت بافت، ابتدا بهترین محیط کشت (Safarnejad و همکاران، ۱۹۹٦) برای جوانه‌زنی، کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی انتخاب گردید. در این مرحله نخست ارزیابی کالوسها در شرایط تنش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای شاهد و

1- Hewitt

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت‌های مختلف PEG (۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ گرم در لیتر) با ۱۰ تکرار در هر تیمار صورت گرفت و در مرحله بعد میزان باززایی و انتخاب این‌ویترو برای تحمل به خشکی با ٤۰ تکرار در هر تیمار بررسی شد. وزن تر و خشک کالوسهایی که در محیط کشت کالوس‌زایی محتوی غلظت‌های مختلف PEG قرار گرفته بودند، پس از ۲۸ روز اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری رشد نسبی کالوسها در هر تیمار از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{رشد نسبی} = \frac{\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}}{\text{وزن اولیه}} \times ۱۰۰$$

یکی از مشکلاتی که در هنگام استفاده از مولکولهایی با وزن مولکولی بالا و فعال از نظر اسمزی نظیر پلی‌اتیلن‌گلایکول در شرایط این‌ویترو و در محیط کشت وجود دارد این است که این مولکول‌ها از جامد شدن محیط جلوگیری می‌کنند. بنابراین برای رفع مشکل فوق از پل کاغذی در محیط کشت مایع استفاده شد. در مرحله آخر بررسی مقاومت به خشکی در نسل گیاهان یزدی-م و R_1 صورت گرفت. اثر تنش خشکی بر جوانه‌زنی و مؤلفه‌های رشد در توده‌های مختلف یونجه به‌صورت طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش همانند مرحله نخست انجام شد. توده‌های بذری شامل یزدی، یزدی-م (نتایج گیاهان بدست آمده از گزینش هیدروپونیک) و R_1 (نتایج گیاهان حاصل از گزینش این‌ویترو) در توان آب منفی ۱۲ بار تیمارهای مورد آزمایش بودند. همچنین میزان رشد گیاهچه‌های یزدی-م، R_1 و یزدی در شرایط ریزازدیادی و تحت تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ریزازدیادی توده‌های بذری مورد مطالعه (یزدی-م، R_1 و یزدی) از طریق کشت جوانه انتهایی و با استفاده از محیط کشت پایهٔ MS همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و غلظت‌های صفر (شاهد) و ٦۰ گرم در لیتر PEG انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها پس از انجام کلیه مراحل آزمایش و ثبت اطلاعات توسط روشهای آماری و با استفاده از نرم‌افزارهای رایانه‌ای SAS و SPSS انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

نتایج مربوط به ارزیابی کالوسها در جدول شمارهٔ ۱ آمده است. وزن تر و خشک کالوسهایی که در معرض تنش خشکی ناشی از PEG در محیط کشت کالوس‌زایی قرار گرفته بودند با افزایش غلظت به ترتیب کاهش و افزایش یافت (شکلهای شمارهٔ ۱ و۲). به نظر می‌رسد که کاهش وزن تر کالوس در اثر تنش خشکی به‌علت کاهش رشد کالوس (ناشی از کاهش تقسیم سلولی) در غلظت‌های بالای تنش در محیط کشت نسبت به تیمار شاهد باشد. زمانی‌که کالوسها در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرند، به دلیل کاهش رشد سلولها با افزایش توان خشکی و در نتیجه کاهش وزن تر کالوس و از طرفی افزایش وزن خشک آنها تحت شرایط خشکی، نسبت وزن خشک به وزن تر کالوس افزایش می‌یابد (شکل شمارهٔ ۳). افزایش این نسبت نشان دهنده کاهش جذب آب توسط کالوس در اثر تنش خشکی بود، به‌علاوه اینکه PEG یک ماکرو مولکول است که نمی‌تواند از دیواره سلولی عبور کند در نتیجه با ایجاد فشار اسمزی منفی در بیرون از سلول باعث خروج آب از سلول می‌شود (Walker و Parrott، ۲۰۰۲). کاهش رشد در نتیجه تنش یک پدیده معمول در گیاهان می‌باشد، این امر در اثر مصرف مقدار معینی از کل انرژی موجود برای متابولیسم بافت در جهت مقاومت به تنش است (Basu و همکاران، ۱۹۹۷)، به‌علاوه تقسیم سلولی در حضور تنش، با افزایش آن کاهش می‌یابد. حمیدی و صفرنژاد (۱۳۸۲) با مطالعه در مورد یونجه چند ساله (سوماکلونهای 7R1, 7R2 و ژنوتیپ CUF101) تحت شرایط تنش خشکی ناشی از غلظت‌های مختلف مانیتول (۰، ۰/٤ و ۰/۷ مولار) نشان دادند که با افزایش غلظت مانیتول (تنش خشکی) در محیط کشت، وزن تر کالوس کاهش یافته است. در یونجه تولید گیاه از طریق کشت بافت بیشتر فرآیندی دو مرحله‌ای است که در مرحله اول از بافت مورد کشت، کالوس تولید شده و در مرحله دوم از کالوس طی فرآیند اندام‌زایی یا جنین‌زایی گیاهچه تولید می‌شود (Kristen و همکاران، ۱۹۹۳).

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات انجام شده در یونجه حاکی از آن است که کالوس زایی و باززایی تحت تأثیر عوامل ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه می‌باشد (Safarnejad، ۱۹۹٦). در مطالعه میزان باززایی در محیطهای مختلف، به‌طور کلی وجود تنش در محیط نقش بازدارنده در عمل باززایی را ایفا می‌کند. Makhlouf و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی گیاه سورگوم در برابر تنش خشکی در شرایط این ویترو اعلام نمودند که تنش اسمزی اعمال شده همراه با کشت این ویترو، وزن تر کالوس و توانایی باززایی را کاهش داده است. Basu و همکاران (۱۹۹۷) در بررسی میزان باززایی در برنج هندی در شرایط تنش شوری، کاهش توان باززایی را گزارش کردند. ژنوتیپ مورد مطالعه در این آزمایش دارای توانایی باززایی پایینی بود به طوری که فقط در ۵ درصد کالوسها در شرایط بدون تنش، باززایی مشاهده شد. نمونه‌های باززایی شده در تیمارهای مختلف و همچنین گیاهچه‌های باقی مانده در بالاترین غلظت (٦۰ گرم در لیتر) به منظور ریشه‌دار شدن به محیط کشت ریشه‌زایی منتقل، پس از ظهور و توسعه ریشه‌ها، گیاهچه‌های با ریشه‌زایی مطلوب به منظور گلدهی و تولید بذر به گلدانهای محتوی خاک استریل منتقل شدند. نتایج حاصل از آزمایش جوانه‌زنی، کاهش شدید میزان جوانه‌زنی را در شرایط تنش (منفی ۱۲ بار) نشان داد، به طوری که در توده‌های بذری یزدی، R_1 و یزدی–م به ترتیب ۲۰، ۱۰ و ۱۰ درصد بذرها جوانه زدند، این در حالی بود که در شرایط کشت هیدروپونیک در تمام تیمارهای بذری درصد جوانه‌زنی آنها بیش از ۸۵ درصد بود. اثرات مستقیم ناشی از تجزیه کندتر آندوسپرم یا انتقال کندتر مواد تجزیه شده به گیاهچه‌ها، از عوامل کاهش دهنده درصد جوانه‌زنی در شرایط تنش می‌باشد (کوچکی و مؤمن شاهرودی، ۱۳۷۵). نتایج مربوط به ارزیابی گیاهچه‌ها در شرایط تنش در کشت هیدروپونیک در جدول شماره ۲ و ۳ آمده است.

مقایسه میانگین طول ریشه‌ها نشان داد که میان توده‌های مختلف بذری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. میرحسینی ده‌آبادی (۱۳۷۱) در مقایسه چند توده یونجه

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده نمود که با افزایش تنش خشکی از طول ریشه کاسته می‌شود. از مؤلفه‌های مورد مطالعه دیگر طول ساقه بود که توده‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان دادند. صفرنژاد و همکاران (۱۹۹٦) با مطالعه اثر خشکی بر گیاهچه‌های یونجه گزارش نمودند که طول ریشه و ساقه گیاهچه‌های ١٤ روزه همراه با افزایش غلظت PEG کاسته می‌شود. در حالی که نسبت طول ریشه به ساقه افزایش می‌یابد. این کاهش توسط خشکی را می‌توان به‌دلیل محدودیت فشار تورگر یا سخت شدن دیواره دانست. تجزیه و تحلیل وزن تر ساقه نشان داد که بین تیمارهای بذری در شرایط تنش اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در حالی که اثر توده‌ها بر وزن خشک ساقه بسیار معنی‌دار بود. بسیاری از گونه‌های گیاهی با افزایش سهم مواد فتوسنتزی اختصاص یافته به رشد ریشه و در نتیجه افزایش نسبت ریشه به اندامهای هوایی و حجم آب قابل دسترس برای گیاه به خشکی پاسخ می‌دهند (Smith، ۱۹۹۰). تجزیه و تحلیل داده‌های وزن تر و خشک ریشه به ترتیب تفاوت معنی‌دار و غیر معنی‌داری را نشان دادند. میرحسینی ده آبادی (۱۳۷۳) با بررسی اثرات تنش خشکی بر روی گیاه یونجه اعلام کرد، تغییر وزن ماده خشک اندامهای مختلف یونجه نشان می‌دهد که از نظر اختصاص هیدراتهای کربن، ریشه و برگ تقدم دارند و به همین دلیل وزن ماده خشک ساقه به نسبت بیشتری کاهش می‌یابد. Busso و همکاران (۱۹۹۸) با بررسی میزان و تقسیم‌بندی وزن خشک یونجه *Medicago minima* گزارش دادند که رشد اندام هوایی نسبت به رشد ریشه حساسیت بیشتری به تنش آب از خود نشان می‌دهد، آنها همچنین نشان دادند که در اثر افزایش تنش آب نسبت وزن ریشه به ساقه افزایش می‌یابد.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آزمایش ریزازدیادی نشان داد که میزان رشد نسبی جوانه‌ها متأثر از تنش و توده‌های بذری نبوده و بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، با این وجود اثر متقابل بذر و عامل خشکی بر میزان رشد در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین رشد نسبی R_1 با ۲/۱۱ و یزدی با ۱/۸٦

Archive of SID

www.SID.ir

به ترتیب بیشترین و کمترین میزان رشد را دارا بودند. همچنین مقایسه میانگین‌های میزان رشد، بالا بودن این مؤلفه را در غلظت صفر (شاهد) با میانگین ۲/۲ نسبت به غلظت ٦٠ گرم در لیتر با میانگین ۱/۸۵، نشان داد. رشد اندامها به سرعت تولید سلولهای جدید و سرعت بزرگ شدن این سلولها بستگی دارد. هر دو فرآیند به آماس سلولی حساس هستند. اما میزان این حساسیت احتمالاً به بافت، گونه یا شدت تنش بستگی دارد. وقتی گیاهان در معرض خشکی قرار می‌گیرند انعطاف‌پذیری دیواره سلولهای در حال رشد برگها و ساقه‌ها عموماً کم شده و توسعه سلول و در نتیجه رشد اندام کاهش می‌یابد (کافی و مهدوی دامغانی، ۱۳۸۱). نتایج حاصل از کشت بافت نشان می‌دهد که غلظت‌های کم پلی‌اتیلن گلایکول تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر خصوصیات کالوس در مقایسه با محیط بدون تنش نداشت. در آزمایش اثرات تنش خشکی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌ها، ژنوتیپهای بذری یونجهٔ یزدی، یزدی–م و R_1 از نظر بسیاری از صفات مورد مطالعه تفاوتی را نشان نداد و میزان تحمل دربرابر خشکی مشابهی در شرایط تنش ناشی از PEG داشت.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شمارهٔ ۱- نتایج تجزیه واریانس در آزمایش اثر تنش خشکی بر خصوصیات کالوس.

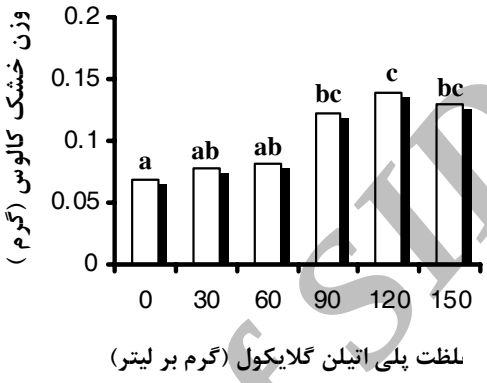
صفت	S.O.V	df	MS	F	C.V
کالوس وزن تر	تیمار	٥	۰/۰۹۳	٥/۰۹**	۱۳/۰٤۹۳
	خطا	٥٤	۰/۰۱۸۳		
کالوس وزن خشک	تیمار	٥	۰/۰۲٤	٦/۰٥**	۲۰/۱٤
	خطا	٥٤	۰/۰۰٤		
نسبت وزن خشک به تر	تیمار	٥	٤/٦۹۱	۲۹/۹۱**	۱۲/۹
	خطا	٥٤	۰/۱٥۷		
کالوس رشد نسبی	تیمار	٥	۰/۰۳۳	ns۱/۷۹	۱۰/۷٦
	خطا	٥٤	۰/۰۱۸		

**و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱ درصد و غیر معنی‌دار.

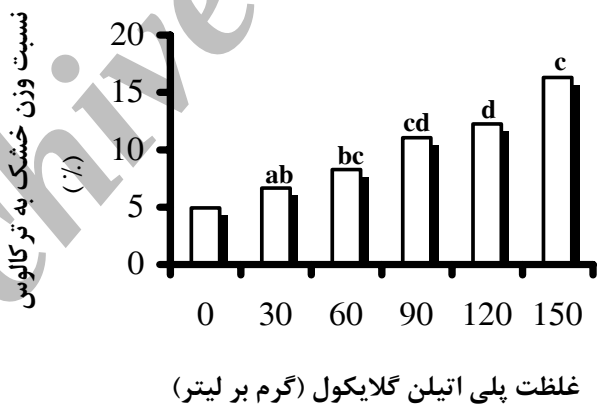
شکل شمارهٔ ۱- نمودار اثر غلظت‌های مختلف PEG بر وزن تر کالوس.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل شمارهٔ ۲- نمودار اثر غلظت‌های مختلف PEG بر وزن خشک کالوس.



شکل شمارهٔ ۳- نمودار اثر غلظت‌های مختلف PEG بر نسبت وزن تر به خشک کالوس.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شمارهٔ ۲- نتایج تجزیه واریانس در آزمایش اثر تنش خشکی بر تیمارهای مختلف بذری.

صفت	S.O.V	df	MS	F	C.V
طول ریشه	تیمار	۲	۹/۰٦٤	۱/٤۱ ns	۱٤/٤٦
	خطا	٦	٦/٤۲۸		
طول ساقه	تیمار	۲	۲/٥٦۲	۱۰/٤۲*	۱۰/۳۱
	خطا	٦	۰/۲٤٦		
وزن تر ساقه	تیمار	۲	۰/٦۹٤	۲/۰۲ ns	۰/۲۱۳
	خطا	٦	۰/۳٤۳		
وزن خشک ساقه	تیمار	۲	۰/۱۹۳	۱٦/۳۹**	۰/۳۷
	خطا	٦	۰/۰۱۲		
وزن تر ریشه	تیمار	۲	۱٦۱/۰۳	٥/٦۲*	۲۲
	خطا	٦	۲۸/٥٥		
وزن خشک ریشه	تیمار	۲	۳/۰٦٥	۲/۸۳ ns	۲٦/٦
	خطا	٦	۱/۰۸۲		
نسبت وزن خشک ریشه به ساقه	تیمار	۲	۰/۰۰۱٤	۰/۲٥ ns	۱۰/۲۷
	خطا	٦	۰/۰۰٥٥		
تعداد گیاه زنده مانده	تیمار	۲	۰/۰٥۲	۰/۲۸ ns	۱۳/۷۹
	خطا	٦	۰/۱۸٥		

ns ، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ٥ درصد و ۱ درصد

جدول شمارهٔ ۳- مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در مرحله گیاهچه‌ای در شرایط تنش خشکی (منفی ۱۲ بار).

صفت / تیمار	یزدی	R_1	یزدی - م
طول ریشه (cm)	۱۹/٤۲ a	۱٦/۰۱ a	۱۷/۱٦ a
طول ساقه (cm)	٥/۳۱ a	٥/۳۷ a	۳/۷٤ b
وزن تر ساقه(mg)	۳۲/۱۳ a	۲۳/۳۳ a	۲۳/۰۱ a
وزن خشک ساقه(mg)	۸/۸۳ a	٦/٤٥ b	٦/۳۸ b
وزن تر ریشه(mg)	۳۱/٦۸ a	۲۰/۰۹۳ b	۱۸/۱۱۸ b
وزن خشک ریشه (mg)	٥/۰۷ a	۳/۲٦ a	۳/۳۸ a
نسبت وزن خشک ریشه به ساقه (٪)	٥۷ a	٥۰ a	٥۲ a
تعداد گیاه زنده مانده	۹ a	۱۰/۳۳ a	۱۰/۳۳ a

(دانکن $\alpha = 0.05$)

Archive of SID

www.SID.ir

منابع مورد استفاده

۱- آخوندی، م.، ۱۳۸۲. بررسی عکس‌العمل یونجه (*Medicago sativa* L.) به تنش خشکی در مراحل جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای. دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- ارزانی، ا.، ۱۳۷۸. اصلاح گیاهان زراعی.(تألیف: پولمن، ج. م. و دی. آ. اسلیپر). مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان، ٦٠٦ صفحه.

۳- حمیدی، ح. و صفرنژاد، ع.، ۱۳۸۲. بررسی ویژگیهای مورفولوژی و بیوشیمیایی کالوسهای یونجه (*Medicago sativa* L.) و باززایی آنها در برابر تنش اسمزی. پژوهش و سازندگی (در زراعت و باغبانی)، شمارهٔ ۵۸: صفحات ۸۸-۸٤.

٤- کافی، م. و مهدوی دامغانی، ع.، ۱۳۸۱. مکانیسمهای مقاومت به تنشهای محیطی در گیاهان. (تألیف: آمار جیت اس. بسرا. و کا. بسرا. رانجیت). انتشارات دانشگاه فردوسی، مشهد، ٤٦٧ صفحه.

۵- کوچکی، ع. ر. و مومن شاهرودی، ح. ۱۳۷۵. اثر پتانسیل آب بر اندازه بذر و خصوصیات جوانه بذر نخود (*Cicer srietinum*). مجله بیابان، جلد ۱، شمارهٔ ۲: صفحات ٦٦-۵۳.

٦- میرحسینی ده‌آبادی، ر.، ۱۳۷۱. چگونگی مقاومت به خشکی یونجه. پژوهش و سازندگی، شمارهٔ ٢٦: صفحات ۱۷-۱۲.

۷- میرحسینی ده‌آبادی، ر.، ۱۳۷۳. مقایسه هشت رقم اسپرس و یونجه و بررسی عکس‌العمل اسپرس به خشکی در مزرعه. پژوهش و سازندگی، شمارهٔ ۲۵: صفحات ٦٨-٦٤.

8- Basu, S., G. Gangopadhyay, B.B. Mokherjee and S. Gupta. 1997. Plant regeneration of salt adapted callus of indian rice (Var. Basmati 370) in salian condition. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50: 153-159.

9- Busso, C.A., O.A. Fernandez and D.E.F. Fedorenko. 1998. Dry weight production and partitioning in *Medicago minima* and *Erodium cicutarium* under water stress. Anuals of Botany, 82: 217- 227.

10- Coulombe, E.J. and S.W. Van Scoyoc. 1990. *In vitro* selection methods for aluminium tolerance in alfalfa. Plant Breeding Abstract, 60: 58-59.

11- Duncan, R.R., R.M. Waskom and M.W. Naborrs. 1995. *In vitro* screening and field evaluation of tissue-culture-regenerated Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) for soil stress tolerance. Euphytica, 85: 373-380.

12- Kristen, F., C.W. Paniek and B. Kejoy. 1993. Characterization of competence during of somatic embryogenesis in a alfalfa tissue

Archive of SID

www.SID.ir

culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34: 125-132.
13- Makhlouf, A.,Y. Mabrouk., M. El-Saied. And M. Mahdy. 2002. *In vitro* selection for drought tolerance in sorghum (Sorghum bicoler L.)and regeneration evaluation of selected genotypes. Alexandra Jurnal of Agricultural Research, 47: 77-88.
14- Michel, B.E. and M.R. Kaufmann .1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiol, 57: 914- 916.
15- Mohamed, M.A.H., P.J.C.Harris. and J. Henderson. 2000. *In vitro* selection and characterization of a druoght tolerant clone of Tagetes minuta. Plant Science, 159: 213-222.
16- Penkova, D., D. Nedjalkov., D. Djilianov., D. Nedyalkov. and D. Dzhilyanov. 1995. Early screening for drought tolerance in cultivated alfalfa. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 1: 429-32.
17- Punia, M.S. and A. Jain. 2002. *In vitro* selection for drought tolerance in sunflower (Helianthus annuus L.). National Journal of Plant Improvement, 4: 27-30.
18- Remotti, P.C. 1998. Somaclonal variation and *in vitro* selection for crop inprovement. In: S.M., Lain, D.S. Brar, and B.S. Ahloowalia, (eds.). PP. 169-201, Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement.
19- Safarnejad, A. 1996. Improvement in salt and drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) using tissue culture and molecular genetic techniques. Ph.D. Thesis, University of Liverpool, U.K.
20- Safarnejad, A., Collin, H., Bruce, K. D. and McNeillly, T. 1996. Characterization of alfalfa following *in vitro* selection for salt tolerance. Euphytica, 92: 55-61.
21- Smith, H. 1990. Signal perception, differential expression within multigene and the molecular basis of phonology plasticity. Plant Cell and Environmental, 13: 585-594.
22- Thomas, H.1997. Drought resistance in plant. In: A. S. Barsa and R.K. Barsa (eds.). PP. 1-42, Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plant. Academic Puplisher..
23- Van Den Bulk, R.W. 1991. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding. Euphytica, 56: 269-285.
24- Walker, D.R. and W.A. Parrott. 2002. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohol on soybean somatic embryo germination and conversion. Plant Science, Vol: 71. No: 2.
25- Zair, I., A. Chlyah., K. Sabounji., M. Tittashen. and H. Chlyah. 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73: 237-244.
26- Zhu, G.Y., J.M. Kinet., P. Bertin., J. Bouharmont and S. Lutts. 2000. Crosses between cultivars and tissue culture selected plants for salt resistance improvement in rice., *Oryza sativa*. Plant Breeding, 129: 497-504.

Archive of SID

www.SID.ir