کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم صراط الذين
انعمت عليهم غير المغضوب عليهم
ولا الضالين

دانشگاه رازی
دانشکده کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه ی کارشناسی ارشد گرایش اصلاح نباتات

عنوان پایان نامه
بررسی مقاومت به خشکی ژنوتیپ های گندم دوروم در شرایط این ویترو

اساتید راهنما
دکتر کیانوش چقامیرزا
دکتر عزت اله فرشادفر

نگارش
لیلا اکبری

فروردین 89

دانشکده کشاورزی
گروه زراعت واصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

نام دانشجو: لیلا اکبری

تحت عنوان

بررسی مقاومت به خشکی ژنوتیپ های گندم دوروم در شرایط این ویترو

در تاریخ 1389/1/25 توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه به تصویب نهایی رسید.

1- استاد راهنما	دکتر کیانوش چقامیرزا	با مرتبه علمی استادیار	امضاء
2- استاد راهنما	دکتر عزت اله فرشادفر	با مرتبه علمی استاد	امضاء
2- استاد داور داخل گروه	دکترسیروس منصوری فر	با مرتبه علمی استادیار	امضاء
3- استاد داور خارج گروه	دکتر محسن فرشادفر	با مرتبه علمی استادیار	امضاء

چکیده

به منظور بررسی واکنش بیست ژنوتیپ گندم دوروم به القاء کالوس و تنش خشکی از طریق کشت جنین در محیط این ویترو، آزمایشی طی دو مرحله در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد. در مرحله اول برای بررسی و مقایسه کالوس زایی از جنین های بالغ و نابالغ بیست ژنوتیپ مختلف گندم دوروم از یک طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار استفاده شد. واکنش کالوس های حاصل از جنین‌های بالغ و نابالغ به تنش خشکی در محیط کشت موراشیک و اسکوگ حاوی پنج مقدار مختلف پلی اتیلن گلیکول 6000 (200- 0 گرم در لیتر) بررسی شد. ارزیابی ژنوتیپ ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت آزمایش فاکتوریل 5×20 در سال 88- 86 انجام شد. در کشت جنین های بالغ و نابالغ صفات درصد القاء کالوس، سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز) ، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) و درصد باززایی گیاهچه در محیط القاء کالوس، سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر)، درصد محتوای آب کالوس، شاخص تحمل کالوس و درصد کلروز کالوس در شرایط تنش مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده ژنوتیپ شماره 3 به عنوان ژنوتیپ برتر در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در کشت جنین بالغ و نابالغ از نظر صفت القاء کالوس و ژنوتیپ‌های 5 و 11 برترین ژنوتیپ‌ها در مرحله باززایی گیاهچه از کالوس‌های حاصل از جنین‌های نابالغ شناسایی شدند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری تنش نشان داد که اثر ژنوتیپ‌ها، سطوح مختلف خشکی و اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی برای صفات مختلف معنی‌دار بود. در مرحله القاء کالوس از جنین بالغ بین سرعت رشد کالوس و رشد نسبی کالوس همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد. شاخص تحمل کالوس با سرعت رشد نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس در شرایط تنش خشکی همبستگی داشت. در مرحله القاء کالوس از جنین نابالغ و هم چنین در شرایط تنش بین سرعت رشد کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس همبستگی مثبت و معنی دار وجود داشت. تجزیه کلاستر، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را بر اساس صفات اندازه گیری شده کالوس حاصل از جنین بالغ و نابالغ تحت تنش خشکی به چهاردسته گروه بندی نمود. ژنوتیپ های شماره 2 و 4 در کشت جنین بالغ در یک گروه بوده در حالیکه این ژنوتیپ‌ها در کشت جنین نابالغ در گروه‌های متفاوت تحت عنوان گروه ژنوتیپ های مقاوم قرار گرفتند.

با توجه به نتایج بدست آمده در کشت جنین بالغ و نابالغ، ژنوتیپ شماره 4 به علت دارا بودن رشد نسبی کالوس، سرعت رشد نسبی کالوس، درصد محتوای آب بیشتر و درصد کلروز پایین‌تر در سطوح مختلف خشکی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به عنوان ژنوتیپ متحمل نسبت به خشکی شناسایی شد.

کلمات کلیدی: کشت جنین، القاء کالوس، تحمل خشکی، گندم دوروم.

فصل اول

مقدمه و بررسی منابع

مقدمه

گندم دوروم از جنس تریتیکوم[1] و با نام علمی تریتیکوم دوروم[2] یک آلوتتراپلوییدبا تعداد کروموزوم 28= 4x = 2n و فرمول ژنوم AABB می باشد(29). گندم آلوتتراپلوییددوروم که برای تولید ماکارونی و اسپاگتی در سطح جهان کشت داده می شود از دیدگاه اقتصادی برای بیشتر کشورها حایز اهمیت است(31). موارد متعدد مصرف گندم دوروم در صنعت و تغذیه اهمیت این محصول را روز به روز بیشتر می سازد، تهیه ماکارونی به دلیل داشتن پروتئین بالا و گلوتامین قوی عمده ترین نوع مصرف این محصول است(57). **تنش خشکی** یکی از مهم ترین عوامل کاهش دهنده رشد محصولات در مناطق خشک و نیمه خشک جهان می باشد و نقش مهمی را در متابولیسم گیاهان در تمامی مراحل رشد ایفا می کند(103). حدود 26 درصد اراضی کل دنیا تحت تاثیر تنش خشکی قرار دارند و ایران نیز جزء کشورهایی است که در مناطق خشک و نیمه خشک قرار گرفته است(5). در این مناطق علاوه بر بارندگی پایین (کمتر از 300 میلی متر)، توزیع بارندگی از سالی به سال دیگر متغیر است. و پیش بینی مقدار و توزیع آن بسیار مشکل می باشد. محدودیت منابع آبی و سایر عوامل باعث توجه بیشتر به مطالعه اثرات تنش خشکی و انتخاب ارقام مقاوم به خشکی شده است. روش های اصلاح سنتی در بررسی تنش های زنده و غیر زنده با مشکلاتی همچون نبود فضای مناسب، زمان کافی و نیز از بین رفتن زمینه ژنتیکی در هنگام مقایسه بین گونه های وحشی مقاوم با واریته های زراعی مواجه هستند(55). سیستم کشت بافت برای ارزیابی تحمل به تنش های محیطی مفید است زیرا تنش های محیطی در شرایط درون شیشه ای به سادگی قابل کنترل هستند(56).

ایجاد گیاهان مقاوم خشکی از طریق روش های سنتی بسیار وقت گیر و گاهی غیر ممکن است . بنابراین امروزه از شیوه های جدیدتر از جمله کشت بافت برای ایجاد گیاهان مقاوم به خشکی و سایر عوامل نامساعد استفاده می شود(15). در سال های اخیر تلاش‌های زیادی به منظور تولید گیاهان مقاوم در برابر تنش و خصوصاً متحمل به شوری، با استفاده از تنوع موجود یا ایجاد شده در کشت بافت صورت گرفته است(43). کشت جنین به مدت نیم قرن توسط اصلاحگران گیاهی استفاده شده است و هدف از این تکنیک تکامل گیاهان تحت شرایط استریل در یک محیط غذایی است(68). در روش کشت کالوس معمولاً مشکلات ناشی از تنوع سوماکلونی و یا عدم باززایی گیاه کامل وجود ندارد. موفقیت در این روش نیز بستگی به ارتباط بین بافت کالوس تحمل به تنش در گیاه کامل دارد(29). اطلاعاتی که بتواند اصلاحگران را از طریق گزینش برای صفات فیزیولوژیکی مرتبط با مقاومت به خشکی به منظور افزایش عملکرد واریته‌های زراعی راهنمایی نماید، بسیار اندک می باشد، اما همکاری نزدیک متخصصین فیزیولوژی و اصلاح کنندگان نبات در شناسایی صفات مرتبط با مقاومت به خشکی و بهره برداری از تنوع ژنتیکی موجود برای این صفات مطلوب و انتقال آن ها به ارقام زراعی جدید، می تواند در معرفی ارقام پر محصول مقاوم به خشکی مفید واقع گردد. توجه به یک نکته مهم ضرورت دارد و آن اینکه فقط یک روش گزینش نمی تواند برای

---

[1] *Triticum*

[2] *Triticum durum*

کلیه مناطق اعم از خشک و نیمه خشک مناسب باشد. بنابراین باید روش های موجود را بسته به شرایط ویژه هر منطقه ارزیابی نمود تا بهترین روش برای آن منطقه ارائه گردد (16).

از آنجایی که شناسایی و کاربرد ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در برنامه های به نژادی آینده دارای اهمیت بسزایی می باشد، لذا هدف این مطالعه بررسی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم به القاء کالوس در کشت جنین و ارزیابی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از کالوس‌های حاصل از کشت جنین بالغ و نابالغ در شرایط این ویترو بود.

1- بررسی منابع و کلیات

1-1- غلات

تمامی غلات به دو گروه عمده تعلق دارند، یکی آن هایی که در مناطق معتدله رشد می کنند و به آن ها غلات دانه ریز می گویند که شامل گندم، جو، چاودار ... و گروه دیگر غلات مناطق حاره که شامل ذرت، سورگوم، ارزن و برنج می باشند، از چهار غله مناطق معتدله تنها دو نوع آن یعنی گندم و جو به به طور گسترده ای در مناطق خشک جهان که بارندگی کافی را دارند کشت می شوند. زراعت گندم قسمت عمده کار کشاورزان مناطق نیمه خشک جهان را به خود اختصاص داده است، احتمالاً اجداد وحشی گندم در حدود 10 تا 15 هزار سال قبل از میلاد در این مناطق کشت می‌شده اند(25).

1-1-1- اهمیت غلات

غلات یکی از اساسی ترین و مهم ترین منابع تغذیه در جهان به شمار می روند و به لحاظ موارد زیر دارای اهمیت هستند.

- تولید کننده پروتئین برای بدن انسان (13 درصد)
- حاوی 65- 58 درصد کربوهیدرات
- ارزان ترین منبع انرژی برای بدن انسان
- قابلیت نگهداری در انبار به مدت طولانی
- قابل تغییر به انواع مواد خوراکی
- دامنه سازگاری وسیع، غلات را می توان در شرایط محیطی نامساعد، با وجود کاهش عملکرد آن ها تولید نمود.
- بذور در زمان معینی قابل برداشت و نیز در همان زمان نیز قابل کشت می باشند(81 و 57).

1-1-2- گندم

گندم یک گیاه تک لپه ای از خانواده گرامینه، یکساله، علفی و با نواحی که آب و هوای خشک دارند و با روزهای گرم و شب های سرد در طول فصل رشد مواجه می شوند سازگار شده است. جوانه زنی در دمای کمتر از 2 درجه سانتی گراد رخ می دهد اما دمای بهینه آنها 15 درجه سانتی گراد است و بیشترین تولید گندم در دنیا مربوط به گندم بهاره است. هزاران سال است که گندم در تأمین غذای بشر نقش حیاتی ایفا می کند. باستان شناسان از اهرام مصر نیز گندم کشف کرده‌اند که در ظروف مخصوص آن را نگهداری می‌کرده اند و نیز در سرزمین حاصلخیز بین النهرین به عمل می‌آمده است. سابقه‌ای بیش از 4000 هزار سال قبل از میلاد برای آن می توان تخمین زد(78).

1-1-2-1- مبدا گندم

تمام گونه‌های گندم به یکی از سه گروه زیر که به ترتیب دارای یک، دو یا سه دسته هفت کروموزومی در هر یک از سلول‌های هاپلوئید خود هستند تعلق دارند. هر سه گروه دارای ژنوم مشترکی هستند و این حاکی از مشترک بودن اجداد آن‌ها است. تنها غله‌ای که دارای این ژنوم (A) می باشد گونه‌ی اینکورن[1]، تریتیکوم بوئیتیکوم[2] و تنها گونه‌ی زراعی این گروه تریتیکوم منوکوکوم[3] می باشد. گروه تتراپلوئید، از تلاقی بین تریتیکوم بوئیتیکوم و یک علف چمنی که دارای ژنوم B است و احتمالاً آجیلوپس اسپلتویدس[4] بوده، حاصل شده‌اند. گونه‌های وحشی این گروه تریتیکوم دیکوکوئیدس[5] (امر[6]) است. گونه‌های زراعی مشتق شده از این گروه شامل تریتیکوم دوروم[7]، تریتیکوم تورجیدوم[8]، تریتیکوم دیکوکوم[9] می باشند. از میان این‌ها تنها گونه‌ی تریتیکوم دوروم به طور گسترده در نواحی خشک کشت می شود(57). گندم دوروم از گیاهانی است که در مراکز تنوع آسیای صغیر و خاورمیانه سازش پیدا کرده، با شرایط اقلیمی و مدیترانه‌ای کاملاً سازگار شده و در نیمه غربی ایران نیز ارقام بومی آن از دیرباز کشت شده‌اند(81).

1-1-2-2- سطح زیر کشت گندم

گندم گذشته از جنبه تجاری مهم آن در دنیا، سلاحی کارآمد در مناسبات سیاسی و جهانی است که روز به روز بر اهمیت کاربردی آن افزوده می شود با این که جمعیت ایران در حدود 1% جمعیت جهان است ولی در حدود 2/5% گندم جهان را مصرف می کند. گندم همانند انرژی کالایی است راهبردی و از شاخص های مهم کشاورزی محسوب می شود. در حال حاضر سهم بزرگی از پتانسیل کشاورزی کشور به تولید گندم اختصاص دارد یعنی رقمی در حدود 6 میلیون هکتار که با احتساب 25% ضایعات تقریبی گندم در کشور در واقع حدود 1/3 میلیون هکتار از اراضی مستعد کشور، با صرف کلیه نهاده هایی زراعی، ضایع می شود. سطح زیر کشت سالیانه گندم در ایران شش میلیون هکتار می باشد ومیزان گندم مورد نیاز ایران تقریباً 11 میلیون تن است(14). میزان تولید گندم کشور حدود 44/13 میلیون تن برآورد شده است که 77/64 درصد آن از کشت آبی و مابقی (23/35 درصد) از کشت دیم بدست آمده است. استان فارس علی رغم رتبه دوم از نظر سطح با 79/13 درصد از تولید گندم کشور در جایگاه نخست قرار گرفته است و استان های خراسان، گلستان، خوزستان، کرمانشاه وآذربایجان غربی در تولید گندم کشور در مقام های دوم تا ششم قرار دارند. شایان ذکر

---

[1] Einkorn
[2] *Triticum boeticum*
[3] *Triticum monococcum*
[4] Agylops speltoides
[5] *Triticum dicoccoides*
[6] Emmer
[7] *T.durum*
[8] *T.Turgidium*
[9] *T.dicoccum*

است که حدود 68/52 درصد از گندم کشور در شش استان مذکور تولید شده است و سهم سایر استان ها 32/47 درصد بیشتر نبوده است. گیلان با سهم 12 درصد در تولید گندم کشور در رتبه آخر قرار گرفته است.

1-1-3-گندم دوروم

خانواده گرامینه از لحاظ تعداد کروموزوم به سه گروه دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید تقسیم می‌شوند. گندم دوروم از راسته پوآلس[1]، خانواده پواسه[2]، جنس تریتیکوم و با نام علمی تریتیکوم دوروم یک آلوتتراپلوییدبا تعداد کروموزوم28= 4x = 2n وفرمول ژنوم AABB می باشد(29). گندم آلوتتراپلوییددوروم که برای تولید ماکارونی و اسپاگتی در سطح جهان کشت داده می شود از دیدگاه اقتصادی برای بیشتر کشورها حایز اهمیت است. در کشور ما به دلیل این که 2000 سال قبل از گندم نان اهلی شده، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است(79). در مناطق محدودی کشت می شود و در قسمت‌های خشکی که گندم قرمز بهاره کشت می شود این نوع گندم نیز کشت می شود(25).

1-1-3-1- سطح زیر کشت و میزان تولید گندم دوروم

گندم دوروم با داشتن 21 میلیون هکتار سطح زیر کشت، هشتمین رتبه را در میان غلات جهان داراست. در ایران این گیاه با سطح زیر کشت 338 هزار هکتار در استان های خوزستان، لرستان، اصفهان و خراسان در مزارع دیم کشت شده و به صورت مخلوط با گندم نان استفاده می شود(31). در تمام دنیا، متوسط ناحیه کشت شده به طور تقریب 18 میلیون هکتار است و متوسط تولید در حدود 30 میلیون تن در سال است. اروپا یکی از بزرگترین تولید کنندگان گندم در دنیا است سالیانه به طور متوسط 8 میلیون تن عملکرد دارد سپس کانادا با 4/6 میلیون تن، ترکیه با 4 میلیون تن وآمریکا 3/5 میلیون تن در سال به ترتیب بیشترین تولید کنندگان گندم دوروم می باشند. استفاده عمده از بذور گندم دوروم درتولید سمولینا (خمیر ماکارونی) برای تولیدات ماکارونی به دلیل داشتن پروتئین بالا و گلوتامین قوی است(81،57). موارد متعدد مصرف گندم دوروم در صنعت و تغذیه اهمیت این محصول را روز به روز بیشتر می سازد، تهیه‌ی ماکارونی عمده ترین نوع مصرف این محصول است. گندم دوروم ماده اولیه صنایع ماکارونی سازی است، برتری پروتئین و نشاسته بالا، قیمت نسبتاً ارزان و پخت آسان باعث شده است تا ماکارونی وارد فرهنگ غذایی جامعه شده و روز به روز بر تقاضای آن افزوده شود. با توجه به این که میزان نیاز ماکارونی سازی کشور حدود نیم میلیون تن سمولینا است و امکان تولید آن در کشور وجود دارد، تولید گندم دوروم و رفع نیاز صنایع مذکور دارای اهمیت زیادی است(33،31). مصرف سرانه نان با افزایش تولید و مصرف فرآورده‌های مختلف صنایع ماکارونی سازی کاهش نشان می دهد. علاوه بر این اختلاف قیمت گندم دوروم در بازارهای جهانی نسبت به گندم نان

---

[1] Poales
[2] Poaceae

برخی از کشورها را بر آن داشته تا سطح زیر کشت و تولید این محصول را افزایش داده و به صادرات آن مبادرت ورزند و با این کار مبالغ هنگفتی ارز استحصال نمایند. سالیانه مبالغ هنگفتی صرف تحقیقات در زمینه گندم دوروم می شود و هم اکنون تعدادی رقم در دست معرفی نیز در مؤسسات تحقیقاتی وجود دارد. ولی با وجود وضعیت فعلی کشاورزان رغبتی برای تولید گندم دوروم ندارند(14). در حالی که ماکارونی غذای زود هضم، غنی شده و ارزان قیمتی است، به علت نبود فرهنگ مصرف سرانه، میزان آن در کشور نزدیک به پنج کیلو گرم است که با استانداردهای مصرف در دنیا فاصله زیادی دارد. به طور مثال مصرف سرانه ماکارونی در ایتالیا 26 کیلو گرم، ونزوئلا 12 کیلو گرم و در فرانسه 7/5 کیلو گرم برآورد شده است. در سال زراعی 85 ، از 14/8 میلیون تن گندم تولید شده در کشور 100 هزار تن آن گندم دوروم بوده است. در ترکیه نیز که یکی از مهمترین کشورهای تولید کننده‌ی گندم دوروم می باشد، سطح زیر کشت درحدود 3-1/8 میلیون هکتار و میزان تولید 2/8-4/1 تن در هکتار در سال است(57،81). در استان کرمانشاه رقم زردک نسبت به سایر ارقام محلی گندم دوروم سطح زیرکشت بیشتری دارد، هر چند که سطح زیر کشت و تولید این محصول در مقایسه با گندم نان بسیار کم است(22).

1-2- خشکی

1-2-1- تعریف تنش محیطی

استرس محیطی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش دهنده رشد محصولات در مناطق خشک ونیمه خشک جهان می باشد و نقش مهمی را در متابولیسم گیاهان در تمامی مراحل رشد ایفا می‌کند(103). رشد بهینه گیاه و موفقیت در تولید محصول به شرایطی هم چون خاک مناسب، آب کافی و مواد ضروری نیاز دارد و استرس محیطی یک فاکتور یا ترکیبی از فاکتورهای دیگر است و از رشد و پیشرفت گیاه جلوگیری می‌کند و عملکرد را به شدت کاهش می‌دهد(56،80،103). در بسیاری از سیستم‌های زراعی کمبود رطوبت خاک به عنوان مهم‌ترین عامل محدود کننده عملکرد گیاهان زراعی در انتهای دوره‌های رشد گیاهان زراعی رخ می دهد که حساسیت گیاه نیز در این دوره در بشترین حد خود می‌باشد(19). تنش خشکی ممکن است در گیاهان با کمبود رطوبت یا خشکی القاء شده به وسیله تنش شوری نیز ایجاد شود و باعث افزایش سنتز پرولین و تغییرات متابولیکی دیگر شامل افزایش سنتز اسیدهای فنولی و متابولیت‌های چرب ضروری در جریان تنش شود(38). تنش‌های محیطی دارای دو مقوله ملایم و شدید می‌باشند. بازدارندگی ناشی از تنش ملایم برگشت پذیر و بازدارندگی‌های ناشی از تنش شدید غیر قابل برگشت هستند. بنابراین، شرایط محیطی فقط زمانی برای گیاه مطلوب تلقی می‌شوند که موجب بروز تنش نشوند. از لحاظ انواع تنش نیز به نظر می‌رسد تنش‌هایی که بیشتر در کاهش عملکرد محصول دخالت دارند از نوع تنش‌های ملایم هستند و بدیهی است که این امر در

مورد تنش خشکی[1] نیز صادق می‌باشد(19). خشکی یکی از تنش‌های محیطی رایج است که بر رشد و تولید محصولات زراعی تأثیر می‌گذارد و حاصل ظرفیت ذخیره رطوبتی خاک در مقدار و توزیع بارش در طول چرخه زندگی محصول است و پتانسیل عملکرد گیاه را تعیین می‌کند(95،50). خشکی، شوری، گرما و یخ زدگی شرایط محیطی هستند که اثرات نامطلوبی در رشد گیاهان دارند و کمبود آب نسبت دیگر تنش‌های محیطی رشد و تولید محصولات زراعی را به شدت محدود می‌کند(99). تنش محیطی کمبود آب در گیاهان صدمات متعددی را بر آن‌ها وارد می‌کند و واکنش‌های متفاوتی را در جریان تنش از خود نشان می‌دهند و این واکنش‌ها می‌تواند در جهت بهبود و یا مخالف رشد گیاه تغییر یابد(95،90).

1-2-2- تعریف خشکی

از دیدگاه کشاورزی خشکی عبارت از وقوع دوره‌ای خشک است که منتج به کاهش عملکرد نسبت به حالت تأمین آب می‌گردد. از لحاظ هواشناسی خشکی به یک دوره بدون بارندگی اطلاق می‌گردد که بر سه عامل ظرفیت رطوبتی خاک، تقاضای اتمسفری تبخیر و کارآیی گیاه تأثیر می‌گذارد. از دیدگاه تایز و زایگر مناطق خشک و نیمه خشک مناطقی هستند که مجموع تعرق گیاهی 50 درصد تعرقی است که گیاه در وضعیت عدم محدودیت آب انجام می‌دهد. در چنین مناطقی، آب عامل اصلی محدود کننده رشد گیاه به شمار می رود و به طور عمده تنش با استفاده از آبیاری مرتفع می‌گردد(26).

1-2-3- تأثیر خشکی بر گیاهان

گیاهان در طول چرخه زندگی تحت تاثیر تنش‌های محیطی گوناگون قرار می‌گیرند و تنش در طول دوره رشد گیاه یک فاکتور مهم محسوب می‌شود بعضی از فاکتورهای محیطی می‌توانند گیاه را از جنبه های گوناگون در مراحل رشد و تکامل تحت تأثیر قرار دهند و در این موارد گیاهان با داشتن استراتژی های متفاوت می‌توانند بر این شرایط غلبه کنند و دوره رشد خود را به پایان برسانند. واضح و روشن است که یکی از این فاکتورهای محدود کننده رشد و تکامل گیاه آب است که در اجرای فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی نقش اساسی را دارد آب در حدود 95- 80 درصد از حجم بافت‌های گیاهی در حال رشد را شامل می‌شود. گیاهان در شرایط تنش آبی واکنش‌های متفاوتی مانند افزایش ABA تولید شده در برگ، گسترش سیستم ریشه ای در خاک‌های عمقی‌تر، محدود شدن فتوسنتز و افزایش موم در سطح برگ از خود نشان می‌دهند(41).

---

[1] Drought stress

1-2-4- اهمیت خشکی در ایران

از 165 میلیون هکتار وسعت کشور ما، حدود 120 میلیون هکتار دارای شرایط آب و هوایی خشک، و بیابانی است که بیش از 35 میلیون آن را شوره زار و اراضی تحت تأثیر شوری و کویری تشکیل می‌دهد(33). با توجه به روند سریع افزایش جمعیت و تقاضای روز افزون جامعه برای غذا از جمله نان، لزوم دستیابی به تولیدات غذایی بیشتر در واحد سطح به خوبی احساس می شود. در حدود 26 درصد اراضی کل دنیا تحت تأثیر تنش خشکی قرار دارند و ایران نیز جزء کشورهایی است که در مناطق خشک و نیمه خشک قرار گرفته است. در این مناطق علاوه بر بارندگی پایین(کمتر از 300 میلی‌متر)، توزیع بارندگی از سالی به سال دیگر نیز متغیر است. بنابراین پیش بینی مقدار بارندگی و توزیع آن بسیار مشکل می‌باشد(5،6). بالا بودن مقدار تبخیر و تعرق، محدودیت منابع آبی و سایر عوامل باعث توجه بیشتر به مطالعه اثرات تنش خشکی و انتخاب ارقام مقاوم به خشکی شده است.

1-2-5- تقسیم بندی خشکی براساس زمان

در مناطق گندم خیز جهان، خشکی را با توجه به زمان وقوع آن به سه دسته تقسیم کرده اند: خشکی آخر فصل، خشکی اول فصل، خشکی ادواری

خشکی آخر فصل بیشتر در مناطق مدیترانه‌ای حاکم می‌باشد، یعنی در مناطقی که به طور معمول در مراحل ابتدایی چرخه رشد رطوبت کافی وجود دارد، ولی گیاهان در انتهای مرحله رشد خود با کمبود آب مواجه می شوند. خشکی اول فصل در ابتدای چرخه رشد روی می دهد و در اواخر فصل رشد رطوبت کافی وجود دارد و در بخش جنوبی آمریکای لاتین دیده می شود و نوع سوم خشکی که زراعت با بهره‌گیری از رطوبت باقی مانده ذخیره شده در خاک به عمل می آید. واژه تنش خشکی را برای مواردی به کار می‌برند که تنش بر اثر عدم وقوع بارندگی مفید تحقق می‌یابد(19).

1-2-6- استراتژی های گیاهان در مقاومت به خشکی

از آن جایی که تنش خشکی در مناطق خشک و نیمه خشک به وفور اتفاق می‌افتد گیاهان راهکارهایی برای مقابله با آن دارند. مکانیزم‌های سازگاری که به آن‌ها اجازه می‌دهد در شرایط محیطی گوناگون زنده بمانند و یا عادات رشدی خاصی که برای اجتناب از شرایط تنش دارند. گیاهان متحمل به تنش مکانیزم‌های سازگاری خاصی را گسترش داده‌اند که باعث شده بتوانند درجات مختلفی از تنش را نشان دهند(44).

مکانیزم‌های گیاه در مقاومت به خشکی شامل:

- اجتناب از خشکی[1]، فعالیتی است که گیاه تحت شرایط تنش پتانسیل آب بافت های خود را حفظ می‌کند و معمولاً با تغییرات مورفولوژیکی مانند کاهش هدایت روزانه‌ای، کاهش سطح برگ، تکامل و گسترش سیستم ریشه‌ای و افزایش نسبت ریشه به ساقه همراه است.

- تحمل خشکی[2]، حفظ ساختارهای طبیعی در زمانی که پتانسیل آب گیاه کاهش می‌یابد و با مکانیسم‌های مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سلول یا بافت‌های ویژه حاصل می‌شود که شامل بیان ژن خاص و تجمع پروتئین‌های ویژه می باشد(44).

- فرار از خشکی[3]، فرار از خشکی به صورت توانایی یک گیاه برای کامل کردن سیکل زندگی خود قبل از وقوع کمبود آب در گیاه تعریف شده است. با کوتاه کردن چرخه زندگی گیاه صورت می‌گیرد(67،90، 94). از جمله صفاتی که در این رابطه می‌توان مورد استفاده قرار داد عبارتند از: حساسیت به طول روز، زودرسی و پنجه دهی

- بهبود خشکی[4]، توانایی گیاه برای ادامه رشد و عملکرد بعد از تنش خشکی با حداقل از دست دادن عملکرد است(54).

1-2-7- اصلاح جهت مقاومت به خشکی

گیاهان نه تنها در محیط‌های مختلف رشد می‌کنند، بلکه توانایی سازگاری به درجات مختلفی از تنش را نیز دارند. از این رو 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 قرارگرفته است. سطوح مختلف خشکی به طور مصنوعی و با استفاده از غلظت های مختلف پلی اتیلن گلیکول برای ایجاد پتانسیل‌های اسمزی مختلف القاء شده است. مشخصات فیزیولوژیکی متعددی به عنوان شاخص‌های قابل استفاده برای گزینش ژرم پلاسم دارای مقاومت به خشکی شناخته شده است و بر اساس این مشخصه‌ها گونه‌های متفاوتی از گیاهان مورد آزمون قرار می گیرند(21). در سال‌های اخیر تلاش های زیادی برای تکمیل روش‌های متدوال اصلاحی به منظور تولید گیاهان مقاوم در برابر تنش و خصوصاً متحمل به شوری، با استفاده از تنوع موجود یا ایجاد شده در کشت بافت صورت گرفته است(43). اصلاح برای تحمل به خشکی از طریق روش‌های کلاسیک یک روش زمان بر با بازده پایین است. برای رفع پاره‌ای از این محدودیت‌ها کشت درون شیشه‌ای را در دست یابی به لاین‌های متحمل به خشکی با فرض وجود ارتباط میان واکنش سلول و گیاه می‌توان به کاربرد. اگرچه مشکلات و محدودیت‌های ژنتیکی،

---

[1] Drought avoidance
[2] Drought tolerance
[3] Drought escape
[4] Drought recovery

بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در ایجاد گیاهان متحمل به تنش در روش کشت درون شیشه‌ای وجود دارد، ولی استفاده موفقیت آمیز این تکنیک‌ها در تولید گیاهان مقاوم به تنش در بسیاری از گونه‌ها گزارش شده است(43). شیوه‌های درون شیشه‌ای به طور گسترده‌ای در کنار روش‌های متداول اصلاحی، برای تغییر و اصلاح گیاهان به کار گرفته شده است. کشت جنین، تخمدان و تخمک هم برای نجات جنین، تولید مونوپلوئید و غلبه بر خواب بذر و مشکلات مشابه استفاده شده است. تکنیک نجات جنین نقش بسیار مهمی را برای تولید هیبریدهای بین گونه‌ای و بین جنسی ایفا کرده است. کشت سلولی نیز به همین گونه نقش بسیار مهمی را در تغییر و اصلاح گیاهان ایفا نموده است در اثر کشت سلول یا بافت گیاهی، امکان تولید انواع تنوعات ژنتیکی و غیر ژنتیکی فراهم می‌گردد. از تنوعات ژنتیکی می‌توان برای انتخاب گیاهان مقاوم به تنش، علف کش و سموم استفاده کرد(24). گندم به عنوان یک غله مهم زراعی و یک محصول عمده غذایی در تمامی کشورها دنیا محسوب می شود و تنش آب یک فاکتور مهم زراعی است که بر رشد و عملکرد گیاه تأثیر منفی دارد، با این وجود گونه‌های گندم و ارقام درون گونه‌ها اختلاف جزیی را در واکنش به کمبود رطوبت خاک از خود نشان می‌دهند و افزایش تولید گندم تحت شرایط غیر زنده در طول سال‌های اخیر اهمیت زیادی داشته است(96). روش‌های اصلاح سنتی در بررسی استرس‌های زنده و غیر زنده مشکلاتی همچون نبود فضای مناسب، زمان کافی و نیز از بین رفتن زمینه‌ی ژنتیکی را در هنگام مقایسه‌ی بین گونه‌های وحشی مقاوم با واریته‌های زراعی فراهم کرده است(55). لذا در اصلاح گیاه برای مقابله با خشکی نیازهای بشر و انتخاب طبیعی همدیگر را خنثی می‌نمایند و باید این موضوع در طراحی یک برنامه اصلاحی برای مقاومت به خشکی مورد توجه قرارگیرد.

1-3- کشت بافت

کشت بافت گیاهی به اختصار به کشت پروتوپلاست، سلول، بافت و اندام اطلاق می‌گردد، انواع متنوع کشت به طور معمول شامل رشد مواد عاری از میکروب در محیطی استریل است و می‌توان گفت که مجموعه‌ای از روش‌های آزمایشگاهی برای رشد تعداد زیادی سلول‌های ایزوله تحت شرایط سترون و محیط کنترل شده است(24،73). می‌توان گفت که کشت بافت گیاهی شاخه‌ای مجزا از علم گیاهی نیست بلکه مجموعه‌ای از روش‌های آزمایشگاهی برای تکثیر تعداد زیادی سلول در یک شرایط کنترل شده است(73،91). انگیزه بزرگ کاربرد تکنیک‌های کشت بافت گیاهی جهت تکثیر و اصلاح بسیاری از گونه‌ها ممکن است به کار اولیه مورل 1960 روی تکثیر ارکیده در محیط کشت و گسترش و استفاده وسیع از محیط کشت جدید حاوی غلظت‌های بالای نمک‌های معدنی توسط موراشیک و اسکوگ (1962) نسبت داده شود، از آن زمان به بعد این فناوری به طور قابل ملاحظه‌ای توسعه یافت و امروزه نقش کلیدی در تکثیر، اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک دارد(24). کشت بافت بر اساس سه قابلیت مهم در گیاهان استوار است:

- پرتوانی[1]: قابلیت یا ظرفیت ذاتی یک سلول جهت تبدیل شدن به یک گیاه کامل.
- تمایز زدایی[2]: عبارتست از ظرفیت سلول‌های بالغ در بازگشت به حالت مرسیتمی و ایجاد یک مقطع رویشی جدیدکه توانایی سازمان‌دهی مجدد به اندام‌های جدید را دارا می‌باشند.
- شایستگی[3]: پتانسیل درونی یک سلول یا یک بافت فرضی برای نمو به شیوه خاص.

1-3-1- اهمیت کشت بافت گیاهی

به منظور انتقال ژن و تولید گیاهان زراعی با ویژگی‌های جدید ژنتیکی، به تولید و کشت بافت‌های این گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای نیاز می‌باشد. در این روش سلول، بافت، اندام و یا هر قطعه جدا شده‌ای از گیاه (ریز نمونه) در یک محیط غذایی مصنوعی و در شرایط استریل کشت می‌گردد. تولید گیاه کامل به تعداد زیاد، در مدت زمان کوتاه‌تر نسبت به شرایط طبیعی، از مزایای عمده کشت بافت گیاهی و لازمه‌ی فناوری مهندسی ژنتیک می‌باشد. در کشت بافت گیاهی شرایط متعدد و پیچیده‌ای دخالت می‌کند که ازمهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریز نمونه، ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود(17،24). ایجاد گیاهان مقاوم خشکی از طریق روش‌های سنتی بسیار وقت‌گیر و گاهی غیر ممکن است. بنابراین امروز از شیوه‌های جدیدتر از جمله کشت بافت برای ایجاد گیاهان مقاوم به خشکی و سایر عوامل نامساعد استفاده می‌شود از پدیده های رایج در کشت بافت تنوع سوماکلونی[4] می‌باشد که هر گونه تغییر از نظر ژنتیکی یا کروموزومی در سلول‌های بدنی است و می‌تواند منجر به پیدایش صفات و ویژگی‌های جدید در گیاهان حاصل از آن‌ها شود(15،76). انتخاب این ویترو برای تحمل به استرس غیر زیستی به توسعه مؤثر و معتبر القاءکالوس و سیستم های باززایی گیاه بستگی دارد(45).

1-3-2- کاربردهای کشت بافت گیاهی

- نگهداری بلند مدت ژرم پلاسم و مواد ذخیره‌ی گیاهی
- انتخاب موتانت‌های مفید از طریق جهش‌های خود به خودی و القایی
- تکثیر کلونی با افزایش سریع و در مقیاس بزرگ گیاهان مشابه از یک گیاه مادری برتر از لحاظ ژنتیکی
- حذف پاتوژن‌ها
- تولید زیر نمونه‌های ریشه دار از گونه‌های زینتی چوبی سخت ریشه زا.
- بازیابی هیبریدها از گونه‌های ناسازگار
- تولید گیاهان هاپلوئید از طریق کشت بساک(24،73،91)

---

[1] Totipotancy
[2] Dedifferentation
[3] Competency
[4] Somaclonal variation

1-3-3- کشت جنین

کشت سلول و بافت گیاهی می‌تواند ابزار مؤثری در اصلاح و توسعه گیاهان باشد. استفاده از این تکنیک علاوه بر مطالعه جنبه‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی فرصتی برای تولید و انتخاب موتانت‌ها نیز فراهم می آورد.کشت جنین یکی از روش‌های بیوتکنولوژی است که از مدت‌ها پیش در اصلاح نباتات برای تولید گیاهان هیبرید بین گونه‌ای یا بین جنسی بکار برده شده است(12). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که اندام‌های مریستمی نسبت به اندام های بالغ خیلی مناسب‌تر هستند و کشت درون شیشه‌ای غلات، کماکان با مسایل بزرگی روبروست. اگر چه معرفی2-4,D در کشت بافت، برخی مسائل را در القاء کالوس حل نموده، ولی بیشتر کالوس‌ها رشد فعال ندارند و به ندرت شاهد ایجاد کالوس باززا هستیم(3). روش‌های درون شیشه‌ای در مطالعات زیادی جهت کوتاه کردن دوره‌های اصلاحی به کار برده شده‌اند. کشت جنین به مدت نیم قرن توسط اصلاح‌گران گیاهی استفاده شده است و هدف از این تکنیک تکامل گیاهان تحت شرایط استریل در یک محیط غذایی است جنین‌های جدا شده از بذور در شرایط درون شیشه‌ای کشت شده و پس از تولید گیاهچه به خاک استریل شده منتقل شده و تا مرحله بلوغ درگلخانه نگهداری می شوند(101). همچنین سلول‌های گیاهی کشت شده در مطالعه و بررسی واکنش آن‌ها به تنش‌های محیطی مؤثر می باشند و از طریق این مطالعات می‌توان اثرات یون‌ها، علف کش‌ها، آفت کش‌ها و اثرات سمی که توسط پاتوژن‌ها تولید می-شوند را بررسی کرد(73،91). میزان رسیدگی بذور در نمونه‌های مورد بررسی بسیار حائز اهمیت است و در تشکیل کالوس‌ها اگر چه جنین‌های بالغ از دانه‌های رسیده در تمامی سال در دسترس هستند اما فراوانی القاء کالوس در آن‌ها پایین است(103). واکنش ارقام مختلف گندم نان و گندم دوروم به القاء کالوس و توانایی باززایی نشان داده است که فرآیندهای مورفوژنتیکی بوسیله‌ی ژنوتیپ رقم تعیین می‌شود(60). ارتباط بین کشت بافت و صفات زراعی از طریق کشت جنین مورد بررسی قرار گرفته‌اند و مشخص گردیده که فراوانی باززایی از کالوس‌های بدست آمده از جنین رسیده را می‌توان از طریق دانه در هر سنبلچه و تعداد پنجه تخمین زد و این صفات در مورد جنین نارس کمتر تأثیر می‌گذارند. همچنین ثابت شده است که هر چه اندازه جنین رسیده بزرگتر باشد، کالوس‌زایی و باززایی آن بهتر خواهد بود(75).

1-3-3-1- جنبه‌های کاربردی کشت جنین

- افزایش سلامتی گیاه از جنین‌های زنده یا غیر زنده
- غلبه بر خواب بذور
- کوتاه کردن دوره اصلاحی
- آزمون جوانه زنی بذور
- غلبه بر خود باروری در تولید هیبریدها(73،100)

1-3-3-2- جنین بالغ

در این روش جنین‌های بالغ جدا شده از بذرهای رسیده،کشت می‌شوند. این نوع کشت، زمانی انجام می-شود که جنین‌ها در محیط این ویوو قادر به بقا نباشند، یا جوانه زنی آن‌ها مستلزم گذراندن دوره خواب طولانی باشد(12).کشت جنین بالغ همچنین برای حذف عامل بازدارنده جوانه زنی بذر نیز بکار می رود. خواب بذر بسیاری از گونه‌های گیاهی، بیشتر بدلیل حضور بازدارنده‌های شیمیایی و یا مقاومت‌های مکانیکی موجود در ساختارهای احاطه کننده جنین است تا خواب بافت جنین. این نوع خواب را می‌توان با جدا سازی جنین‌ها از پوشش بذر و کشت آن‌ها در محیط‌های غذایی، شکست. بعضی گونه‌ها، بذرهای عقیم تولید می-کنندکه می‌تواند بدلیل عدم تمایز کامل جنین باشد(57). اوزجن و همکاران(1996) جنین‌های بالغ و نابالغ هفت ژنوتیپ گندم دوروم زمستانه را جهت تشکیل کالوس و باززایی در محیط کشت موراشیک و اسکوگ مورد مطالعه قرار دادند. فراوانی القاء کالوس در جنین‌های بالغ پایین‌تر در حالی که از ظرفیت باززایی بالاتری برخوردار بودند. اوزتورک و همکاران (2005) ارقام گندم زمستانه را برای القاء کالوس از جنین مورد بررسی قرار دادند. اثر ژنوتیپ بر روی تشکیل کالوس، وزن تر و خشک، حجم رطوبت کالوس، تشکیل کالوس و فراوانی باززایی گیاه معنی‌دار شد. بالاترین سرعت تشکیل کالوس از جنین بالغ گندم در محیط کشت موراشیک و اسکوگ با چهار میلی‌گرم در لیتر تو، فور- دی و یک میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید به دست آمده است. رحمان و همکاران(2008) از سه غلظت متفاوت هورمون تو، فور- دی جهت القاء کالوس جنین‌های بالغ گندم دوروم استفاده کردند. حداکثر تعداد کالوس‌ها در محیط کشت پایه با شش میلی‌گرم در لیتر هورمون تو، فور- دی گزارش گردید. رشید و همکاران(2009) در بررسی غلظت‌های متفاوت هورمون-های تو، فور- دی و سیتوکینین جهت القاء و باززایی کالوس از جنین بالغ ژنوتیپ‌های گندم نان، مطلوب‌ترین سطح هورمونی برای هر یک از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را به طور مجزا مشخص کردند. ترهان و همکاران(2004) نتایج مطلوبی را جهت القاء کالوس جنین‌های بالغ گندم نان با چهار میلی‌گرم تو، فور- دی و یک میلی‌گرم نفتالین استیک اسید به دست آوردند. وندراسکلو و همکاران(2008) جنین‌های بالغ نه ژنوتیپ گندم نان در محیط‌های کشت متفاوت حاوی غلظت‌های مختلف از هورمون‌های رشد گیاهی را مورد ارزیابی قرار دادند. صفات القاء کالوس و باززایی گیاهچه بررسی گردید. کالوس‌ها واکنش‌های متفاوتی به محیط-های مختلف از خود نشان داده‌اند. نصیر سالار و همکاران(2006) بذور بالغ ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم را پس از ضد عفونی در محیط کشت حاوی غلظت‌های متفاوت هورمون تو، فور- دی جهت القاء کالوس قرار دادند. لاپتو و همکاران(1984) حداکثر کالوس زایی را جنین‌های بالغ جو در محیط کشت موراشیک و اسکوگ حاوی هورمون تو، فور- دی به دست آوردند.

1-3-3-3- جنین نابالغ

جنین نارس فراوان‌ترین ریز نمونه در مطالعات کشت کالوس و روش‌های تراریزش ژن در گندم می‌باشد، واکنش جنین زیگوتی گندم به القاء کالوس در کشت درون شیشه‌ای توسط محققان زیادی مطالعه شده است. کشت جنین نارس گندم به منظور القاء کالوس اولین بار در سال 1982 انجام شد(27). در باززایی درون شیشه‌ای با استفاده از بخش‌های گوناگون گندم مانند جنین‌های بالغ و نابالغ، آندوسپرم، برگ‌ها و قسمت‌های فوقانی ساقه و ریشه مشخص شده است که در میان این کشت‌ها، کشت جنین نابالغ برای کالوس‌زایی و باززایی مطلوب‌تر بوده است(104،97). به نظر می‌رسد که جنین‌های نابالغ منبع ریز نمونه مناسبی برای القاء کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی در غلات باشند(109،86). ارزانی و همکاران(1999)کالوس‌های به دست آمده از اسکوتلوم جنین نابالغ گندم دوروم را تحت تأثیر هورمون‌های متفاوت قرار دادند. ارقام مورد مطالعه در محیط‌های متفاوت از لحاظ القاء کالوس مقایسه شده‌اند و حداکثر کالوس‌دهی در محیط کشت پایه با دو میلی‌گرم در لیتر هورمون تو، فور- دی به دست آمد. احمدیان تهرانی و همکاران(1385) در بررسی تأثیر تیمارهای دمایی بر باززایی کالوس‌های حاصل از کشت جنین نابالغ جو در محیط کشت موراشیک و اسکوگ حاوی دو میلی‌گرم در لیتر هورمون تو، فور- دی حداکثر کالوس‌زایی و از محیط حاوی یک میلی-گرم در لیتر تو، فور- دی حداکثر باززایی را به دست آوردند.گلکار و همکاران(1386) واکنش بیست و پنج رقم گندم نان به کشت جنین نابالغ را از لحاظ القاء کالوس و باززایی در شرایط درون شیشه‌ای، در محیط کشت موراشیک و اسکوگ حاوی دو میلی‌گرم در لیتر تو، فور- دی و یک دهم میلی‌گرم در لیتر کینتین مورد ارزیابی قرار دادند. حداکثر القاء کالوس در محیط حاوی یک میلی‌گرم در لیتر ایندول3- استیک اسید و حداکثر باززایی با یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین به دست آوردند. حمدی و همکاران(2002) محیط کشت موراشیک - اسکوگ حاوی دو میلی‌گرم در لیتر تو، فور- دی را برای القاءکالوس درکشت جنین‌های نابالغ ذرت معرفی کردند. امیری و همکاران(1383) اثر ریز نمونه بر باززایی و القاء کالوس گندم زراعی را در دو ریز نمونه جنین نارس و رسیده در محیط کشت پایه موراشیک و اسکوگ حاوی دو میلی‌گرم در لیتر تو، فور- دی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که بین صفات مورد مطالعه در تمامی ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی داری وجود دارد و ریز نمونه حاصل از جنین نارس از لحاظ القاء کالوس بر جنین رسیده برتری داشته است. وارشنای و همکاران(1997) در کشت جنین‌های بالغ و نابالغ دوازده ژنوتیپ گندم نان و دو ژنوتیپ گندم دوروم با حضور دو و نیم میلی‌گرم در لیتر هورمون تو، فور- دی حداکثر القاء کالوس را گزارش کردند. برسین و همکاران(2007) جنین‌های بالغ و نابالغ شش رقم تریتیکاله را در محیط موراشیک و اسکوگ حاوی دو میلی‌گرم در لیتر تو، فور- دی از لحاظ القاء و باززایی کالوس مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داده است که جنین‌های بالغ نسبت به جنین‌های نابالغ قدرت باززایی بیشتری دارند. کرسای و همکاران(2004) القاء کالوس و باززایی گیاه از جنین های بالغ و نابالغ در ارقام مختلف گندم را بررسی