

ORIGINAL ARTICLE

Examination and analysis of genes responsive to pathogens in potato

Abbas Saidi^{1*}, Zahra Hajibarat¹, Ahmad Mosuapour Gorji^{2*}, Rahim Ahmadvand³

¹Department of Plant Biology & Biotechnology, Faculty of Life science and biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

²Department of Vegetable Research, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

³Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Correspondence

Abbas Saidi

Ahmad Mosuapour Gorji

Email:

abbas.saidi@gmail.com

mousapour_gorji@yahoo.com

How to cite

Saidi, A., Hajibarat, Z., Mosuapour Gorji, A., & Ahmadvand, R. (2023). Examination and analysis of genes responsive to pathogens in potato. *Crop Biotechnology*, 12(42), 1-15.

ABSTRACT

Potato is one of the most important sources in the supply of food and industrial raw materials not only in Iran but also in the world which its yield is affected by various pathogens. Among these pathogens, PVY, PVX and nematode are the main factors of yield reduction. The molecular mechanism underlying disease resistance in potato remains largely unknown. In this study, analysis of gene expression profiles from the GEO data of three pathogen infections in potato was performed and morphological traits under four stresses were investigated. For this purpose, 501 common genes with different expression (DEGs) were studied in two experiments. Functional enrichment analysis showed that DEGs are more involved in nitrogen and primary metabolic cycle, GTP binding and GTPase binding, which are continuously up-regulated after inoculation with different pathogens. Based on the analysis of morphological traits under four stresses, PVY and PVX/PVY interaction left a significant difference with other stresses (PVX and nematode) on these traits. Potato microarray data extracted from GEO database were used for weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). Based on the results of the network, 2 groups (modules) of genes were obtained whose expression profiles were highly correlated with each other in response to the above-mentioned four stresses. The results of this experiment provide valuable insight into the pathways and genes affected by PVY, PVX, PVX/PVY and potato nematode viruses, which may facilitate to identify genes resistant to many diseases in potato.

KEYWORDS

Candidate, Module, Pathogen, virus, WGCNA.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی و آنالیز ژن‌های پاسخگو به پاتوژن‌ها در سیب‌زمینی

عباس سعیدی^{۱*}، زهرا حاجی‌برات^۱، احمد موسی‌پور گرجی^{۲*}، رحیم احمدوند^۳

چکیده

عملکرد سیب‌زمینی به عنوان یکی از منابع مهم در تأمین مواد اولیه غذایی و صنعتی در ایران و جهان، تحت تأثیر پاتوژن‌های مختلف می‌باشد. از بین این پاتوژن‌ها، PVY، PVX و نماتد جزء اصلی‌ترین عوامل کاهش عملکرد هستند. مکانیسم مولکولی زمینه‌ساز مقاومت بیماری در سیب‌زمینی تا حد زیادی ناشناخته باقی‌مانده است. در این مطالعه، آنالیز پروفایل‌های بیان ژن از مجموعه داده‌های GEO سه آلودگی پاتوژن در سیب‌زمینی انجام شد و صفات مورفولوژیکی تحت چهار تنش مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۵۰۱ ژن مشترک با بیان متفاوت (DEGs) در دو آزمایش بر روی سیب‌زمینی بررسی شد. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی نشان داد که DEGs بیش‌تر در چرخه نیتروژن و متابولیسم اولیه، اتصال GTP و اتصال GTPase نقش دارند که پس از تلقیح با پاتوژن‌های مختلف به طور مداوم تنظیم می‌شوند. بر اساس آنالیز صفات مورفولوژیکی تحت چهار تنش، PVY و برهم‌کنش PVX/PVY اختلاف معنی‌داری را با سایر تنش‌ها (PVX و نماتد) بر روی این صفات بر جای گذاشت. از داده‌های ریزآرایه مربوط به سیب‌زمینی استخراج شده از پایگاه داده GEO برای تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیان ژن وزن‌دار (WGCNA) استفاده شد. بر اساس نتایج شبکه ۲ گروه (ماژول) ژنی به دست آمد که پروفایل بیان آن‌ها در پاسخ به چهار تنش فوق‌الذکر همبستگی بالایی با یکدیگر داشتند. نتایج این آزمایش بینش ارزشمندی را در مورد مسیرها و ژن‌های تحت تأثیر ویروس‌های PVY، PVX، PVY، PVX/PVY و نماتد سیب‌زمینی ارائه می‌دهد که ممکن است شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری‌های متعدد در سیب‌زمینی را تسهیل کند.

واژه‌های کلیدی

پاتوژن، شبکه هم‌بیانی، کاندید، ماژول، ویروس.

^۱گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
^۲گروه تحقیقات سبزیجات، موسسه اصلاح بذر و گیاه (SPII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.
^۳موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

نویسندگان مسئول:

عباس سعیدی

احمد موسی‌پور گرجی

رایانامه: abbas.saidi@gmail.com

mousapour_gorji@yahoo.com

استناد به این مقاله:

سعیدی، عباس، حاجی‌برات، زهرا، موسی‌پور گرجی، احمد و احمدوند، رحیمی (۱۴۰۲). بررسی و آنالیز ژن‌های پاسخگو به پاتوژن‌ها در سیب‌زمینی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۲)، ۱-۱۳.

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) در بین محصولات گیاهی ضروری در سرتاسر جهان رتبه بالایی را به خود اختصاص داده است و در بین مهم‌ترین محصولات غذایی اصلی پس از گندم و برنج در رتبه سوم به لحاظ مصرف قرار دارد (Birch et al., 2012). سیب‌زمینی یک محصول تغذیه‌ای ایمنی است که می‌تواند برای افزایش امنیت غذایی و کاهش سوء تغذیه در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار گیرد (Devaux et al., 2020). ترکیب غذایی غده‌های سیب‌زمینی پیش‌نیازی برای تعیین کیفیت و فراوری مواد غذایی در بخش صنعتی است. اگرچه رشد جمعیت و تقاضا برای غذا در دهه‌های اخیر رو به افزایش بوده است، لیکن هم‌زمان کاهش قابل توجهی در عملکرد سیب‌زمینی تحت تأثیر بیماری‌های مختلف مشاهده شده است (Schulte-Geldermann et al., 2012). سیب‌زمینی برای مصرف تازه و فراوری از غده‌های بذری رشد می‌کند و از این طریق تعداد زیادی پاتوژن از نسلی به نسل دیگر منتقل می‌شوند. برای جلوگیری از بیماری‌های ویروسی و کاهش عملکرد، بذری سیب‌زمینی باید عاری از آلودگی باشد. میزان خسارت از نظر کیفیت و کمیت غده و بسته به عوامل بیماری‌زا بین ۱۰ تا ۸۰ درصد است (Hosseini et al., 2011). تحقیقات نشان داده که ارقام سیب‌زمینی از نظر پاسخ به عوامل بیماری‌زا با یکدیگر تفاوت دارند (Hajibarat et al., 2022, Hajibarat and Saidi, 2023). تجزیه و تحلیل رونوشت برای بررسی بیان ژن و مکانیسم مولکولی درگیر در این استرس مورد استفاده قرار گرفت.

فرآیند تنظیم بیان ژن‌ها توسط پروتئین‌ها که محصول ژن‌ها هستند، به سلول‌ها این امکان را داده است که از مجموعه محدودی از ژن‌ها برای رشد و عبور از شرایط محیطی مختلف استفاده کنند. کشف چگونگی تنظیم ژن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار بوده و موضوع بسیاری از تحقیقات بوده است. ترسیم ژن‌ها به عنوان گره‌ها و کشیدن لبه‌ها بین ژن‌های هم‌بیان شبکه‌ای ایجاد می‌کند که به آن شبکه هم‌بیان ژنی می‌گویند. این شبکه دارای کاربردهای فراوان از جمله یافتن ژن‌های بیماری‌زا می‌باشد. روش‌های مختلف با ایده‌های متفاوت برای استنتاج شبکه ژن‌های داده شده ارائه شده است. هدف برخی از این روش‌ها یافتن اجزایی است که به طور مستقیم بیان ژن را تنظیم می‌کنند. برخی دیگر تعامل مستقیم بین اجزا را نادیده می‌گیرند و سعی می‌کنند اثر یک ژن را بر بیان ژن دیگر بیابند. اصولاً روش‌های موجود از اطلاعات داده شده در مورد ژن‌های ورودی

استفاده می‌کنند و با محاسبه تأثیر ژن‌ها بر یکدیگر، شبکه‌ای را که ژن‌ها بر روی آن ساخته شده‌اند، پیدا می‌کنند. چندین روش شبکه‌ای از ژن‌های داده شده را از غلظت محصولات آن ژن‌ها می‌سازند. برخی دیگر میزان رونوشت‌های ایجاد شده از ژن‌ها را در نظر می‌گیرند. همه این روش‌ها با ظهور فناوری‌های با خروجی بالا محبوبیت بیش‌تری پیدا کرده‌اند. به عنوان مثال، فناوری ریزآرایه به محققان این امکان را داده است که سطوح رونوشت هزاران ژن را در لحظه دلخواه به دست آورند. علاوه بر این، تعدادی از روش‌ها از داده‌های مکانی-زمانی مرتبط با خود ژن‌ها مانند توالی‌های بالادست استفاده کرده‌اند. با وجود پیشرفت فوق‌العاده در تعیین توالی ژنوم گیاهان، اطلاعات کمی در مورد نحوه عملکرد ژن‌ها وجود دارد (Saidi and Hajibrat, 2021a). امروزه ابداع روش‌های جدید با کارایی بالا امکان مطالعه هم‌زمان بیان هزاران ژن را فراهم کرده است. با تجزیه و تحلیل چنین داده‌هایی می‌توان اطلاعات بیش‌تری در مورد سیستم‌های بیولوژیکی به دست آورد (Schaefer et al., 2016). یکی از راه‌حل‌های رایج در زیست‌شناسی سیستم‌ها، بررسی روابط بین ژن‌ها است. از جمله این روش‌ها می‌توان به شبکه هم‌بیان ژنی اشاره کرد که با استفاده از محاسبه همبستگی پیرسون ساخته می‌شوند (Serin et al., 2016). در این شبکه‌ها، ژن‌ها به گونه‌ای به هم متصل می‌شوند که نمایه بیان آن‌ها به طور هم‌زمان در پاسخ به شرایط بیرونی و درونی سلول تغییر می‌کند (Zhang & Horvath, 2005). در گیاهان، از روش شبکه‌های هم‌بیان ژن برای بررسی روابط بین ژن‌ها در ارقام مختلف استفاده شده است (Omranian et al., 2015). با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون (PCC) برای تعیین همبستگی بیان بین جفت‌های ژن از آزمایش فردی، که هم‌زمان بیان شده از طریق روش تحلیل شبکه هم‌بیان ژن وزنی مونتاژ شده است، ممکن است جفت‌های ژنی با PCC بزرگ‌تر از مقدار آستانه انتخاب شده را در ماژول‌های شناسایی شده خوشه‌بندی کند (Langfelder and Horvath, 2008). ژن‌های با عملکردهای مرتبط اغلب دارای الگوهای بیانی مشابهی هستند، ژن‌ها (گره‌ها) و اتصالات (لبه‌ها) در ماژول ممکن است پویایی بیان مشترک را در مجموعه داده‌های بیان ژنی مختلف نشان دهند. چندین مطالعه هم‌زمان در ذرت و آرابیدوپسیس انجام شده است که اکثر آن‌ها مجموعه داده‌های بیان ریزآرایه ارقام در سراسر جهان را ادغام می‌کنند (Bassel et al., 2011, Schaefer et al., 2014). داده‌های بیان ژن در دسترس بودن منابع ژنتیکی را گسترش داده است، که نه

شبکه وزن دار شامل ۱۲۳۴۶ ژن در ۱۴ ماژول ژنی مجزا می‌باشد (Yan *et al.*, 2018). این ژن‌ها به شدت در شبکه‌های هم‌بیانی سیب‌زمینی بیان می‌شوند و به ارقام یا بافت‌های خاص به شکل ماژول‌هایی مرتبط هستند که بر آسیب‌های ناشی از بیماری بر عملکرد سیب‌زمینی و پاسخ‌های استرس، فتومورفوژن و رفع خواب غده تأکید دارند. نکته مهم این است که این ماژول‌های شناسایی شده می‌توانند بیشتر برای تجزیه و تحلیل فاکتورهای رونویسی که به عنوان تنظیم کننده‌های کنترل کننده الگوهای بیان ژن عمل میکنند، استفاده شوند.

مطالعه شبکه‌های هم‌بیانی سیب‌زمینی می‌تواند منابع ارزشمندی را با قوانین بیان ژن سیب‌زمینی در اختیار ما قرار دهد و به طراحی طرح‌های تلاقی مناسب در کشت سیب‌زمینی در مناطق مختلف جغرافیایی و تحلیل زیست‌شناسی سیستم کمک کند (Yan *et al.*, 2018). از آنجایی که اکثر صفات مهم و اقتصادی گیاهان زراعی کمی هستند و توسط چندین جایگاه ژنی کنترل می‌شوند، برای درک اساس مولکولی ژن‌ها، لازم است ژنوتیپ‌سازی را با کمک توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های مرتبط ادغام کرد. درک مکانیسم‌های مولکولی مقاومت گیاه در برابر پاتوژن‌ها با روش‌ها و تکنیک‌های شبکه هم‌بیان وزنی تسهیل می‌شود. یکی از روش‌های مهم برای درک عملکرد ژن و ارتباط ژن از بیان ژنوم، تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی است. رویکرد شبکه هم‌بیانی، شبکه‌ای از ژن‌ها را با فعال‌سازی مشترک در میان گروهی از نمونه‌ها می‌سازد.

امروزه، تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیانی ژن وزنی متداول‌ترین رویکرد زیست‌شناسی سیستمی برای شناسایی الگوی همبستگی‌ها بین ژن‌ها است. برای شناسایی ماژول‌های ژن‌های هم‌بیان، همبستگی آن‌ها با صفات خارجی، و تعیین دقیق ژن‌های هاب کلیدی مفید است. به طور گسترده‌ای برای تشخیص ژن‌های هم‌بیان شده پاسخ‌گو به استرس و سازماندهی دیواره سلولی در پنبه، پاسخ تنش شوری در آراییدوپسیس و برنج، و پاسخ استرس زیستی در آراییدوپسیس استفاده شده است (Wolf *et al.*, 2012). شبکه‌های هم‌بیان شده به عنوان ابزاری هستند که تجزیه و تحلیل بیان ژن را از طریق روابط بین الگوهای بیان ژن به صورت دوتایی توصیف می‌کنند. بررسی‌های هم‌زمان درون و بین گونه‌ها نشان داد که ژن‌های متناظر در الگوهای ژنی اغلب از نظر عملکردی مرتبط هستند. در این مقاله، روش جدیدی برای ساخت شبکه هم‌بیان ژن بر اساس اطلاعات هستی‌شناسی و داده‌های مربوط به بیان آن‌ها ارائه شده است. در این بررسی، آنالیزهای

تنها به عنوان مکمل برای حاشیه‌نویسی عملکرد ژن در مقیاس ژنومیک استفاده شده است، بلکه به شناسایی الگوهای بیان ژن فردی در بین بافت‌ها، گونه‌ها یا شرایط محیطی کمک می‌کند.

پیشینه پژوهش

در شبکه‌های هم‌بیان وزن دار، از حد آستانه برای تعیین وجود یا عدم وجود رابطه بین دو ژن استفاده می‌شود که منجر به حذف اطلاعات زیادی می‌شود. در حالی که در شبکه‌های هم‌بیان وزنی از محدودیت‌های بحرانی استفاده می‌شود و نتایج دقیق‌تری نسبت به شبکه‌های غیر وزنی ایجاد می‌کند (Zhang & Horvath, 2005). در این روش پس از ایجاد شبکه، ژن‌ها در گروه‌های جداگانه (ماژول) قرار می‌گیرند. ماژول‌ها به عنوان خوشه‌هایی از ژن‌ها تعریف می‌شوند که نمایه‌های بیان آن‌ها به شدت با یکدیگر همبستگی دارند (Bergmann *et al.*, 2004). در روش شبکه‌های هم‌بیان وزنی، هر ماژول هم‌بیانی می‌تواند یک پیام بیولوژیکی واقعی را منعکس کند. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) می‌تواند برای بررسی اهمیت بیولوژیکی یک ماژول استفاده شود (Langfelder and Horvath, 2008). شبکه‌های هم‌بیان وزنی در بررسی رابطه بین ژن‌های دخیل در تنش شوری در آراییدوپسیس، پیری برگ در آفتابگردان، خشکی و شوری در انگور، فرآیندهای رشد و نمو در سیب‌زمینی، خشکی در ریشه سیب‌زمینی و بیماری باکتریایی در بادمجان استفاده شده است (Seo *et al.*, 2011, Moschen *et al.*, 2019, Qin *et al.*, 2020, Peng *et al.*, 2021, Li *et al.*, 2023, Tan *et al.*, 2023). با توجه به گسترش ژرم‌پلاسما سیب‌زمینی از طریق اینترگرسیون و هیبریداسیون بین گونه‌ای، محققان بینشی در مورد عملکردهای ژنتیکی در سیب‌زمینی، از ساختار اصلی ژن و عملکرد بیولوژیکی گرفته تا پروفایل‌های بیان آن‌ها را دارند (Yan *et al.*, 2018). در حالی که پیشرفت‌ها در سال‌های اخیر تعداد فزاینده‌ای از مجموعه داده‌های بیان ژن را ایجاد کرده است که پویایی بیان ژن را در بین ارقام سیب‌زمینی در سراسر جهان با استفاده از پایگاه‌های داده ایجاد شده فراهم می‌کند، استنباط مدارهای تنظیمی ژن در فرآیند تنوع ژنتیک سیب‌زمینی هم‌چنان یک چالش کلیدی است. برای پرداختن به این مشکل، مجموعه داده‌های بیان ژن بیش‌تری را می‌توان با هم ادغام کرد تا نتایج دقیق و قابل اجرا ارائه شود. بر اساس مطالعه‌ای که بر روی ۱۶ مجموعه داده از ۱۱ رقم سیب‌زمینی انجام شد و همبستگی الگوهای بیان ژن این ارقام بررسی شد، نتایج مطالعه نشان داد که

شرط‌های توپولوژی بدون مقیاس تقریبی و معیارهای برش بیش‌تر از ۳۰ ژن و ارتفاع برش = ۰/۱۵ تعریف شدند. عدم تشابه ماتریس مجاورت ۰/۲ بود. در مجموع دو ماژول WGCNA (شبکه هم‌بیانی) از ژن‌های ویژه شناسایی شد و همبستگی شبکه‌ها با مقاومت به هر دو بیماری با معیار همبستگی پایداری $p \leq 0.05$ ترسیم شد. ماژول‌های با اهمیت ژن (ضریب همبستگی پیرسون ≤ 0.6) برای آلوده‌سازی PVX، PVY و استفاده از هر دو ویروس، نماد در بافت برگ برای تجزیه و تحلیل بیش‌تر حفظ شدند.

هستی شناسی و آنالیز شبکه هم‌بیانی

برای ژن‌های هر ماژول آنالیز GO توسط نرم‌افزار آنالیز agriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO>) انجام شد. DEGها در ماژول‌های مرتبط با مقاومت PVX، PVY و نماد به طور جداگانه تحت تجزیه و تحلیل غنی‌سازی برای مسیرهای هستی‌شناسی ژن (Blast2GO) انجام شد. به منظور شناسایی تعاملات مستقیم (فیزیکی) و هم‌چنین غیرمستقیم (عملکردی) پروتئین‌های هر ماژول، آنالیز شبکه ژنی با استفاده از STRING (<https://string-db.org>) پایگاه صورت گرفت.

رشد گیاه و آلوده‌سازی

آگریا یکی از پرمصرف‌ترین ارقام سیب‌زمینی در ایران است. برای بررسی واکنش رقم آگریا به ویروس سیب‌زمینی (PVY) Y، ویروس سیب‌زمینی (PVX) X، غده‌های سیب‌زمینی با استفاده از تکنیک‌های الکتروشیمی‌درمانی برای حذف هرگونه عفونت ویروسی بالقوه تیمار شدند. سپس برگ‌های نهال سیب‌زمینی سه هفته‌ای با سه تکرار در شرایط گلخانه (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت نور و رطوبت نسبی ۷۰ درصد) به‌صورت مکانیکی تلقیح شدند. در مرحله چهار تا شش برگی، گیاهان آزمایشی با پودر کربوراندوم تیمار شدند. برگ‌های آلوده به ویروس PVY و PVX با استفاده از بافر فسفات (pH 7.5، ۰.۱M K₂HPO₄، ۰.۰۲۵ M KH₂PO₄) همگن شدند. سپس برگ‌های تلقیح شده پس از ۵ دقیقه آلودگی با آب مقطر شسته شدند. یک و دو روز پس از تلقیح، عفونت ویروسی با علائم موضعی کنترل شد. برگ، ساقه و ریشه بافت‌های آلوده در هفت روز پس از تلقیح از گیاهچه‌های سیب‌زمینی در گلخانه جمع‌آوری شدند. برای نماد، برگ بعد از سه هفته رشد، با سطح نمادنی ۵۰۰ لاور سن دوم

همبستگی بیان ژن و شبکه هم‌بیان ژن را برای شناسایی همبستگی‌ها و واگرایی‌های بیان ژن، که ممکن است حاکی از عملکردهای مشترک یا مسیرهای تنظیمی در بین ارقام مختلف سیب‌زمینی باشد، ترکیب شده‌اند.

روش شناسی پژوهش

تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیان وزنی

برای این بررسی، داده‌های ریزآرایه خام مربوط به پروفایل رونویسی در *S.tuberosum* در PVX، PVY، و آلوده‌سازی نماد از پایگاه داده ریزآرایه GEO بازیابی شدند. مجموعه داده شامل GSM389325 (GSM389326، GSM389327)، GSM389328، GSM389329، GSM389330، GSM389331، GSM389332 و GSM389333) بعد از ۶ روز از آلودگی و برای نماد از مجموعه داده‌های GPL1902 (GSM203093، GSM203094، GSM203095، GSM203096، GSM203097، GSM203098، GSM203099، GSM203100، GSM203101، GSM203102، GSM203103، GSM203104 و GSM203105) در سه مرحله (۵، ۱۰ و ۱۵ روز پس از آلودگی) با چهار تکرار برای هر مرحله انجام شد. برای تبدیل مجموعه پروب به شناسه ژن، از سایت DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) استفاده شد. ژن‌های با بیان کم فیلتر (حذف) شده و ژن‌های باقی‌مانده در آنالیز شبکه هم‌بیان ژن استفاده شدند. ژن‌های بیان‌شده متفاوت (DEGs) با معیارهای $\log_2 FC \geq 2$ و $p < 0.05$ ژن‌های با $\log_2 FC > 2$ و $\log_2 FC < -2$ به ترتیب به‌عنوان DEG با بیان بالا و پایین شناسایی شدند. متعاقباً، WGCNA (تجزیه و تحلیل شبکه هم‌بیان ژن وزنی) برای ایجاد شبکه هم‌بیانی DEGs سیب‌زمینی با استفاده از بسته R (flashClust) انجام شد. WGCNA برای شناسایی ماژول‌هایی با ژن‌های بسیار بیان‌شده استفاده شد و آن‌ها را با ماژول eigengene (ME) دسته‌بندی کردیم. آنالیز WGCNA بر روی گیاهچه‌های سیب‌زمینی سه هفته‌ای انجام شد. بسته WGCNA (R v1.61) (<https://cran.r-project.org/web/packages/WGCNA/index.html>) برای تجزیه و تحلیل ماژول هم‌بیانی DEGها استفاده شد. پارامترهای WGCNA توان آستانه نرم ماتریس مجاورت و معیارهای مجذور ضریب همبستگی ژن‌های ویژه با توجه به پیش

صفتی که فاقد تفاوت معنی‌داری بودند مقایسه میانگین برای آن‌ها انجام نشد.

نماتد در سه تکرار مایه‌زنی شدند و بعد از گذشت ۱۴ روز صفات مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌های پژوهش

نتایج حاصل از بررسی داده‌های ریزآرایه برای این آنالیز از آزمایشات مختلف فراهم شد. ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی مورد استفاده تحت تنش‌های PVY، PVX و نماتد بررسی شدند. شبکه هم‌بیانی ایجاد شده ژن‌ها را درون دو گروه ژنی یا ماژول قرار داد و با استفاده از امکانات نرم‌افزار R هر ماژول با رنگ خاصی نشان‌مند گردید. ماژول آبی (blue) دارای بیش‌ترین تعداد ژن با ۲۲۲ ژن و و ماژول خاکستری (gray) دارای کم‌ترین تعداد ژن با ۱۱ ژن بودند. از آن‌جا که همه ژن‌های سیب‌زمینی برای آنالیز شبکه استفاده شدند، معنی‌داری آماری این ماژول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. حاشیه نویسی GO ماژول‌های کلنید با استفاده از Blast2GO برای مقایسه حاشیه نویسی عملکردی DEG‌های جدید در برابر پایگاه داده پروتئین غیرتکراری NCBI با مقدار E برش 10^{-8} انجام شد (شکل‌های ۱ و ۲).

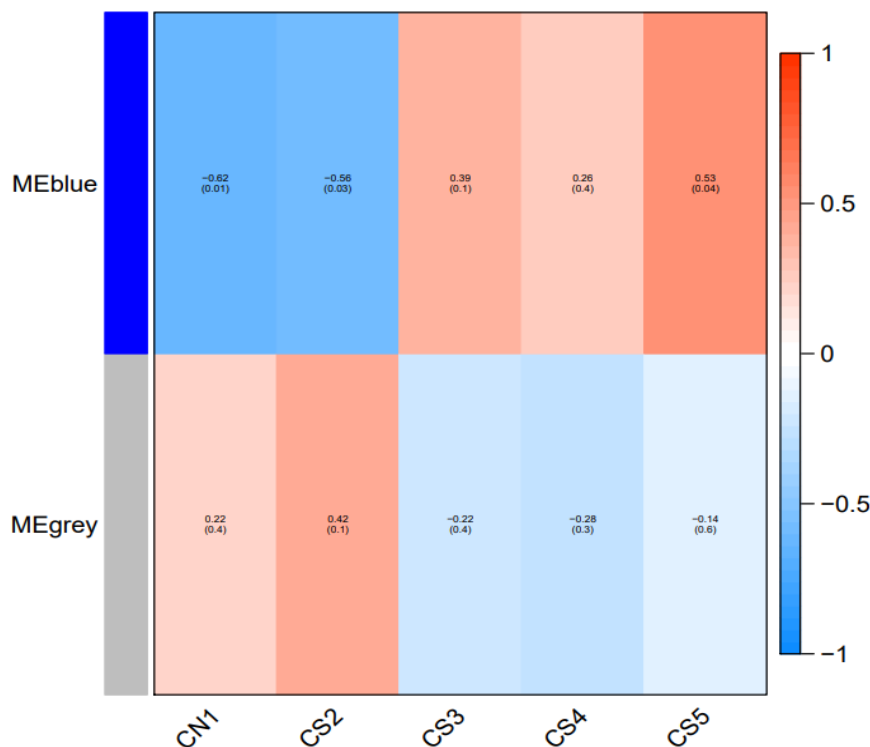
اندازه‌گیری مورفولوژی ریشه و اندام هوایی

در مجموع هشت صفت فنوتیپی نهال، شامل پنج صفت اندام هوایی و سه صفت ریشه اندازه‌گیری شدند. ریشه‌ها و شاخساره‌های تازه در ۱۴ روز پس از تیمارهای نرمال و تنش ویروس Y، X و نماتد نمونه‌برداری شدند. صفات ریشه و اندام هوایی بر حسب طول کل ریشه و ساقه، قطر ساقه، وزن تر و خشک ساقه، وزن تر و خشک ریشه و تعداد ساقه توصیف شدند.

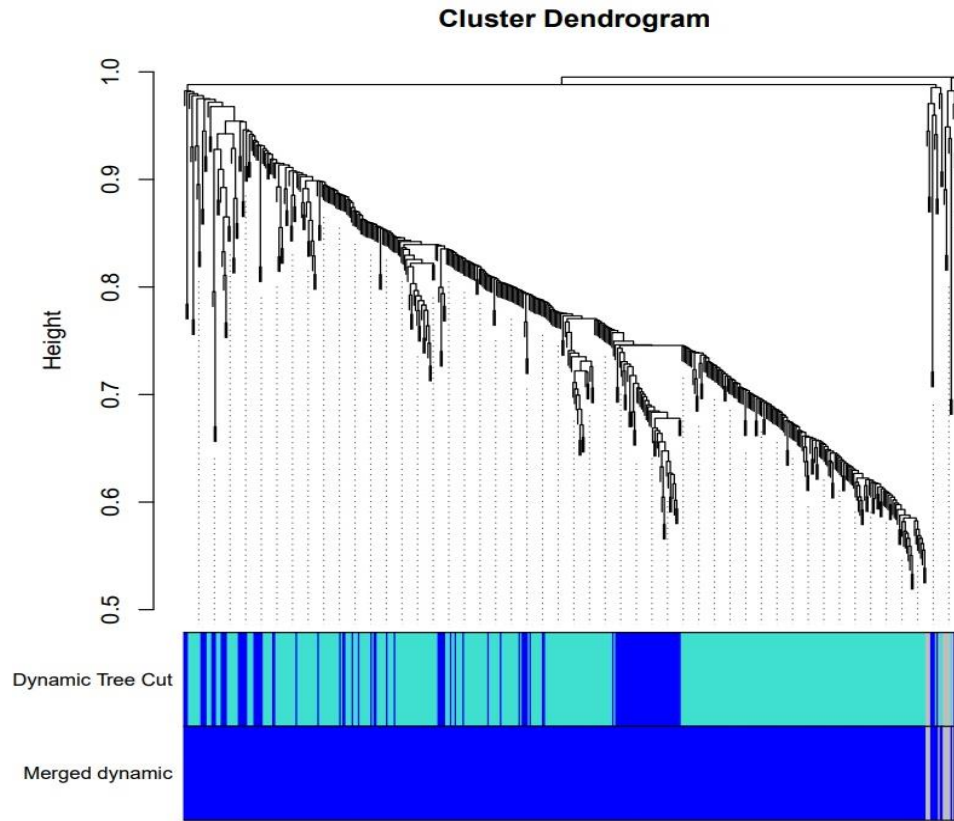
آنالیز داده‌ها

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۴۰۲ در دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. صفات ریشه و اندام هوایی بر حسب طول کل ریشه و ساقه، قطر ساقه، وزن تر و خشک ساقه، وزن تر و خشک ریشه و تعداد ساقه توصیف شد. میانگین‌ها از طریق آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شدند.

Module-trait relationships



شکل ۱. نقشه حرارتی خوشه‌بندی سلسله مراتبی از دو ماژول برای چهار تنش CN1، تنش نرمال؛ CS2، تنش PVY؛ CS3، تنش PVX؛ CS4، تنش نماتد و CS5، تنش PVX/PVX.



شکل ۲. دندوگرام خوشه‌بندی سلسله مراتبی پیوند متوسط ژن‌ها. ورودی عدم تشابه مبتنی بر هم‌پوشانی توپولوژیکی بود. ماژول‌ها که با کد رنگ مشخص می‌شوند، شاخه‌های درخت خوشه بندی هستند.

فعالیت فسفاتاز مقاوم به مولیبدات را با مونوفسفات‌های نوکلئوزیدی به عنوان سوبسترا نشان داد، که تأیید می‌کند که ژن شناسایی شده یک نوکلئوتیداز را کد می‌کند. pH بهینه برای فعالیت ۷-۷/۵ بود. الگوی بیان PvNTD2 نشان می‌دهد که در همه بافت‌های مورد تجزیه و تحلیل، با بیان بالاتر در گره‌های گیاهان بالغ بیان می‌شود. بیان در طول انتوژن برگ حفظ شد و در طول رشد گیاهچه القا شد (Galvez-Valdivieso *et al.*, 2020). این آنزیم برای فسفریله کردن طیف گسترده‌ای از سوبستراهای با وزن مولکولی کم و بالا با ویژگی‌های اغلب بدیع تکامل یافته و در تنش‌های زیستی و غیر زیستی فعال می‌شود (Yin *et al.*, 2018).

در ماژول آبی، شبکه ژنی که با استفاده از گروه‌های ژنی موجود در این ماژول ترسیم شده، ژن PGSC0003DMT400039497 به عنوان پروتئین مرکزی در شبکه‌های هم‌بیان شناسایی شد. این پروتئین به عنوان پروتئین ریبوزومی زیر واحد کوچک است. از جمله پروتئین‌های دیگر در این شبکه مانند کمپلکس پیرووات دهیدروژناز شامل نسخه‌های متعدد از سه جزء آنزیمی است: پیرووات دهیدروژناز (E1)، دی هیدرولیپوآمید استیل ترانسفراز (E2)

آنالیز شبکه ژنی

با استفاده از سایت string (<https://org.db-string>) شبکه‌ی ژنی ترسیم گردید، سپس ژن‌های به دست آمده از سایت string که برای به تصویر درآوردن شبکه‌های برهمکنش پروتئینی، مسیرهای بیولوژیکی و ادغام این شبکه‌ها با انوتیشن‌ها و سایر اطلاعات زیستی است، در دو شبکه ترسیم شده از دو ماژول نشان داد که در شبکه ترسیم شده برای ماژول (گروه‌های ژنی) خاکستری شامل دو ژن پروتئین حاوی دامنه هیدرولاز شبه هالواسید دهالوژناز ۳ (PGSC0003DMT400018901) و پروتئین خاص گرده مانند sf21، پروتئین خانواده Ndr (PGSC0003DMT400008412) است (شکل ۳).

نوکلئوتیدها علاوه بر این که واحدهای اولیه ماده ژنتیکی هستند، در فرآیندهای انرژی زیستی به عنوان کوفاکتورها نقش دارند و همچنین اجزای متابولیت‌های ثانویه و هورمون سیتوکینین هستند. در مطالعه‌ای که بر روی لوبیای معمولی انجام شد مشاهده گردید که پپتید پیش‌بینی شده شامل حوزه‌های حفاظت شده برای ابرخانواده هیدرولاز دی‌هالوژناز مانند هالواسید است. این پروتئین در اشرشیاکلی بیش از حد بیان شده است، و پروتئین خالص شده

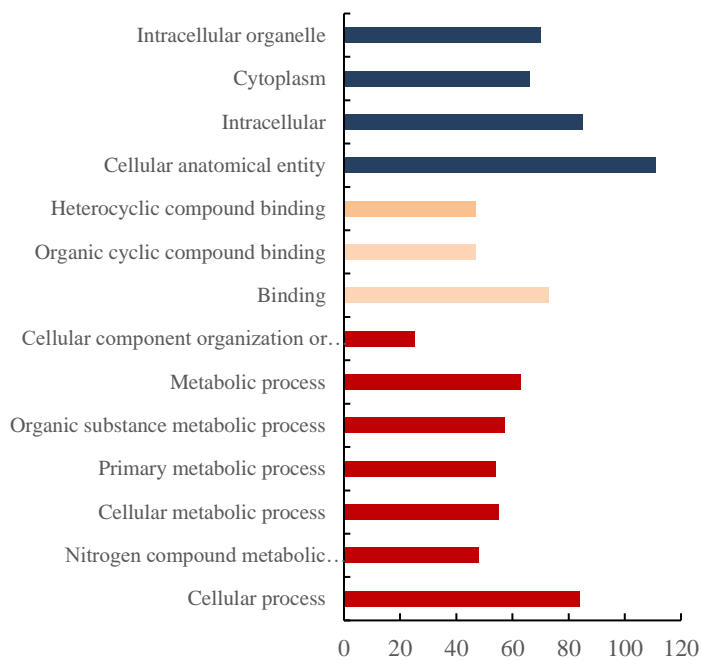
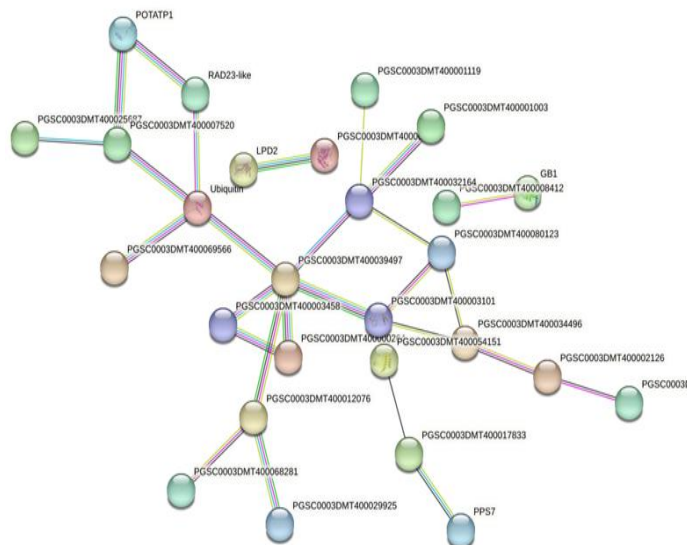
بررسی صفات مورفولوژی ریشه و ساقه

براساس آنالیز تجزیه واریانس از میان هشت صفت اندازه‌گیری شده ۷ صفت شامل طول ریشه، طول ساقه، وزن خشک ساقه، وزن تر ساقه، وزن خشک ریشه، وزن تر ریشه و قطر ساقه تحت تنش‌های PVY، PVX و PVY معنی‌دار شدند. براساس این نتایج، وزن تر و خشک ساقه تحت تنش‌های PVX/PVY، PVY، PVX) داشتند. تحت برهم‌کنش هر دو تنش PVY و PVX، وزن تر و خشک ریشه، طول ساقه و قطر ساقه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد را در مقایسه با سه تنش دیگر ایجاد نمود. طول ریشه تحت تنش PVX، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با سایر تنش‌ها داشت (جدول ۱، شکل ۴). هم‌چنین قطر ساقه تحت تنش نامادی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با دو تنش دیگر PVY و PVX داشت. دو فرضیه برای مکانیسم‌های فیزیولوژیکی زیربنایی اثر ناماد مطرح شده است. Trudgill (1980) و Trudgill *et al.* (1975) و Trudgill & Cotes (1983) پیشنهاد کردند که نامادها اندازه و کارایی سیستم ریشه را کاهش می‌دهند و در نتیجه منجر به کمبود مزمن مواد مغذی و پیری زودرس محصول می‌شوند. از سوی دیگر، Schans & Arntzen (1991) اظهار داشتند که نامادها در درجه اول بر تعادل هورمونی گیاه تأثیر می‌گذارند و منجر به بسته شدن روزنه و اختلال در فتوسنتز گیاه می‌شوند. بر اساس فرضیه اخیر، اختلال در متابولیسم کربن، و نه متابولیسم مواد مغذی، رشد محصول را مختل می‌کند. فرضیه Schans (1991) تاکنون در این زمینه آزمایش نشده است، در حالی که Trudgill (1980) شواهد کاهش شدیدتر غلظت عناصر غذایی گیاهی توسط نامادها را در آزمایش‌های گلدانی نسبت به مزرعه را گزارش نمود. کاهش عملکرد ممکن است بیش‌تر با اثرات نامادها بر فتوسنتز همراه باشد. سی روز پس از کاشت چهار رقم سیب‌زمینی در گلدان‌های خاکی با ۱۰۰ تخم *G. pallida*، میزان فتوسنتز در واحد سطح برگ ۷۰ درصد کم‌تر از کنترل‌های بدون آلودگی بود (Schans & Arntzen, 1991). براساس مطالعه دیگر، کاهش زیست توده ریشه، جذب بهینه آب و مواد مغذی را که برای عملکرد کافی سیب زمینی لازم است، محدود می‌کند. بنابراین، کاهش عملکرد یافت شده مطالعه حاضر به احتمال زیاد به کاهش مشاهده‌شده زیست توده ریشه در حضور نامادها، صرف‌نظر از زمان تلقیح بستگی دارد (Edin *et al.*, 2019).

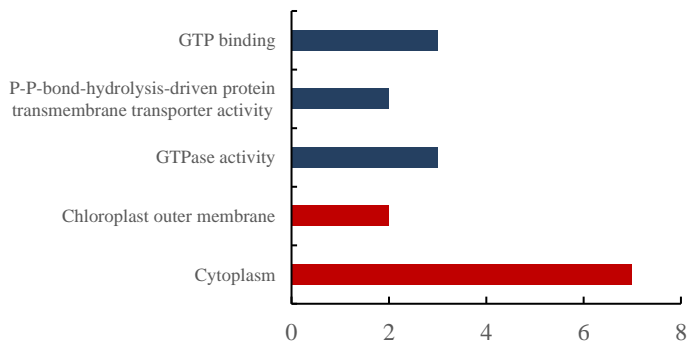
و لیپوآمید دهیدروژناز (E3). هم‌چنین پروتئین خاص گرده مانند sf21، پروتئین خانواده Ndr، فاکتور شروع ترجمه فرضی شبیه eIF-1A، پروتئین مانند کونژوگه یوبیکوئیتین، S۲۶ پروتئازوم تنظیمی زیرواحد B۶ همولوگ، فاکتور شروع رونویسی tftiid زیرواحد ۱۲b-like، RNA سی‌تیدین استیل ترانسفراز، سرین/ترئونین-پروتئین کیناز rio1-like و کازئین کیناز؛ متعلق به ابرخانواده پروتئین کیناز است. دانش سطح سیستم از تغییرات در میزبان برای روشن کردن رویدادهای مولکولی پاتوژن و ویروسی و توسعه استراتژی‌هایی برای جلوگیری از استقرار و تقویت ویروس بسیار مهم است. در مطالعه مذکور، از رویکرد پروتئومیکس کمی برای مطالعه تغییرات پروتئوم جهانی در میزبان استفاده شد. آلودگی توسط باکولوویروس، *Spodoptera litura* NPV در دو مرحله یعنی ۱۲ ساعت و ۷۲ ساعت پس از آلودگی تجزیه و تحلیل عملکردی نشان داد. تنظیم دخیل قابل توجهی از جابجایی و ماشین‌آلات پروتئازومی در حالی که مسیرهای ترجمه، رونویسی، صادرات پروتئین و فسفوریلاسیون اکسیداتیو تحت تأثیر منفی قرار گرفتند (Nayyar *et al.*, 2017, Saidi *et al.*, 2020, Saidi and Hajibarat, 2021b).

آنتولوژی ژن‌ها

برای کشف مکانیسم دفاعی بالقوه در ژن‌ها با بیان افتراقی، تحلیل مسیر آنتولوژی برای دو ماژول استفاده شد. اصطلاحات آنتولوژی به سه گروه تقسیم شدند: فرآیند بیولوژیکی (BP)، جزء سلولی (CC) و عملکرد مولکولی (MF). شکل ۳ نتایج تجزیه و تحلیل GO مرتبط با دو ماژول مربوط به مقاومت PVY، PVX و ناماد را نشان می‌دهد. در ماژول آبی، فرآیندهای بیولوژیکی به طور قابل توجهی غنی شده برای رونوشت‌های تنظیم شده بالا شامل پاسخ به محرک‌ها، تنظیم فرآیند بیولوژیکی، متابولیسم اولیه، فرآیندهای سلولی، فرآیندهای نیتروژن است. مهم‌ترین اجزای سلولی برای رونوشت‌های تنظیم شده سیتوپلاسم، اندامک درون سلولی، درون سلول بود. عملکرد مولکولی غنی شده به طور قابل توجهی برای رونوشت‌های تنظیم شده، اتصال ترکیب حلقوی آلی، اتصال ترکیب حلقوی هتروارگانیک بود. در ماژول خاکستری، مهم‌ترین اجزای سلولی برای رونوشت‌های تنظیم شده سیتوپلاسم، غشا خارج سلولی بود. عملکرد سلولی شامل اتصال GTP، اتصال GTPase و فعالیت ناقل گذرنده پروتئین مبتنی بر هیدرولیز پیوند P-P است (شکل ۳).



megray



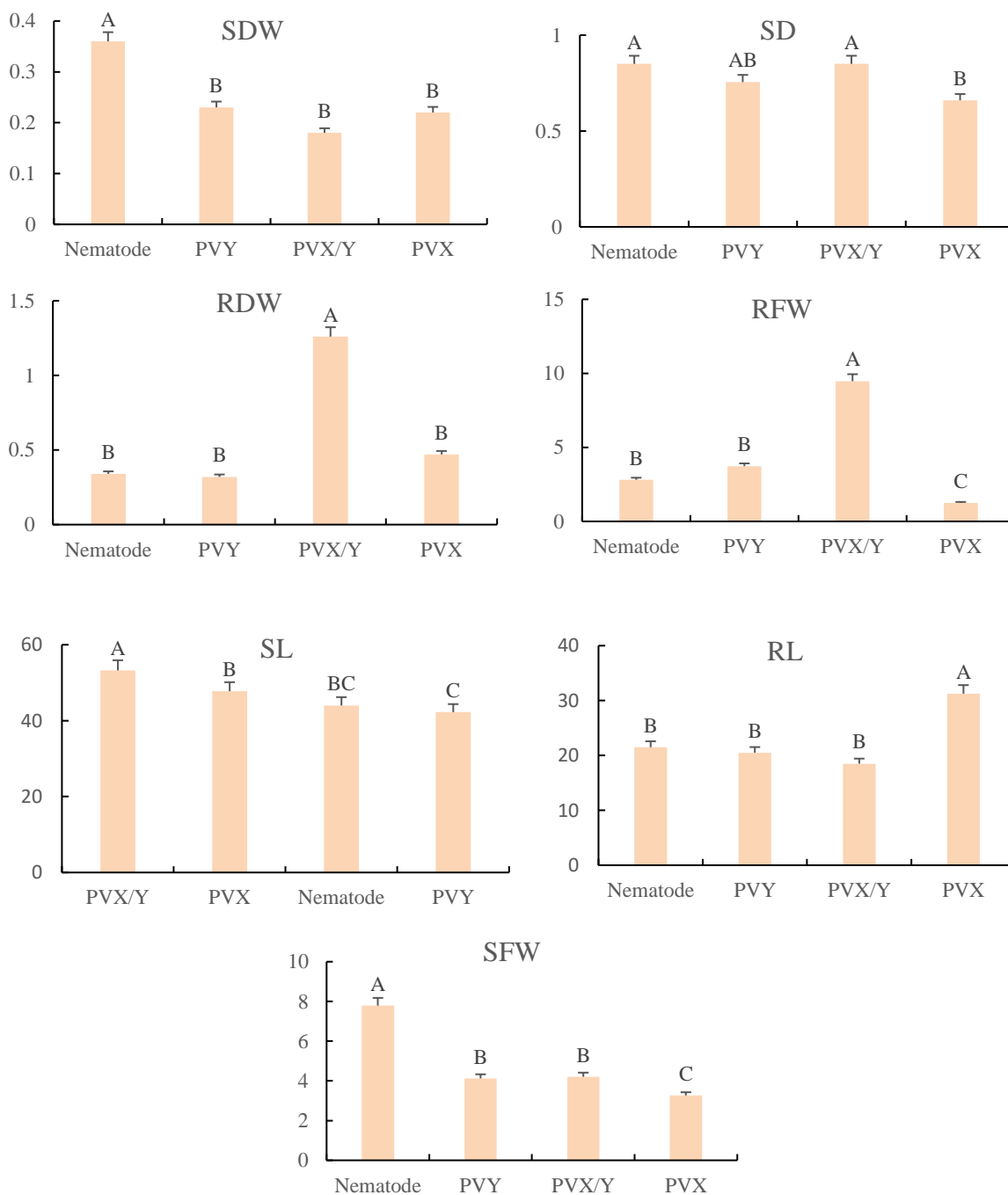
شکل ۳. حاشیه نویسی عملکردی (GO) ماژول خاکستری و ماژول آبی.

جدول ۱. تجزیه واریانس بین تیمارهای مختلف تحت شرایط ویروس و نماتد.

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ساقه	قطر ساقه	طول ساقه	طول ریشه	وزن خشک ریشه	وزن خشک ساقه	وزن تر ساقه	وزن تر ریشه
تیمار	۳	0.25ns	0.074**	213.1**	290.39**	1.7909**	0.056**	**۳۶.۰۷	124.861**
خطا	۸	2.0	0.024	30.37	12.63	0.14	0.017	0.49	1.040
کل	۱۱	2.25	0.099	303.02	303.02	1.93	0.073	36.57	125.9

ns, **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و عدم معنی‌دار.

meblue



شکل ۴. بررسی صفات مورفولوژی تحت چهار تنش، PVX، PVY، برهم‌کنش PVX/PVY و نماتد در سیب‌زمینی.

علائم اختصاری شامل SDW، RDW و RFW، SD، SL، RL، SFW، به ترتیب قطر ساقه، طول ساقه، طول ریشه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه، وزن تر ساقه، وزن خشک ریشه.

بوده و تحت چهار تنش میزان کلروفیل کل کاهش پیدا کرده است. درحالی‌که میزان کارتنوئید در شرایط نرمال بسیار پایین می‌باشد و تحت تنش ویروس X و Y بعد از هفت روز بالاترین میزان را به خود اختصاص داده است. میزان کلروفیل a بین نمونه نرمال و تنش‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد. میزان کلروفیل b در نمونه نرمال میزان پایینی داشته است. میزان کلروفیل تحت تنش ویروس X و Y بعد از هفت روز بالاترین مقدار را داشت. این میزان بعد از ۱۴ روز در هر دو تنش کاهش معنی‌داری را نشان داد. تحت تنش هم‌زمان دو ویروس میزان کلروفیل بعد از هفت روز تغییر معنی‌داری را نشان نداد اما بعد از ۱۴ روز میزان کلروفیل بالاتر رفت (جدول ۲).

جدول ۲. بررسی میزان تغییرات کلروفیل و کارتنوئید تحت تنش

ویروس X، Y، X/Y و نماد.

کلروفیل b	کارتنوئید	کلروفیل کل	تیمار
7.137e	10.65d	45a	نرمال
17.74a	2689.20a	31.06b	تنش ویروس X بعد از ۷ روز
12.19cd	2044.55b	23.69b	تنش ویروس X بعد از ۱۴ روز
17.41ab	2666.96a	31.48b	تنش ویروس Y بعد از ۷ روز
8.41de	1473.97c	17.06b	تنش ویروس Y بعد از ۱۴ روز
12.19cd	2045.49b	24.135b	تنش نماد بعد از ۷ روز
7.09e	1510.91c	17.55b	تنش نماد بعد از ۱۴ روز
7.17e	1395.46c	16.29b	تنش ویروس X/Y بعد از ۷ روز
13.83bc	2158.46b	25.34b	تنش ویروس X/Y بعد از ۱۴ روز

شناسایی ژن‌های هاب

شش ژن هاب که در دو ماژول شناسایی شدند شامل استرازاها، پروتئین LRR^۱، پروتئین STY، پروتئین ترنسپورتر ویکول شبکه آندوپلاسمی، زیرواحد بتا فاکتور ۲ شروع ترجمه یوکاریوتی (-eIF-2-beta) و کمپلکس هیستون داستیلاز می‌باشند (جدول ۳). پروتئین LRR به عنوان اولین خط دفاعی، پاسخ ایمنی ذاتی از طریق سنجش الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMPs) آغاز می‌شود. در گیاهان، پروتئین‌های NBS (محل اتصال به نوکلئوتید)-LRR شناسایی محصولات پاتوژن ژن‌های بی‌ثباتی (AVR) را فراهم می‌کنند. LRRها هم‌چنین در holcal برهمکنش بین پروتئین‌های مختلف با عملکردهای متنوع در گیاه، انسان، مخمر فعالیت می‌کنند (Torii, 2004).

آلودگی مخلوط با هر دو ویروس (PVM + PVS) وزن غده در هر بوته را ۳۱ درصد و وزن غده متوسط را تا ۶۴ درصد در مقایسه با گیاهان فقط آلوده به PVM کاهش داد. در کلون‌های R1 به‌دست‌آمده از میکروغده‌ها، آلودگی مخلوط منجر به کاهش قابل توجه تعداد غده در هر بوته (۵۹ درصد) و هم‌چنین وزن کم‌تر غده در هر بوته (۴۴ درصد) شد. تفاوت حتی بیش‌تر در کلون‌های R1 تولید شده از غده‌های کوچک مشاهده شد، که در آن کاهش وزن غده در هر بوته در گیاهان با آلودگی مخلوط در مقایسه با گیاهان آلوده به PVM به تنهایی ۸۶ درصد بود. تطابق نتایج به‌دست‌آمده با مطالعات قبلی نشان می‌دهد که آلودگی مختلط با دو ویروس منجر به کاهش عملکرد بسیار بیش‌تر از آلودگی منفرد می‌شود. مطالعه دیگر نشان داد که آلودگی هم‌زمان PVA، PVX و PVS باعث از دست دادن عملکرد تا ۴۰٪ در سیب زمینی می‌شود (Hameed et al., 2014). در توتون و تنباکو، آلودگی چندتایی با PVY و PVX به طور قابل ملاحظه‌ای با افزایش بیماری‌زایی مرتبط بود (Balogun et al., 2002). استفاده از ارقام مقاوم در برابر ویروس موثرترین و بادوام‌ترین مقاومت برای به حداقل رساندن کاهش عملکرد مرتبط با ویروس‌ها تلقی می‌شود. در برنامه‌های تلاقی، اصلاحگران از ژنوتیپ‌هایی استفاده می‌کنند که مقاومت در برابر چندین عامل ویروس را داشته باشند. براساس پژوهش دیگر آلودگی هم‌زمان PVY و PLRV باعث کاهش عملکرد شدید از نظر کاهش اندازه غده و کیفیت نامطلوب سیب‌زمینی نسبت به آلودگی منفرد PVY یا PLRV در چین شده است (Wang et al., 2011). تلاش اصلاحگران، توسعه و ایجاد ارقامی است که دارای هر دو آل مقاومت به PVY و PVX باشند. انتقال این نوع مقاومت در ارقام در برابر ویروس، منجر به مقاومت قابل توجهی در آن‌ها می‌شود (Pourrahim & Farzadfar, 2007). پژوهش‌های قبلی نشان داد که ویروس‌های سیب‌زمینی اغلب در آلودگی‌های هم‌زمان چند ویروس ایجاد می‌شوند و همیشه از نظر دید قابل تشخیص نیستند. استفاده از ارقام مقاوم در برابر ویروس موثرترین و بادوام‌ترین مقاومت برای به حداقل رساندن کاهش عملکرد مرتبط با ویروس‌ها تلقی می‌شود. اصلاحگران از ژنوتیپ‌هایی برای تلاقی استفاده می‌کنند که مقاومت در برابر چندین عامل ویروس را داشته‌باشند.

بررسی تغییرات میزان کلروفیل تحت تنش‌های مختلف

در سیب‌زمینی

میزان کلروفیل در شرایط نرمال نسبت به سایر تنش‌ها بیش‌تر

(Horvath, 2008). در سیب زمینی، قرار گرفتن در معرض تنش‌های ویروسی مخصوصاً PVY و PVX نشان‌دهنده یک استرس زنده است که می‌تواند به‌طور قابل توجهی بر رشد، عملکرد، کیفیت و اقتصاد محصول تأثیر بگذارد. در حالی که مخزن ژنی کشت شده برای سیب‌زمینی فاقد تنوع زیادی برای مقاومت به PVY است. در نتیجه شناسایی ارقام یا گونه‌های وحشی دارای ژن مقاومت به PVY برای اصلاح‌گران بسیار ارزشمند است. این امر باعث می‌شود که از روش‌های جدید و مکمل برای بررسی ارقام به این صفت انجام شود. مطالعه قبلی نشان داد که حمله پاتوژن می‌تواند به بافت‌های گیاه آسیب برساند. این ممکن است منجر به آزاد شدن کلروفیل از تیلوکوئید شود. کلروفیل‌ها باید به سرعت تجزیه شوند تا از آسیب سلولی توسط عملکرد فتودینامیک آن‌ها جلوگیری شود (Takamiya et al., 2000). به‌طوری که شکست در تخریب کلروفیل می‌تواند میزان ROS تولید شده را افزایش دهد. در نهایت، مولکول‌های سمی تشکیل شده ممکن است منجر به آسیب اندامک و مرگ سلولی شود. رابطه تجزیه کلروفیل، وقوع پیری برگ، و پاسخ به تنش به‌طور گسترده در گیاهان گزارش شده است. با این حال، فعالیت هیدرولیتیک آنزیم کلروپلاستیکی کلروفیل‌لاز معمولاً در مسیرهای تخریب کلروفیل شناخته شده است. ارتباط آن با سایر مسیرهای تجزیه کلروفیل مشخص نیست (Chairat et al., 2013; Moshe et al., 2012). مطالعه قبلی گزارش کرده است که کاهش کلروفیل‌ها در برگ‌های پیر شده با فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز در لوبیا و آرابیدوپسیس ارتباطی ندارد (Schenk & Horowitz, 2007). بررسی دیگری نشان داد که کلروفیل‌لاز با سطوح کلروفیل پایین‌تر در برگ‌های در حال پیری مطابقت دارد (Trebitch et al., 1993). این استدلال نشان داد که کاتابولیسم کلروفیل هنوز یک فرآیند مبهم در گیاهان است. برخی مطالعات نشان می‌دهد که تغییر کلروفیل در ارقام متحمل بیش‌تر از ارقام حساس می‌باشد (Gorovits & Czosnek, 2008).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مبتنی بر نتایج مطالعه حاضر، اثر تنش‌های PVY، PVX و نماد بر صفات طول ریشه، طول ساقه، وزن خشک ساقه، وزن تر ساقه و وزن تر ریشه معنی‌دار شدند. در برهم‌کنش هر دو تنش PVY و PVX، وزن تر ریشه اختلاف معنی‌دار به میزان ۸۰ درصد در مقایسه با میزان تنش PVX ایجاد کرده است. طول ریشه تحت تنش PVX، اختلاف معنی‌داری با سایر

خانواده Ser/Thr/Tyr کیناز به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار نگرفته است، اما شواهد نشان می‌دهد که برخی ایزوفرم‌ها می‌توانند پاسخ گرسنگی قدر را تنظیم کنند (Arias et al., 2014). اعضای خانواده کیناز STY کینازهایی با ویژگی دوگانه هستند که دارای دامنه‌های کاتالیزوری Ser/Thr و Tyr هستند و برخی از فرآیندهای متابولیک و رشد گیاه را از طریق فسفوریلاسیون پروتئین‌های هدف تنظیم می‌کنند (Rudrabhatla et al., 2006). به عنوان مثال، به نظر می‌رسد پروتئین کینازهای STY نقش مهمی در انتقال آمونیم در ریشه‌های نهال برنج (Beier et al., 2018)، در تجمع روغن ذخیره در سیلیکس‌های آرابیدوپسیس (Ramachandiran et al., 2018) و در پاسخ به استرس و رشد بذر در خیار و بادام زمینی دارند. از ژن دیگر درگیر در شبکه شامل eIF2B β یک کلاس جدید از ژن مقاومت به ویروس را نشان می‌دهد که به هر بیماری‌زایی مقاومت ایجاد می‌کند. ژن eIF2B به عنوان یک فاکتور تبادل نوکلئوتیدی گوانین (GEF) برای eIF2 شریک پروتئین متصل به GTP از طریق برهم‌کنش با GTP x eIF2 در مرحله اولیه شروع ترجمه عمل می‌کند. از جمله ژن دیگر درگیر در شبکه همبسته می‌توان به هیستون داستیل‌لاز اشاره نمود. هیستون داستیل‌لازها گروه‌های استیل را از پروتئین‌های هیستون حذف می‌کنند و نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای ژنومی ایفا می‌کنند. HDA9 به ۹۲ ژن متصل می‌شود و مستقیماً آنها را سرکوب می‌کند، که بسیاری از آنها به محرک‌های زنده و غیرزنده، از جمله خانواده‌ای از ژن‌های فاکتور پاسخ اتیلن، پاسخ‌گو هستند.

جدول ۳. لیست ژن‌های هاب موجود در دو ماژول آبی و خاکستری تحت

تنش ویروس و نماد در سیب‌زمینی

شماره	نام ژن	عملکرد
۱	BQ506236	هیستون داستیل‌لاز
۲	BQ518797	پروتئین ترنسپورتر وزیکول شبکه آندوپلاسمی
۳	BQ505556	زیرواحد بتا فاکتور ۲ شروع ترجمه یوکاریوتی
۴	BQ115588	پروتئین STY-L
۵	BQ115083	پروتئین LRR
۶	BQ516294	وابسته به استراز دارای شباهت به استراز است.

در روش شبکه‌های هم‌بیان وزن‌دار، هر ماژول هم‌بیان می‌تواند بازتاب‌دهنده یک پیام زیستی حقیقی باشد. برای بررسی معنی‌داری یک ماژول از نظر زیستی از تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی ژن (GO) می‌توان استفاده کرد (Langfelder &

کاهش رشد کلی و در نتیجه کوتاه شدن گیاهان، ساقه‌های باریک و کاهش زیست توده می‌شود. تحت چهار تنش میزان کارتنوئید نسبت به نرمال افزایش یافته است. براساس یافته‌های موجود می‌توان رقم آگریا را به عنوان رقم نیمه متحمل به چهار تنش معرفی نمود.

تنش‌ها داشت. هم‌چنین طول ساقه تحت تنش PVX و PVX/PVY اختلاف معنی‌داری با دو تنش دیگر PVY و نماتد داشت. از آن جایی که میزان کلروفیل ارتباط مستقیمی با فعالیت‌های فتوسنتزی دارد که انرژی لازم برای رشد و دفاع در برابر تنش‌ها را فراهم می‌کند، کاهش این پارامترها باعث

References

- Arias, M. C., Pelletier, S., Hilliou, F., Wattebled, F., Renou, J. P., & D'hulst, C. (2014). From dusk till dawn: the *Arabidopsis thaliana* sugar starving responsive network. *Frontiers in plant science*, 5, 482.
- Balogun, O. S., Xu, L., Teraoka, T., & Hosokawa, D. (2002). Effects of single and double infections with Potato virus X and Tobacco mosaic virus on disease development, plant growth, and virus accumulation in tomato. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 241-248.
- Bassel, G.W., Lan, H., Glaab, E., Gibbs, D.J., Gerjets, T., Krasnogor, N., Bonner, A.J., Holdsworth, M.J. and Provart, N.J. (2011). Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9709-9714.
- Beier, M.P., Obara, M., Taniai, A., Sawa, Y., Ishizawa, J., Yoshida, H., Tomita, N., Yamanaka, T., Ishizuka, Y., Kudo, S. & Yoshinari, A., (2018). Lack of ACTPK 1, an STY kinase, enhances ammonium uptake and use, and promotes growth of rice seedlings under sufficient external ammonium. *The Plant Journal*, 93(6), 992-1006.
- Bergmann, D. C., Lukowitz, W., & Somerville, C. R. (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science*, 304(5676), 1494-1497.
- Birch, P.R., Bryan, G., Fenton, B., Gilroy, E.M., Hein, I., Jones, J.T., Prashar, A., Taylor, M.A., Torrance, L. & Toth, I.K. (2012). Crops that feed the world 8: potato: are the trends of increased global production sustainable?. *Food Security*, 4, 477-508.
- Chairat, K., Tarning, J., White, N. J., & Lindegardh, N. (2013). Pharmacokinetic Properties of Anti-Influenza Neuraminidase Inhibitors. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 53(2), 119-139.
- Devaux, A., Goffart, J.P., Petsakos, A., Kromann, P., Gatto, M., Okello, J., Suarez, V. & Hareau, G., (2020). Global food security, contributions from sustainable potato agri-food systems. The potato crop: Its agricultural, nutritional and social contribution to humankind, 3-35.
- Edin, E., Gulsher, M., Andersson Franko, M., Englund, J. E., Flöhr, A., Kardell, J., & Viketoft, M. (2019). Temporal Interactions between root-lesion nematodes and the fungus *Rhizoctonia solani* lead to reduced potato yield. *Agronomy*, 9(7), 361.
- Galvez-Valdivieso, G., Delgado-Garcia, E., Diaz-Baena, M., Montaña, O., Quiles, F. A., Pineda, M., & Piedras, P. (2020). Biochemical and molecular characterization of PvNTD2, a nucleotidase highly expressed in nodules from *Phaseolus vulgaris*. *Plants*, 9(2), 171.
- Gorovits, R., & Czosnek, H. (2008). Expression of stress gene networks in tomato lines susceptible and resistant to Tomato yellow leaf curl virus in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 482-492.
- Hameed, A., Iqbal, Z., Asad, S., & Mansoor, S. (2014). Detection of multiple potato viruses in the field suggests synergistic interactions among potato viruses in Pakistan. *The plant pathology journal*, 30(4), 407.
- Hajibarat, Z., & Saidi, A. (2023). Filamentation Temperature-Sensitive (FtsH); Key Player in Response to Multiple Environmental Stress Conditions and Developmental Stages in Potato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(7), 4223-4239.
- Hajibarat, Z., Saidi, A., & Hajibarat, Z. (2022). Genome-wide identification of 14-3-3 gene family and characterization of their expression in developmental stages of *Solanum tuberosum* under multiple biotic and abiotic stress conditions. *Functional & Integrative Genomics*, 22(6), 1377-1390.
- Hosseini, M. B., Afshari, R. T., & Salimi, K. (2011). Breaking dormancy of potato minitubers with thiourea. *Potato Journal*, 38(1), 9-12.
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics*, 9(1), 1-13.

- Li, Z., Wang, J., & Wang, J. (2023). Identification of a Comprehensive Gene Co-Expression Network Associated with Autotetraploid Potato (*Solanum tuberosum* L.) Development Using WGCNA Analysis. *Genes*, 14(6), 1162.
- Moschen, S., Marino, J., Nicosia, S., Higgins, J., Alseekh, S., Astigueta, F., ... & Heinz, R. A. (2019). Exploring gene networks in two sunflower lines with contrasting leaf senescence phenotype using a system biology approach. *BMC plant biology*, 19(1), 1-15.
- Moshe, A., Pfannstiel, J., Brotman, Y., Kolot, M., Sobol, I., Czosnek, H., & Gorovits, R. (2012). Stress responses to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) infection of resistant and susceptible tomato plants are different. *Metabolomics* 11, 6(10.4172), 2153-0769.
- Nayyar, N., Kaur, I., Malhotra, P., & Bhatnagar, R. K. (2017). Quantitative proteomics of Sf 21 cells during Baculovirus infection reveals progressive host proteome changes and its regulation by viral miRNA. *Scientific reports*, 7(1), 10902.
- Omranian, N., Kleessen, S., Tohge, T., Klie, S., Basler, G., Mueller-Roeber, B., Fernie, A.R. and Nikoloski, Z. (2015). Differential metabolic and coexpression networks of plant metabolism. *Trends in plant science*, 20(5), 266-268.
- Peng, J., Wang, P., Fang, H., Zheng, J., Zhong, C., Yang, Y., & Yu, W. (2021). Weighted gene co-expression analysis network-based analysis on the candidate pathways and hub genes in eggplant bacterial wilt-resistance: a plant research study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13279.
- Pourrahim, R., Farzadfar, S., Golnaraghi, A. R., & Ahoonmanesh, A. (2007). Incidence and distribution of important viral pathogens in some Iranian potato fields. *Plant Disease*, 91(5), 609-615.
- Qin, T. Y., Sun, C., Bi, Z. Z., Liang, W. J., Li, P. C., Zhang, J. L., & Bai, J. P. (2020). Identification of drought-related co-expression modules and hub genes in potato roots based on WGCNA. *Acta Agron. Sin.*, 46(7), 19.
- Ramachandiran, I., Vijayakumar, A., Ramya, V., & Rajasekharan, R. (2018). Arabidopsis serine/threonine/tyrosine protein kinase phosphorylates oil body proteins that regulate oil content in the seeds. *Scientific Reports*, 8(1), 1154.
- Rudrabhatla, P., Reddy, M. M., & Rajasekharan, R. (2006). Genome-wide analysis and experimentation of plant serine/threonine/tyrosine-specific protein kinases. *Plant molecular biology*, 60, 293-319.
- Saidi, A., Hajibarat, Z., & Hajibarat, Z. (2020). Identification of responsive genes and analysis of genes with bacterial-inducible cis-regulatory elements in the promoter regions in *Oryza sativa* L. *Acta agriculturae Slovenica*, 116(1), 115-123.
- Saidi, A., & Hajibarat, Z. (2021a). Genome wide identification of StKNOX gene family and characterization of their expression in *Solanum tuberosum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 37, 102160.
- Saidi, A., & Hajibarat, Z. (2021b). Approaches for developing molecular markers associated with virus resistances in potato (*Solanum tuberosum*). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128, 649-662.
- Schaefer, A.M., Reif, J.S., Guzmán, E.A., Bossart, G.D., Ottuso, P., Snyder, J., Medalie, N., Rosato, R., Han, S., Fair, P.A. and McCarthy, P.J. (2016). Toward the identification, characterization and experimental culture of *Lacazia loboi* from Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Sabouraudia*, 54(6), 659-665.
- Schaefer, R. J., Briskine, R., Springer, N. M., & Myers, C. L. (2014). Discovering functional modules across diverse maize transcriptomes using COB, the co-expression browser. *PLoS one*, 9(6), e99193.
- Schans, J., & Arntzen, F. K. (1991). Photosynthesis, transpiration and plant growth characters of different potato cultivars at various densities of *Globodera pallida*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 97, 297-310.
- Schans, J. (1991). Reduction of leaf photosynthesis and transpiration rates of potato plants by second-stage juveniles of *Globodera pallida*. *Plant, Cell & Environment*, 14(7), 707-712.
- Schenk, S., & Horowitz, J. F. (2007). Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 117(6), 1690-1698.
- Schulte-Geldermann, E., Gildemacher, P. R., & Struik, P. C. (2012). Improving seed health and seed performance by positive selection in three Kenyan potato varieties. *American Journal of Potato Research*, 89, 429-437.
- Serin, E. A., Nijveen, H., Hilhorst, H. W., & Ligterink, W. (2016). Learning from co-expression networks: possibilities and challenges. *Frontiers in plant science*, 7, 444.
- Seo, P.J., Park, J.M., Kang, S.K., Kim, S.G., & Park, C.M. (2011). An arabidopsis senescence-associated protein sag29 regulates cell viability under high salinity. *Planta*, 233, 189-200.

- Takamiya, K., Akamine, M., Shibata, S., Toyoshima, A., Kasamatsu, Y., & Shinohara, A. (2000). Preparation of multitracer by thermal neutron fission of ^{235}U . *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences*, *1*(2), 81-82.
- Tan, J. W., Shinde, H., Tesfamichael, K., Hu, Y., Fruzangohar, M., Tricker, P., ... & Rodríguez López, C. M. (2023). Global transcriptome and gene co-expression network analyses reveal regulatory and non-additive effects of drought and heat stress in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1096225.
- Torii, K. U. (2004). Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol*, *234*, 1-46.
- Trebitsh, T., Goldschmidt, E. E., & Riov, J. O. S. E. P. H. (1993). Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in Citrus fruit peel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(20), 9441-9445.
- Trudgill, D. L., & Cotes, L. M. (1983). Differences in the tolerance of potato cultivars to potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *G. pallida*) in field trials with and without nematicides. *Annals of Applied Biology*, *102*(2), 373-384.
- Trudgill, D. L., Parrott, D. M., Evans, K., & Widdowson, F. V. (1975). Effects of potato cyst nematodes on potato plants. 4. Effects of fertilizers and *heterodera-rostochiensis* on yield of 2 susceptible varieties. *Nematologica*, *21*(3), 281-286.
- Trudgill, D. L. (1980). Effects of *Globodera rostochiensis* and fertilisers on the mineral nutrient content and yield of potato plants. *Nematologica*, *26*(2), 243-254.
- Wang, B., Ma, Y., Zhang, Z., Wu, Z., Wu, Y., Wang, Q. & Li, M., (2011). Potato viruses in China. *Crop Protection*, *30*(9), 1117-1123.
- Wolf, S., Hématy, K., & Höfte, H., (2012). Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual review of plant biology*, *63*, 381-407.
- Yan, L., Lai, X., Wu, Y., Tan, X., Wang, H. & Zhang, Y. (2018). Co-Expression Network-based Analysis associated with potato initial resistance. *bioRxiv*, 496075.
- Yin, X., Wang, X., & Komatsu, S. (2018). Phosphoproteomics: protein phosphorylation in regulation of seed germination and plant growth. *Current Protein and Peptide Science*, *19*(4), 401-412.
- Zhang, B., & Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, *4*(1).

ORIGINAL ARTICLE

Studying the relationship between traits obtained from callus induction in the mature embryo stage and agronomic traits of bread wheat in different moisture conditions

Fatemeh Bavandpouri^{1*}, Ezatollah Farshadfar¹, Kianoosh Chegami¹, Mohsen Farshadfar², Mohammad Reza Bihamta³

¹Department of Plant Production Engineering and Genetics, Faculty of Sciences and Agricultural Engineering, Razi University of Kermanshah, Iran.

²Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

³Department of Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Correspondence

Fatemeh Bavandpouri

Email: f.bavandpouri@yahoo.com

ABSTRACT

This study was aimed to investigate the reaction of wheat different genotypes to callus induction in the mature embryo stage and the relationship between the traits obtained from the tissue culture and the agronomic traits. A field experiment was conducted in the form of randomized complete block design with three replications under rainfed and irrigated conditions in Razi University. In the callus induction stage, mature embryos of 25 bread wheat genotypes from a factorial experiment in the form of a completely randomized basic design including two factors, genotype at 25 levels and 2, 4-D hormone at 3 levels of 1, 2 and 3 mg/L and kinetin 0.2 mg/L was used in six replications. Variance analysis in tissue culture conditions showed that there is a significant difference between genotypes in terms of all investigated traits except the percentage of relative water content of callus. Cluster analysis under laboratory and field conditions showed that genotypes No. 15 (WC-47638), 6 (WC-4840), 13 (WC-5001), 18 (WC-47569) and the Pishtaz cultivar were jointly superior in both conditions and they took the highest values of callus diameter, callus fresh weight, callus growth rate, grain yield, chaff yield, xteragen length, grain weight per spike, peduncle to height ratio, harvest index, seed filling period, vegetative growth rate and seed filling rate. Based on the path analysis in irrigation conditions, the traits of 1000 seed weight, number of seeds per spike, vegetative growth rate, length of other internodes, number of spikes per square meter, grain weight per spike and days to appearance of spike have the most direct effect on tissue culture traits. Also, according to the first canonical function for tissue culture traits (V1) and agronomic traits (W1) in rainfed conditions, plants with higher values of grain yield, larger callus diameter, and with a higher weight of 1000 seeds have a higher callus growth rate and in irrigation conditions, plants with high grain yield and grain weight per spike, callus growth speed is higher. Based on the obtained results, the investigated traits are suitable criteria for selecting cultivars in *in vivo* and *in vitro* conditions.

KEYWORDS

Canonical Correlation, Tissue Culture, Path Analysis, *Triticum aestivum* L.

How to cite

Bavandpouri, F., Farshadfar, E., Chegami, K., Farshadfar, M., & Bihamta, M. R. (2023). Studying the relationship between traits obtained from callus induction in the mature embryo stage and agronomic traits of bread wheat in different moisture conditions. *Crop Biotechnology*, 12(42), 17-35.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

مطالعه ارتباط صفات حاصل از القاء کالوس در جنین بالغ با صفات مزرعه‌ای گندم نان در شرایط متفاوت رطوبتی

فاطمه باوندپوری^{۱*}، عزت‌اله فرشادفر^۱، کیانوش چقامیرزا^۱، محسن فرشادفر^۲، محمدرضا بی‌همتا^۳

چکیده

واکنش ۲۵ ژنوتیپ گندم به القای کالوس در مرحله جنین بالغ و ارتباط صفات حاصل از کشت بافت با صفات زراعی بررسی شد. آزمایش مزرعه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار، در شرایط دیم و آبیاری در دانشگاه رازی اجرا شد. در مرحله القای کالوس جنین‌های بالغ ۲۵ ژنوتیپ گندم نان از یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی شامل دو فاکتور، ژنوتیپ در ۲۵ سطح و هورمون -4, 2, D در ۳ سطح ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و کینیتین ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر در شش تکرار استفاده شد. تجزیه واریانس در شرایط کشت بافت نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از نظر تمامی صفات بررسی شده به جز درصد محتوی آب نسبی کالوس اختلاف معنی‌داری وجود دارد. تجزیه خوشه‌ای در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای نشان داد که، ژنوتیپ‌های شماره ۱۵ (WC-47638)، ۶ (WC-4840)، ۱۳ (WC-5001)، ۱۸ (WC-47569) و رقم پیشتاز به طور مشترک در هر دو شرایط برتر بودند، که بالاترین مقادیر قطر کالوس، وزن تر کالوس، سرعت رشد کالوس، عملکرد دانه، عملکرد چف، طول اکسترژن، وزن دانه در سنبله، نسبت پدانکل به ارتفاع، شاخص برداشت، دوره پر شدن دانه، سرعت رشد رویشی و سرعت پر شدن دانه را به خود اختصاص دادند. بر اساس تجزیه علیت در شرایط آبیاری، به ترتیب صفات وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله، سرعت رشد رویشی، طول سایر میانگره‌ها، تعداد سنبله در متر مربع، وزن دانه در سنبله و روز تا سنبله‌دهی بیشترین اثر مستقیم را بر صفات کشت بافت دارند. همچنین، بر طبق تابع کانونیک اول برای صفات کشت بافت (V₁) و صفات زراعی (W₁) در شرایط دیم، گیاهان با مقادیر بالاتر عملکرد دانه، قطر کالوس بیشتر و با وزن هزار دانه بالاتر سرعت رشد کالوس بالاتر و در شرایط آبیاری، گیاهان با عملکرد بالای دانه و وزن دانه در سنبله، سرعت رشد کالوس بیشتری دارند. براساس نتایج بدست آمده صفات بررسی شده معیارهای مناسبی برای گزینش ارقام در شرایط این ویوو و این ویترو هستند.

واژه‌های کلیدی

تجزیه مسیبر، کشت بافت، همبستگی کانونی، *Triticum aestivum* L.

^۱گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
^۲گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
^۳گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:

فاطمه باوندپوری

رایانامه: f.bavandpori@yahoo.com

استناد به این مقاله:

باوندپوری، فاطمه، فرشادفر، عزت‌اله، چقامیرزا، کیانوش، فرشادفر، محسن و بی‌همتا، محمدرضا (۱۴۰۲). مطالعه ارتباط صفات حاصل از القاء کالوس در جنین بالغ با صفات مزرعه‌ای گندم نان در شرایط متفاوت رطوبتی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۲)، ۱۷-۳۵.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) بخش قابل توجهی از کالری مورد نیاز رژیم غذایی، مواد معدنی و حدود ۲۰ درصد از پروتئین مورد نیاز برای انسان را فراهم می‌کند (Aparna et al., 2015). بر اساس برآوردهای فعلی، انتظار می‌رود که نیاز جهانی به محصول گندم تا سال ۲۰۵۰ تا ۵۰ درصد افزایش یابد تا جمعیت رو به رشد جهان تغذیه شود (Allen et al., 2017). اصلاح ژنتیکی گیاهان با استفاده از روش‌های نوین از قبیل کشت بافت‌های گیاهی می‌تواند سرعت به‌نژادی را زیاد کند (Farshadfar, 2018). زمینه‌ی ژنتیکی گیاه دهنده و محیط کشت اثر مؤثری در پاسخ به کشت درون شیشه‌ای دارند (Azizi Dargahlou et al., 2014). شرایط این‌ویتر و با فرض رابطه بین پاسخ سلولی و گیاه کامل در این شرایط می‌تواند به‌عنوان ابزاری جهت اصلاح و انتخاب گیاهان مورد استفاده قرار گیرد (Mohammadi et al., 2012). امروزه کشت جنین یکی از شاخه‌های کاملاً تثبیت شده‌ی کشت بافت است. جنین‌های بالغ در یک محیط نمکی پایه با یک منبع انرژی کربنی نظیر ساکارز، می‌توانند رشد نمایند (Farshadfar, 2018). متأسفانه ژنوتیپ‌های گیاهی با واکنش مطلوب به کشت بافت در مراحل اولیه پروژه‌های اصلاحی به دلیل شناخت اندک مکانیسم‌های مرتبط قابل شناسایی نیستند. همچنین ارزیابی تعداد زیاد ژنوتیپ‌ها از طریق کشت بافت بسیار زمان‌بر و پرهزینه می‌باشد. از این رو، انتخاب بر مبنای یک صفت زراعی که اندازه‌گیری آن ساده‌تر و در عین حال با صفات کشت بافتی نیز همبستگی داشته باشد، می‌تواند روشی مناسب برای پیشگویی نتایج کشت بافت باشد (Li et al., 2003; Haliloglu et al., 2005). استفاده از روش‌های آماری چند متغیره مانند تجزیه همبستگی کانونیک، تجزیه علیت و تجزیه خوشه‌ای برای درک عمیق‌تر روابط بین صفات مختلف ضروری به نظر می‌رسد. میزان ارتباط بین دو یا چند متغیر با ضریب همبستگی برآورد می‌شود. تجزیه همبستگی میزان ارتباط را اندازه‌گیری می‌کند اما اهمیت نسبی هر عامل را نشان نمی‌دهد. بنابراین، لازم است با استفاده از تجزیه ضریب مسیر، که یک روش آماری برای تجزیه ضریب همبستگی به اثرات مستقیم و غیر مستقیم می‌باشد، بررسی دقیق‌تری انجام داد (Suleiman et al., 2014). همچنین روش تجزیه همبستگی کانونیک به منظور درک روابط و ساختار اجزای عملکرد و صفات مختلف گیاهان زراعی به طور مؤثری استفاده می‌شود و

همبستگی موجود بین دو مجموعه صفت را شناسایی و کمی می‌کند (Raykov & Marcoulides, 2008). در گندم، تحقیقات کمتری با راهکار تجزیه همبستگی کانونیک و تجزیه علیت نسبت به دیگر گیاهان بین صفات کشت بافت با صفات زراعی صورت گرفته است. از این رو، هدف از این مطالعه انتخاب بهترین ژنوتیپ‌های گندم نان برای کالوس‌زایی با استفاده از جنین‌های بالغ و بررسی ارتباط بین صفات حاصل از کشت بافت با صفات مزرعه‌ای در شرایط دیم و آبیاری با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره مختلف و استفاده از این روابط در یافتن ارقام پرمحصول می‌باشد.

پیشینه پژوهش

در پژوهشی به مطالعه کالوس‌زایی و باززایی لاین‌های گندم نان و جو از ریزنمونه‌های جنین بالغ پرداخته شد و این نتیجه حاصل گردید که بهینه‌سازی کشت بافت در گندم برای فرآیند انتقال ژن یا کشت سوسپانسیون سلولی امری ضروری است (Gholami & Tarinejad, 2017a,b). در مطالعه‌ای به منظور بررسی واکنش جنین بالغ گندم دوروم به القاء کالوس و تنش شوری در شرایط آزمایشگاهی، نتایج تجزیه واریانس در مرحله القاء کالوس نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات درصد القاء کالوس، سرعت رشد کالوس و رشد نسبی کالوس اختلاف معنی‌داری وجود داشت و بالاترین درصد القاء کالوس در جنین‌های بالغ مربوط به ژنوتیپ‌های متفاوت بود، بنابراین درصد القاء کالوس وابسته به ژنوتیپ می‌باشد (Abbasi & Mohammadi, 2023). در مورد ارتباط بین کشت بافت و صفات زراعی گندم تنها چند گزارش وجود دارد. ارتباط متفاوت بین صفات زراعی و صفات کشت بافت به دلیل عوامل مختلفی از جمله محیط کشت، هورمون‌ها و ریزنمونه‌ها بود که از طریق تأثیر بر صفات کمی ارثی و فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف بر پاسخ به کشت بافت تأثیر می‌گذارد (Herrmann, 2007). در مطالعه‌ای ارتباط بین کشت بافت و صفات زراعی از طریق کشت جنین بالغ مورد بررسی قرار گرفت و این نتیجه حاصل شد که فراوانی باززایی از کالوس‌های به دست آمده از جنین بالغ را می‌توان از طریق دانه در هر سنبلچه و تعداد پنجه، تخمین زد که این صفات در مورد جنین نابالغ کمتر تأثیر می‌گذارند. همچنین ثابت شده است که هر چه اندازه جنین رسیده، بزرگ‌تر باشد، کالوس‌زایی و باززایی آن، بهتر خواهد بود (Li et al., 2003). در

روش‌شناسی پژوهش

آزمایش مزرعه‌ای

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل دو رقم پیش‌تاز و پیش‌گام و ۲۳ توده گندم نان پاییزه (جدول ۱) بود، که ژنوتیپ‌ها از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. آزمایش مزرعه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار، در سال زراعی (۹۶-۱۳۹۵) در دو شرایط دیم و آبیاری (شامل: سه مرتبه آبیاری با روش غرقابی به‌ترتیب در تاریخ ۲۵ اردیبهشت ۱۳۹۶ در مرحله ۵۰ درصد سنبله‌دهی، در تاریخ اوایل خرداد ماه بعد از مرحله سنبله‌دهی کامل و در تاریخ ۱۵ خرداد ماه در مرحله شیری شدن دانه‌ها انجام شد، اما تحت شرایط دیم در تمام طول دوره رشد هیچ‌گونه آبیاری انجام نشد) در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی اجرا شد. صفات اندازه‌گیری شده در مزرعه و نحوه اندازه‌گیری آن‌ها به شرح زیر ارائه می‌شود.

عملکرد دانه در متر مربع (Grain Yield, GY)، تعداد سنبله در متر مربع (Number of Spike Per m², NSP)، تعداد دانه در سنبله (Number of Seed Per Spike, NSPS)، وزن هزاردانه (Thousand Seed Weight, TSW)، شاخص برداشت (Harvest Index, HI)، عملکرد کاه (Straw Yield, SY)، عملکرد بیولوژیک منهای عملکرد سنبله، وزن هکتولیت (Hectoliter Weight, HW)، با وزن کردن بذرها داخل استوانه مدرج که حجم آن یک لیتر بود و بر حسب گرم در لیتر محاسبه شد. عملکرد چف (Chaff Yield, Chaff)، عملکرد سنبله منهای عملکرد دانه، وزن دانه در سنبله (Spike Grain Weight, SGW)، و وزن خشک ساقه (Stem Weight, StW)، تعداد سنبله‌چه در سنبله (Number of Spikelets per Spike, NSS)، طول اکستراژن (Xteragen Length, XL)، فاصله پایه سنبله تا یقه برگ پرچم بر حسب سانتی‌متر برای پنج بوته محاسبه شد. طول سایر میانگره‌ها (Other Inter nodes Length, OIL)، ارتفاع بوته منهای مجموع طول پدانکل، پنالته‌میت و سنبله، نسبت پدانکل به ارتفاع (Peduncle Length/ Plant Height, PL/PH)، تعداد روز تا سنبله‌دهی (Days to Appearance of Spike, DAS)، فاصله‌ی زمانی از کاشت (اولین آبیاری) که به عنوان تاریخ کاشت در نظر گرفته شد، تا ۵۰ درصد بوته‌ها به سنبله رفته باشند، محاسبه شد. دوره پر شدن دانه (Seed Filling Period, SFP)، فاصله‌ی زمانی بین

پژوهشی که ارتباط بین صفات کشت بافتی و صفات زراعی مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد درصد القاء کالوس با تعداد سنبله در متر مربع و تعداد دانه در سنبله و رطوبت کالوس با سرعت پر شدن دانه و عملکرد دانه رابطه داشت، اما صفات مرحله القاء کالوس با دیگر صفات زراعی ارتباط معنی‌داری نداشتند (Haliloglu *et al.*, 2005). در بررسی دیگری در مورد رابطه صفات زراعی و کشت بافت در گندم با استفاده از تجزیه همبستگی و ضریب مسیر، نتایج نشان داد که تمام صفات همبستگی معنی‌داری در حد متوسط داشتند و عملکرد دانه بالاترین اثر مستقیم مثبت را بر تشکیل کالوس داشت، در حالی که تعداد دانه در سنبله بیشترین اثر مستقیم مثبت را بر القاء کالوس‌های زایشی و تعداد گیاه تولید شده از جنین داشت (Dodig *et al.*, 2008). در آزمایشی القاء کالوس و باززایی کالوس‌های حاصل از جنین‌های نابالغ و بالغ جو (*Hordeum vulgare* L.) و ارتباط آن با صفات زراعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد روابط معنی‌داری بین تعدادی از خصوصیات کشت جنین و صفات زراعی وجود دارد که این ویژگی‌ها می‌توانند وابسته به ژنتیک باشند و همچنین می‌توان از ویژگی‌های کشت بافت برای داده‌های زراعی استفاده نمود (Nasari *et al.*, 2017a). در تحقیقی به منظور برآورد همبستگی و روابط بین صفات مختلف در ۳۰ ژنوتیپ گندم نان در دو شرایط بدون تنش و تنش خشکی از تجزیه همبستگی کانونیک استفاده شد. نتایج نشان داد که همبستگی معنی‌داری در هر دو سطح بدون تنش و تنش خشکی بین جفت متغیرهای کانونیک حاصل از صفات فیزیولوژیک با صفات ریشه‌ای و فنولوژیک وجود داشت (Tahmasebpour *et al.*, 2020). در مطالعه‌ای به منظور بررسی اثر تاریخ کشت و تنش گرمای انتهای فصل بر صفات فنولوژیک و اجزای عملکرد ژنوتیپ‌های گندم نان، نتایج تجزیه همبستگی کانونیک نشان داد که صفات فنولوژیک در همبستگی کانونیک اول در شرایط بدون تنش ۳۸ درصد و در شرایط تنش گرمای ۴۷ درصد واریانس در اجزای عملکرد را تفسیر نمودند که نشان‌دهنده تأثیر شدیدتر صفات فنولوژیک بر اجزای عملکرد در شرایط تنش گرماست (Musavi *et al.*, 2021). در مطالعه مروری بر همبستگی و تجزیه ضریب مسیر عملکرد در گندم، نتایج تجزیه علیت نشان داد که صفات ۵۰ درصد سنبله‌دهی، تعداد سنبله در متر مربع، تعداد سنبله‌چه در سنبله، دوره پر شدن دانه، وزن دانه در سنبله، عملکرد بیولوژیکی و شاخص برداشت اثر مستقیم مثبتی بر عملکرد دانه داشتند و این صفات را می‌توان به عنوان عوامل مؤثر در عملکرد دانه در نظر گرفت (Rachana *et al.*, 2021).

تعداد کالوس‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفت، که در مورد همه ژنوتیپ‌ها صد درصد بدست آمد. در طول این مدت در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از کشت، صفات مختلف از جمله قطر کالوس (به وسیله کاغذ میلی‌متری) (DC= Diameter of Callus)، وزن تر کالوس (FWC=Fresh Weight Callus)، وزن خشک روز بیست و هشتم کالوس، سرعت رشد کالوس (میلی‌متر قطر در روز) (CGR= Callus Growth Rate) (Golkar et al., 2008)، رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) (Chen et al., 2006)، سرعت رشد نسبی کالوس (بر اساس وزن تر) (Birsin et al., 2007)، درصد محتوی آب نسبی کالوس (RWC= Relative Water Content of Callus) (Errabii et al., 2007)، اندازه‌گیری شدند (شکل ۱). در ضمن در جدول تجزیه واریانس قطر کالوس و وزن تر روز بیست و هشتم ذکر گردید.

هدف از تجزیه همبستگی کانونی به دست آوردن ترکیب خطی از متغیرهای مستقل دارای حداکثر همبستگی با ترکیب خطی از متغیرهای وابسته است که به صورت ترکیب خطی به شکل زیر بیان می‌شود (Johnson & Wichern, 2002).

$$V = a'x = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_px_p \quad \text{رابطه ۱}$$

$$W = b'y = b_1y_1 + b_2y_2 + \dots + b_qy_q \quad \text{رابطه ۲}$$

در معادله فوق، V و W به ترتیب عبارتند از ترکیب خطی مربوط به صفات کشت بافت و ترکیب خطی مربوط به صفات زراعی؛ X و Y به ترتیب عبارتند از صفات کشت بافت و صفات زراعی. اندیس‌های p و q نیز به ترتیب بیانگر تعداد صفات کشت بافت و صفات زراعی هستند. در ضمن در این پژوهش، صفات زراعی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات کشت بافت به عنوان متغیرهای وابسته مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۵۰٪ ظهور بساک‌ها در سنبله (۵۰ درصد گرده‌افشانی) تا رسیدن فیزیولوژیکی دانه به عنوان دوره پر شدن دانه لحاظ شد. سرعت پر شدن دانه (Rate of Filing Seed, RFS)، از طریق تقسیم عملکرد دانه بر حسب گرم بر طول دوره پر شدن دانه (گرم/روز) محاسبه گردید. سرعت رشد رویشی (Rate of Vegetative Growth, RVS)، از تقسیم نمودن عملکرد بیولوژیک بر زمان رسیدگی فیزیولوژیک (گرم/روز) بدست آمد.

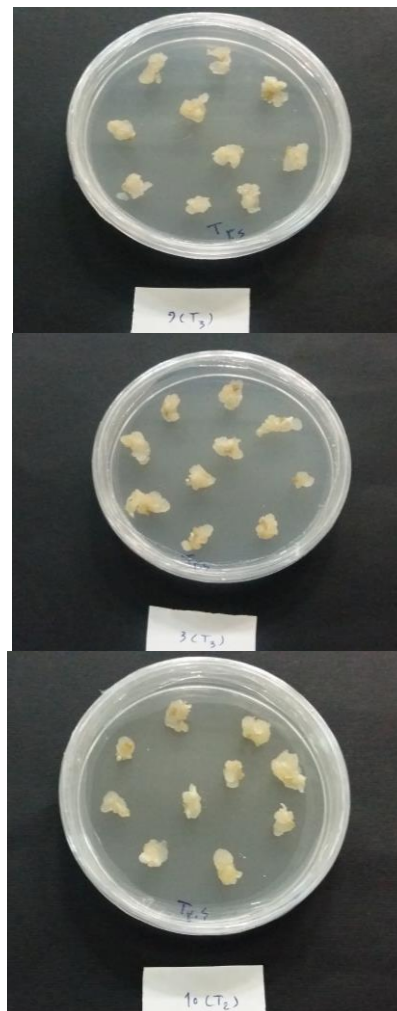
آزمایش کشت بافت

در این مرحله برای بررسی و مقایسه القاء کالوس جنین‌های بالغ ۲۵ ژنوتیپ گندم نان از یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی شامل دو فاکتور، ژنوتیپ در ۲۵ سطح و هورمون 2, 4-D در ۳ سطح ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر و کینیتین ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر در شش تکرار استفاده شد. در ابتدا بذور توسط آب شستشو داده و سپس به مدت دو دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار داده شد و در نهایت با آب مقطر شستشو داده شدند. در مرحله بعد ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد قرار داده شد و سه بار متوالی به مدت ۱، ۳ و ۵ دقیقه با آب مقطر استریل در شرایط هود لامینار (مدل Jal Tajhiz) آب‌شویی انجام شد و سپس جنین‌های بالغ از بذور جدا و روی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) به صورتی که جهت اسکوتوم به طرف بالا باشد، قرارداده شد. در هر پتری دیش ۱۰ جنین کشت و برای هر ژنوتیپ شش تکرار در نظر گرفته و به اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی انتقال داده شد. پس از ۴ تا ۶ روز بسته به ژنوتیپ گندم‌ها، کالوس‌ها مشاهده گردید. اندازه‌گیری کالوس‌های حاصل به صورت هفتگی و به مدت ۲۸ روز انجام شد. در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه درصد القاء کالوس (CIP= Callus Induction Percentage) چهار هفته بعد از کشت جنین از طریق شمارش

جدول ۱. ارقام و توده‌های گندم نان مورد مطالعه

کد ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	منشأ	کد ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	منشأ	کد ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	منشأ
۱	WC-4924	Kalat	۱۰	WC-4987	Unknown	۱۹	Pishtaz	Pishtaz
۲	WC-4582	Kermanshah	۱۱	WC-47615	Mexico	۲۰	Pishgam	Pishgam
۳	WC-4592	Kermanshah	۱۲	WC-4612	Kordestan Babrar	۲۱	Minnesota	WC-47640
۴	WC-47341	Montana	۱۳	WC-5001	Unknown	۲۲	Mexico	WC-47467
۵	WC-4965	Kashan	۱۴	WC-4994	Unknown	۲۳	Kerend	WC-4553
۶	WC-4840	Sarakhs	۱۵	WC-47638	Peru	۲۴	Kermanshah	WC-4583
۷	WC-4958	Badranloo	۱۶	WC-47583	Canada	۲۵	Kerend	WC-4554
۸	WC-47399	Bulgaria	۱۷	WC-47522	Mexico			
۹	WC-4600	Kermanshah	۱۸	WC-47569	Minnesota			

صفات مورد بررسی به جز درصد محتوی آب نسبی کالوس اختلاف بسیار معنی‌داری نشان داد، که معنی‌دار شدن اثر متقابل از لحاظ صفات مورد بررسی حاکی از آن است که میزان این صفات با افزایش سطوح مختلف هورمون توفوردی اختلاف معنی‌داری را در بین ژنوتیپ‌ها نشان داده است. براساس نتایج کلی صفات حاصل از کشت جنین بالغ می‌توان ژنوتیپ‌های شماره ۵ (WC-4965)، ۱ (WC-4924) و ۹ (WC-4600) را ژنوتیپ‌های برتر در این آزمایش معرفی کرد و تأثیر ژنوتیپ را در القاء کالوس معنی‌دار اعلام کرد که با نتایج Naseri *et al.* (2017a) و عباسی و محمدی (۱۴۰۲) مبنی بر اینکه القاء کالوس از ارقام مختلف گندم به غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد خصوصاً D-4، 2، وابسته است، مطابقت داشت. اختلاف معنی‌دار به دست آمده در بین ژنوتیپ‌ها ناشی از اثر ژنوتیپ، شرایط محیطی و هورمون‌های رشد گیاهی می‌باشد. در پژوهشی که به بررسی پاسخ جنین‌های بالغ حاصل از ۱۳ ژنوتیپ گندم دوروم براساس پارامترهای کشت بافت در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر توفوردی پرداخته شد. این نتیجه حاصل گردید که بین ژنوتیپ‌ها از نظر پارامترهای وزن کالوس، ظرفیت باززایی و اثر کشت در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. سه ژنوتیپ دارای بالاترین ظرفیت باززایی و اثر کشت در بین ۱۳ ژنوتیپ گندم دوروم بودند (Benlioglu *et al.*, 2020). در این تحقیق به نظر می‌رسد اثر سطوح مختلف هورمون D-4، 2 از نظر تولید کالوس‌های جنین‌زا نقش مؤثرتری را نسبت به سایر عوامل ایفا می‌کند که با نتایج Halina *et al.* (2013) و Haqua *et al.* (2015) مطابقت داشت. در مطالعه‌ای به منظور بررسی القای کالوس و تشکیل توده تقویت‌کننده جنین‌زایی در *Myrciaria dubia* بر اساس تأثیر 2,4-D (۰، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) و 6BAP (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی یا به صورت ترکیبی، نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین اثرات سه‌گانه وجود داشت، که بالاترین درصد تشکیل کالوس در ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آمد و این ترکیب منجر به ۹۳٪ تشکیل توده تقویت‌کننده جنین‌زایی شد (Araujo *et al.*, 2021). در تحقیقی در رابطه با بررسی القاء و باززایی کالوس کشت جنین نابالغ در شرایط درون شیشه‌ای گندم دوروم، نتایج تجزیه واریانس در مرحله کالوس‌زایی نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها از نظر درصد القای کالوس و سرعت رشد کالوس اختلاف معنی‌داری وجود داشت (Akbari *et al.*, 2023).



شکل ۱. نمونه‌ای از واکنش جنین‌های بالغ به القاء کالوس از طریق کشت بافت

داده‌های حاصل از آزمایش بوسیله نرم‌افزارهای آماری SAS 9.1.3 و SPSS 25 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. از روش LSD برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

تجزیه واریانس و پارامترهای آماری ۲۵ ژنوتیپ گندم نان براساس صفات اندازه‌گیری شده در مرحله القاء کالوس و مزرعه تحت شرایط دیم و آبیاری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات کشت بافت در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر تمامی صفات بررسی شده به جز درصد محتوی آب نسبی کالوس اختلاف بسیار معنی‌داری وجود داشت. اثر سطوح مختلف هورمون توفوردی بر تمامی صفات معنی‌داری بود. همچنین اثر متقابل ژنوتیپ و سطوح مختلف هورمون توفوردی برای همه

جدول ۲. تجزیه واریانس و پارامترهای آماری صفات ۲۵ ژنوتیپ گندم نان در مرحله القاء کالوس

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
درصد محتوی آب نسبی کالوس	سرعت رشد نسبی کالوس	رشد نسبی کالوس	سرعت رشد کالوس	وزن تر کالوس	قطر کالوس		
۱۵/۷۳ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۱/۶۷ ^{ns}	۰/۰۰۴ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۳/۳۹ ^{ns}	۳۴	ژنوتیپ
۷۷/۲۸ ^o	۰/۰۰۰۸ ^{ns}	۱/۶۹ ^{ns}	۰/۰۱۷ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۱۴/۴۷ ^{ns}	۲	هورمون توفوردی
۱۳/۴۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۵ ^{ns}	۰/۷۱۷ ^{ns}	۰/۰۰۰۶ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۵۶ ^{ns}	۴۸	ژنوتیپ × هورمون توفوردی
۱۹/۲۰	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۲۸	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۲	۰/۱۷	۳۷۵	خطا
۲/۸۷	۰/۰۰۳	۰/۱۱	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳	۰/۲۷		LSD 5%
۹۰/۱۲	۰/۰۰۹	۰/۲۳	۰/۲۱۹	۰/۰۴۹	۶/۰۲		حداقل
۹۴/۱۸	۰/۰۴۷	۱/۶۷	۰/۲۷۹	۰/۰۹۷	۷/۷۸		حداکثر
۹۱/۸۳	۰/۰۳	۰/۹۶	۰/۲۵۳	۰/۰۷	۷/۰۴		میانگین
۴/۷۷	۱۳/۲۲	۱۷/۵۷	۵/۳۷	۵/۹۳	۵/۹۴		(C.V.) ضریب تغییرات %

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار

تجزیه خوشه‌ای براساس صفات اندازه‌گیری شده در کشت بافت در مرحله القاء کالوس حاصل از جنین بالغ تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و با مربع فاصله اقلیدسی به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه براساس صفات اندازه‌گیری شده در کشت بافت انجام شد (شکل ۲). این ژنوتیپ‌ها در چهار گروه دسته‌بندی شدند. براساس این تجزیه، ژنوتیپ‌های شماره ۱ (WC-4924)، ۲۲ (WC-47467)، ۳ (WC-4592)، ۱۱ (WC-47615)، ۱۶ (WC-47583)، ۱۷ (WC-47522) و ۲۱ (WC-47640) در گروه اول، ژنوتیپ‌های شماره ۵ (WC-4965)، ۶ (WC-4840)، ۱۵ (WC-47638)، ۸ (WC-47399)، ۱۳ (WC-5001)، ۱۸ (WC-47569) و رقم پیش‌تاز در گروه دوم، ژنوتیپ‌های شماره ۲ (WC-4582)، ۱۴ (WC-4994)، ۲۳ (WC-4553)، ۱۰ (WC-4987)، ۱۲ (WC-4612)، ۷ (WC-4958)، ۲۵ (WC-4554) و رقم پیش‌گام در گروه سوم و ژنوتیپ‌های شماره ۴ (WC-47341)، ۲۴ (WC-4583) و ۹ (WC-4600) در گروه چهارم قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص نیز این گروه‌بندی را صد در صد تأیید نمود. در دندروگرام حاصل گروه اول بیشترین رشد نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس را داشتند. گروه دوم از نظر قطر کالوس، وزن تر کالوس و سرعت رشد کالوس بیشترین مقدار و از نظر محتوی آب نسبی کالوس کمترین مقدار را دارد. گروه سوم کمترین رشد نسبی کالوس و سرعت رشد نسبی کالوس را به خود اختصاص دادند. ژنوتیپ‌های گروه چهارم دارای بیشترین محتوی آب نسبی کالوس و کمترین قطر کالوس، وزن تر کالوس و سرعت رشد کالوس بودند. در یک بررسی بر روی القاء کالوس و باززایی کالوس‌های حاصل از جنین‌های بالغ و نابالغ جو و

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مزرعه‌ای در شرایط دیم (جدول ۳) نشان داد که برای صفات عملکرد دانه در متر مربع، وزن هکتولیتتر، وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله، طول اکسترانژن، طول سایر میانگره‌ها، وزن خشک ساقه، وزن دانه در سنبله، شاخص برداشت، روز تا سنبله‌دهی، دوره پر شدن دانه و سرعت پر شدن دانه در سطح احتمال ۱ درصد و عملکرد چف و تعداد سنبلچه در سنبله در سطح احتمال ۵ درصد و در شرایط آبیاری (جدول ۴) برای صفات عملکرد دانه در متر مربع، وزن هزار دانه، طول اکسترانژن، طول سایر میانگره‌ها، وزن خشک ساقه، وزن دانه در سنبله، شاخص برداشت، روز تا سنبله‌دهی، دوره پر شدن دانه و سرعت پر شدن دانه در سطح احتمال ۱ درصد و تعداد دانه در سنبله و تعداد سنبلچه در سنبله در سطح احتمال ۵ درصد بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بر اساس وجود تفاوت معنی‌دار از لحاظ صفات ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارای تنوع ژنتیکی مناسبی بوده و امکان انتخاب ژنوتیپ‌های برتر بر پایه این صفات در شرایط دیم و آبیاری وجود دارد. براساس نتایج مقایسه میانگین در شرایط مزرعه‌ای می‌توان ژنوتیپ‌های شماره ۱۰ (WC-4987)، ۲۵ (WC-4554)، ۱۹ (Pishtaz)، ۷ (WC-4958)، ۹ (WC-4600) و ۸ (WC-47399) را ژنوتیپ‌های برتر این آزمایش معرفی کرد. در تحقیقی به منظور بررسی روابط بین عملکرد دانه و صفات آگروفریزیولوژیکی ۱۴ ژنوتیپ گندم نان در شرایط دیم، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به غیر از طول پدانکل و شاخص برداشت، از نظر سایر صفات مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند (Soleimani Fard & Naseri, 2020).

واکنش جنین بالغ گندم دوروم به القاء کالوس و تنش شوری در شرایط آزمایشگاهی، براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای صفات اندازه‌گیری شده کالوس در شرایط تنش، ژنوتیپ‌ها در پنج گروه دسته‌بندی شد و ژنوتیپ‌های متحمل و حساس شناسایی شدند (عباسی و محمدی، ۱۴۰۲).

ارتباط آن با صفات زراعی، بر اساس تجزیه کلاستر، ارقام به سه گروه خوشه‌بندی شدند. گروه سوم شامل ارقامی بود که همه آن‌ها دارای بیشترین میانگین برای طول برگ پرچم، تعداد روز تا گلدهی، عملکرد دانه، سرعت رشد کالوس و قطر اولیه کالوس بودند (Naseri *et al.*, 2017a). در مطالعه‌ای به منظور بررسی

جدول ۳. تجزیه واریانس و پارامترهای آماری صفات زراعی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان در شرایط دیم

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
عملکرد چف	تعداد سنبله در متر مربع	تعداد دانه در سنبله	وزن هزاردانه	وزن هکتولیترا	عملکرد دانه در متر مربع		
۱۰۵۹/۵۳ ^{ns}	۶۴۹۳/۵۱ ^{ns}	۹/۶۸ ^{ns}	۱۰/۷۹*	۱۰۲۳/۳۵ ^{ns}	۱۰۰۵۱/۸۹ ^{ns}	۲	بلوک
۳۳۴۵/۴۹*	۶۴۱۹/۵۴ ^{ns}	۶۳/۲۷**	۳۱/۴۴**	۱۱۷۵۶/۷۱**	۹۸۷۴/۹۹**	۲۴	ژنوتیپ
۱۷۴۷/۷۹	۴۰۷۰/۴۱	۲۲/۴۲	۲/۹۰	۳۰۱۸/۱۲	۴۵۸۱/۵۵	۴۸	خطا
۶۸/۶۳	۱۰۴/۷۴	۷/۷۷	۲/۸۰	۹۰/۱۹	۱۱۱/۱۲		LSD 5%
۸۲/۹۴	۲۷۶/۳۳	۲۳	۲۲/۳۲	۶۶۲/۷۳	۱۹۰/۱۵		حداقل
۲۳۳/۳۳	۴۶۰/۳۹	۴۱/۶۰	۳۴/۱۳	۹۲۷/۴۹	۴۲۴/۷۳		حداکثر
۱۶۷/۶۵	۳۵۱/۶۲	۳۴/۸۰	۲۸/۶۸	۷۶۰/۱۵	۲۸۳/۷۵		میانگین
۲۴/۹۴	۱۸/۱۴	۱۳/۶۱	۵/۹۴	۷/۲۳	۲۳/۸۵		ضریب تغییرات % (C.V)

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار

ادامه جدول ۳. تجزیه واریانس و پارامترهای آماری صفات زراعی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان در شرایط دیم

وزن دانه در سنبله	وزن خشک ساقه	تعداد سنبلچه در سنبله	طول سایر میانگره‌ها	طول اکسترانژن	عملکرد کاه	درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۰۳ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۱/۷۹ ^{ns}	۱۸۶/۳۳**	۱۲/۵۵ ^{ns}	۱۹۸۷/۷۹ ^{ns}	۲	بلوک
۰/۰۸**	۰/۱۳**	۲/۲۶*	۹۳/۳۹**	۴۶/۷۵**	۱۶۲۵۸/۸۴ ^{ns}	۲۴	ژنوتیپ
۰/۰۴	۰/۰۴	۱/۳۰	۳۴/۸۱	۱۰/۹۸	۱۴۷۲۰/۷۶	۴۸	خطا
۰/۳۲	۰/۳۴	۱/۸۷	۹/۶۹	۵/۴۴	۱۹۹/۱۸		LSD 5%
۰/۷۲	۰/۶۴	۱۶/۸۰	۱۵/۹۲	۳/۸۸	۴۶۹/۳۱		حداقل
۱/۳۶	۱/۴۵	۲۰/۷۳	۳۹/۸۲	۱۹/۹۱	۷۳۴/۲۶		حداکثر
۱/۰۸	۱/۱۵	۱۸/۹۲	۲۷/۳۴	۱۲/۰۳	۶۰۸/۲۰		میانگین
۱۸/۰۱	۱۷/۹۰	۶/۰۳	۲۱/۵۸	۲۷/۵۳	۱۹/۹۵		ضریب تغییرات % (C.V)

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار

ادامه جدول ۳. تجزیه واریانس و پارامترهای آماری صفات زراعی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان در شرایط دیم

سرعت پرشدن دانه	سرعت رشد رویشی	دوره پرشدن دانه	روز تا سنبله‌دهی	شاخص برداشت	نسبت پدانکل به ارتفاع	درجه آزادی	منابع تغییرات
۷/۵۵ ^{ns}	۱/۸۷ ^{ns}	۵/۸۱ ^{ns}	۳/۶۱ ^{ns}	۲۵/۲۴ ^{ns}	۰/۰۰۴ ^{ns}	۲	بلوک
۱۲/۱۱**	۱/۴۹ ^{ns}	۱۰/۹۵**	۲۶/۰۱**	۳۴/۲۸**	۰/۰۰۲ ^{ns}	۲۴	ژنوتیپ
۳/۶۹	۱/۴۹	۵/۰۴	۳/۱۶	۱۲/۴۳	۰/۰۰۲	۴۸	خطا
۳/۱۶	۲	۳/۶۸	۲/۹۲	۵/۷۹	۰/۰۷		LSD 5%
۵/۴۹	۴/۱۸	۲۳/۳۳	۱۶۹	۱۷/۰۴	۰/۳۰		حداقل
۱۴/۶۴	۶/۹۸	۳۱	۱۷۹	۳۲/۲۷	۰/۴۱		حداکثر
۱۰/۳۲	۵/۳۶	۲۵/۷۵	۱۷۴/۰۱	۲۵/۶۱	۰/۳۶		میانگین
۱۸/۶۲	۲۲/۷۹	۸/۷۲	۱/۰۲	۱۳/۷۶	۱۱/۰۵		ضریب تغییرات % (C.V)

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار

جدول ۴. تجزیه واریانس و پارامترهای آماری صفات زراعی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان در شرایط آبیاری

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
عملکرد	تعداد سنبله	تعداد دانه	وزن	وزن	عملکرد دانه		
چف	در متر مربع	در سنبله	هزاردانه	هکتولیترا	در متر مربع		
۳۳۳۲/۱۱ ^{ns}	۴۵۷۴/۶۳ ^{ns}	۱۰۲/۴۲*	۸/۲۲ ^{ns}	۹۵۰۷/۰۳ ^{ns}	۳۲۹۲۹/۷۶**	۲	بلوک
۲۴۲۱/۹۸ ^{ns}	۱۶۹۶۸/۱۴ ^{ns}	۵۴/۰۶*	۸۷/۳۶**	۸۹۲۶/۳۹ ^{ns}	۲۴۶۱۲/۷۳**	۲۴	ژنوتیپ
۲۷۲۴/۹۴	۱۴۸۷۷/۸۱	۲۹/۹۷	۴/۰۹	۹۳۹۷/۰۹	۴۴۱۱/۱۷	۴۸	خطا
۸۵/۷۰	۲۰۰/۲۴	۸/۹۹	۳/۳۲	۱۵۹/۱۴	۱۰۹/۰۳		LSD 5%
۹۸/۷۹	۳۱۶/۴۳	۳۰/۴۷	۲۹/۳۳	۷۷۵/۲۰	۲۱۴/۲۱		حداقل
۲۴۲/۰۷	۶۳۸/۶۵	۴۴/۹۳	۴۷/۰۹	۹۸۲/۱۴	۲۶۵/۷۵		حداکثر
۱۹۲/۰۹	۴۵۲/۰۱	۳۸/۲۲	۳۹/۸۹	۸۵۶/۲۰	۳۹۵/۷۴		میانگین
۲۷/۱۸	۲۶/۹۳	۱۴/۳۲	۵/۰۷	۱۱/۳۲	۱۶/۷۸		ضریب تغییرات % (C.V)

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار

ادامه جدول ۴. تجزیه واریانس و پارامترهای آماری صفات زراعی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان در شرایط آبیاری

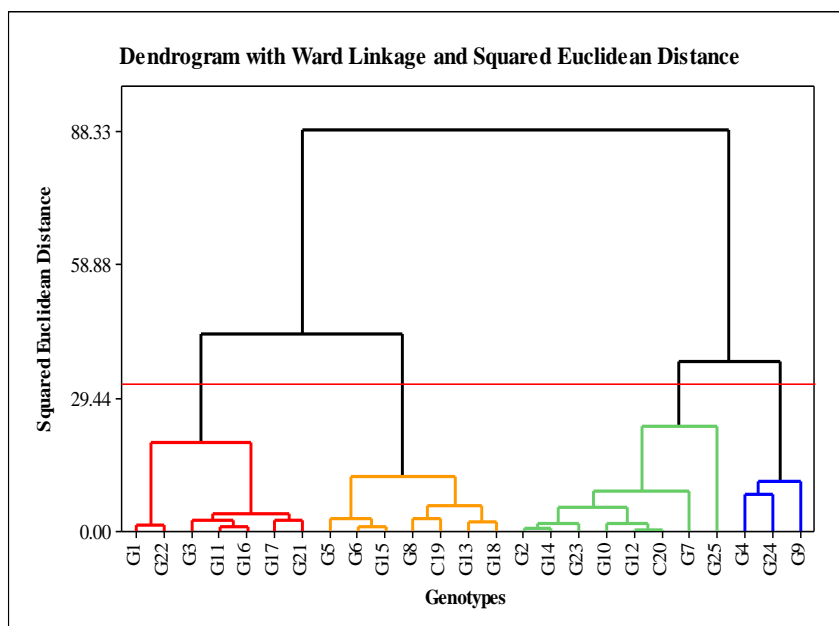
میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
وزن دانه در سنبله	وزن خشک ساقه	تعداد سنبلچه در سنبله	طول سایر میانگره‌ها	طول اکسترانژن	عملکرد کاه		
۰/۲۳*	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۳۵ ^{ns}	۵/۴۷ ^{ns}	۲۴/۵۸ ^{ns}	۳۵۸۶/۰۷ ^{ns}	۲	بلوک
۰/۲۷**	۰/۱۲**	۳/۰۸*	۶۷/۵۵**	۳۴/۴۰**	۲۱۷۳۴/۸۳ ^{ns}	۲۴	ژنوتیپ
۰/۰۷	۰/۰۴	۱/۵۵	۱۰/۷۳	۱۲/۸۷	۲۷۷۲۵/۷۱	۴۸	خطا
۰/۴۲	۰/۳۲	۲/۰۴	۵/۳۸	۵/۸۹	۲۷۳/۳۶		LSD 5%
۱	۰/۸۷	۱۶/۸۷	۷/۹۳	۱۰/۲۴	۶۱۱/۸		حداقل
۲/۱۲	۱/۶۱	۲۱/۵۳	۲۹/۴۳	۲۱/۴۲	۹۰۹/۱		حداکثر
۱/۵۸	۱/۲۹	۱۹/۳۶	۲۳/۳۱	۱۵/۶۲	۷۴۲/۷۳		میانگین
۱۶/۳۱	۱۵/۰۸	۶/۴۳	۱۴/۰۶	۲۲/۹۷	۲۲/۴۲		ضریب تغییرات % (C.V)

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار

ادامه جدول ۴. تجزیه واریانس و پارامترهای آماری صفات زراعی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان در شرایط آبیاری

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
سرعت پرشدن دانه	سرعت رشد رویشی	دوره پرشدن دانه	روز تا سنبله‌دهی	شاخص برداشت	نسبت پدانکل به ارتفاع		
۳۳/۲۸**	۰/۳۷ ^{ns}	۳/۰۵ ^{ns}	۴/۸۱ ^{ns}	۱۱۱/۲۸**	۰/۰۰۴ ^{ns}	۲	بلوک
۱۲/۶۲**	۱/۴۴ ^{ns}	۱۳/۷۵**	۲۳/۹۸**	۸۵/۱۲**	۰/۰۰۲ ^{ns}	۲۴	ژنوتیپ
۵/۹۹	۱/۰۴	۳/۸۰	۳/۱۹	۲۱/۵۲	۰/۰۰۳	۴۸	خطا
۴/۰۲	۱/۶۸	۳/۲۰	۲/۹۳	۷/۶۲	۰/۰۹		LSD 5%
۷/۹۲	۴/۴۰	۳۲/۶۷	۱۷۲	۱۹/۱۰	۰/۳۴		حداقل
۱۶/۳۴	۷/۲۴	۳۹	۱۷۹	۴۰/۵۷	۰/۴۴		حداکثر
۱۱/۸۰	۶/۰۲	۳۵/۵۱	۱۷۵/۴۱	۳۰/۲۲	۰/۳۹		میانگین
۲۰/۷۴	۱۶/۹۷	۵/۴۹	۱/۰۲	۱۵/۳۵	۱۳/۴۶		ضریب تغییرات % (C.V)

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار



شکل ۲. گروه‌بندی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان با استفاده از تجزیه خوشه‌ای براساس صفات مورد مطالعه در کشت جنین بالغ به روش Ward

پیش‌تاز که دارای بیشترین عملکرد دانه در متر مربع، عملکرد چف، طول اکستراژن، وزن دانه در سنبله، نسبت پدانکل به ارتفاع، شاخص برداشت، دوره پر شدن دانه، سرعت رشد رویشی و سرعت پر شدن دانه در بین گروه‌ها بوده و از نظر تعداد روز تا سنبله‌دهی کمترین مقدار را داشتند و از لحاظ مابقی صفات در رده‌ی متوسطی قرار داشتند. در گروه چهارم ژنوتیپ‌های شماره ۵ (WC-4965)، ۹ (WC-4600)، ۲۳ (WC-4553)، ۸ (WC-47399)، ۷ (WC-4958)، ۲۵ (WC-4554) و رقم پیشگام قرار گرفتند که وزن هزار دانه، طول سایر میانگره‌ها، تعداد سنبلچه در سنبله و وزن خشک ساقه بالاتری نسبت به سایر خوشه‌ها داشتند و از نظر وزن هکتولیترا، تعداد سنبله در متر مربع و نسبت پدانکل به ارتفاع کمترین بودند. همچنین از نظر مابقی صفات تقریباً در رده‌ی متوسطی قرار داشتند. اما آنچه که حائز اهمیت بود گروه‌بندی متفاوت ژنوتیپ‌ها برای صفات مختلف از جمله عملکرد تحت دو شرایط متفاوت دیم و آبیاری بود که این مسئله بیانگر روند متفاوت واکنش ژنوتیپ‌ها به شرایط رطوبتی متفاوت بود. در نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که گروه سوم یعنی ژنوتیپ‌های شماره ۲ (WC-4582)، ۱۳ (WC-5001)، ۶ (WC-4840)، ۱۴ (WC-4994)، ۱۵ (WC-47638)، ۱۷ (WC-47522)، ۲۱ (WC-47640)، ۱۰ (WC-4987)، ۱۸ (WC-47569) و رقم پیش‌تاز از نظر اکثر صفات که شامل عملکرد و صفات مرتبط با آن بودند، برتر شناسایی شدند. بنابراین باتوجه به گروه‌بندی‌های ایجاد شده در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه می‌توان بیان داشت

تجزیه خوشه‌ای براساس صفات اندازه‌گیری شده در مزرعه در دو شرایط دیم و آبیاری

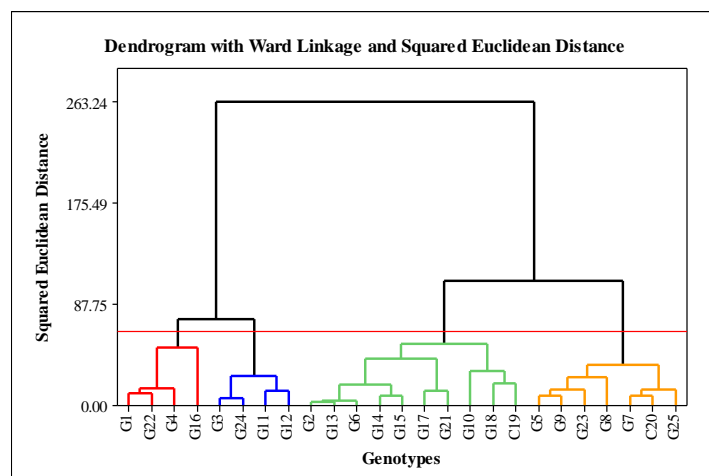
به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در شرایط مزرعه از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و با مربع فاصله اقلیدسی استفاده گردید (شکل ۳). در این روش ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دو شرایط دیم و آبیاری براساس تجزیه تابع تشخیص در چهار گروه قرار گرفتند. گروه اول ژنوتیپ‌های شماره ۱ (WC-4924)، ۲۲ (WC-47467)، ۴ (WC-47341) و ۱۶ (WC-47583) را به خود اختصاص دادند که بیشترین تعداد دانه در سنبله و عملکرد کاه را داشتند، از طرفی کمترین عملکرد دانه در متر مربع، وزن هزار دانه، عملکرد چف، طول سایر میانگره‌ها، شاخص برداشت و سرعت پر شدن دانه را دارا بودند و همچنین از لحاظ مابقی صفات در رده‌ی متوسط قرار داشتند. ژنوتیپ‌های شماره ۳ (WC-4592)، ۲۴ (WC-4583)، ۱۱ (WC-47615) و ۱۲ (WC-4612) در گروه دوم که بیشترین وزن هکتولیترا، تعداد سنبله در متر مربع و روز تا سنبله‌دهی را در بین خوشه‌ها داشتند و کمترین تعداد دانه در سنبله، عملکرد کاه، طول اکستراژن، تعداد سنبلچه در سنبله، وزن خشک ساقه، وزن دانه در سنبله، دوره پر شدن دانه و سرعت رشد رویشی را به خود اختصاص دادند و از لحاظ مابقی صفات مقدار متوسطی داشتند. در گروه سوم ژنوتیپ‌های شماره ۲ (WC-4582)، ۱۳ (WC-5001)، ۶ (WC-4840)، ۱۴ (WC-4994)، ۱۵ (WC-47638)، ۱۷ (WC-47522)، ۲۱ (WC-47640)، ۱۰ (WC-4987)، ۱۸ (WC-47569) و رقم

وابسته با صفات زراعی به عنوان متغیرهای مستقل بررسی شد. اثرات مستقیم و غیر مستقیم هر یک از متغیرهای مستقل با متغیرهای تابع مشخص گردید (جدول‌های ۵ و ۶). در شرایط آبیاری صفات وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله، سرعت رشد رویشی، تعداد سنبله در متر مربع و طول سایر میانگره‌ها به ترتیب بیشترین اثرات مستقیم مثبت معنی‌دار، صفات وزن دانه در سنبله، عملکرد کاه و روز تا سنبله‌دهی بیشترین اثرات مستقیم منفی معنی‌دار و صفات عملکرد دانه و طول اکستراژن کمترین اثرات مستقیم مثبت و منفی را بر قطر کالوس داشتند. صفات وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله، سرعت رشد رویشی، طول سایر میانگره‌ها و تعداد سنبله در متر مربع بیشترین اثر مستقیم مثبت معنی‌دار را بر صفت وزن تر کالوس نشان دادند، اما صفات وزن دانه در سنبله، دوره پر شدن دانه، روز تا سنبله‌دهی و وزن هکتولتر بر صفت مذکور بیشترین اثر مستقیم منفی معنی‌دار و صفات تعداد سنبله‌چه در سنبله و عملکرد چف کمترین اثرات مستقیم مثبت و منفی را بر وزن تر کالوس دارا بودند. نتایج تجزیه همبستگی در تحقیق حاضر نیز نشان داد که این متغیرها دارای بیشترین همبستگی با صفات کشت بافت (متغیرهای وابسته) بودند. پس به ترتیب در شرایط آبیاری، صفات وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله، سرعت رشد رویشی، طول سایر میانگره‌ها، تعداد سنبله در متر مربع، وزن دانه در سنبله و روز تا سنبله‌دهی بیشترین اثر مستقیم را بر صفات کشت بافت داشتند که از نظر صفت روز تا سنبله‌دهی با نتایج *Nasari Myankali et al.* (2017b)، و از لحاظ هر دو صفت با نتایج *Jaisi et al.* (2021) در تطابق بود.

که ژنوتیپ‌های شماره ۱۵ (WC-47638)، ۶ (WC-4840)، ۱۳ (WC-5001)، ۱۸ (WC-47569) و رقم پیش‌تاز به طور مشترک در هر دو شرایط برتر بودند. در پژوهشی بر اساس تجزیه خوشه‌ای به روش وارد در شرایط تنش ژنوتیپ‌های مورد بررسی در چهار گروه قرار گرفتند. روند گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها تا حدودی متفاوت بود که ناشی از واکنش متفاوت ژنوتیپ‌های گندم نان به تنش کمبود آب و تفاوت در حساسیت یا مقاومت نسبی آنها به تنش بود که با نتایج این پژوهش از نظر به کارگیری برخی ژنوتیپ‌ها و صفات مطابقت داشت (*Naderi et al., 2020*). در تحقیقی با هدف گروه‌بندی اینبرد لاین‌های نو ترکیب گندم نان از نظر صفات فنولوژیک و تخصیص مواد فتوسنتزی در شرایط تنش کم آبی انتهای فصل، این نتیجه حاصل شد که بین دو شرایط نرمال رطوبتی و تنش کم آبی از نظر روز تا سنبله‌دهی، عملکرد دانه و سهم انتقال مجدد در عملکرد دانه اختلاف معنی‌دار دیده شد. بر اساس نتایج تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌ها در هر دو شرایط تنش و بدون تنش خشکی به چهار گروه دسته‌بندی شدند (*Hamze et al., 2020*). در مطالعه‌ای در رابطه با تجزیه همبستگی کانونی صفات رشدی و صفات مرتبط با عملکرد دانه ژنوتیپ‌های مختلف گندم نان تحت تنش رطوبتی پس از گلدهی، بر اساس تجزیه خوشه‌ای عملکرد دانه و کلیه صفات مرتبط با آن در شرایط نرمال مزرعه، چهار گروه ایجاد شد که ژنوتیپ‌های برتر از نظر عملکرد دانه شناسایی شدند (*Tahmasebpour et al., 2021b*).

ارتباط بین صفات زراعی و صفات مورد مطالعه در کشت جنین بالغ

تجزیه علیت: در تجزیه علیت ارتباط صفات کشت بافتی شامل قطر کالوس و وزن تر کالوس به عنوان متغیرهای



شکل ۳. گروه‌بندی ۲۵ ژنوتیپ گندم نان با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات مورد مطالعه در مزرعه در شرایط دیم و آبیاری با روش Ward

زراعی مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد که این یافته با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (Li et al., 2003). در پژوهشی به منظور بررسی ارتباط بین صفات زراعی و کشت بافت در گندم، نتایج نشان داد که عملکرد دانه بالاترین اثر مستقیم مثبت را بر تشکیل کالوس داشت، در حالی که تعداد دانه در سنبله بیشترین اثر مستقیم مثبت را بر القاء کالوس‌های زایشی و تعداد گیاه تولید شده از جنین داشت (Dodig et al., 2008). در مطالعه‌ای به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، همبستگی و تجزیه علیت در ژنوتیپ‌های گندم نان (*Triticum aestivum*) برای عملکرد و صفات مرتبط با آن، نتایج تجزیه علیت نشان داد که شاخص برداشت و عملکرد بیولوژیکی بر عملکرد دانه تأثیر مثبت داشتند و به دنبال آن اثر مستقیم تعداد روز تا ۵۰ درصد سنبله‌دهی و وزن هزار دانه نشان داد که این صفات عوامل اصلی در عملکرد دانه بودند (Ashish et al., 2020). در مطالعه مروری بر ضریب همبستگی و تجزیه مسیر بین پارامترهای عملکرد گندم این نتیجه حاصل شد که، از بین صفات زراعی، روز تا سنبله‌دهی و روز تا رسیدگی همبستگی منفی با عملکرد دانه نشان دادند، اما میزان سنبله در متر مربع، تعداد سنبله‌چه در سنبله، تعداد دانه در سنبله و وزن سنبله و وزن سنبله ارتباط مستقیم با عملکرد دانه داشتند. وزن سنبله، وزن هزار دانه، تعداد سنبله در متر مربع، تعداد دانه در سنبله اثر مثبت مستقیم بر عملکرد دانه و روز تا سنبله‌دهی اثر مستقیم منفی بر عملکرد دانه داشتند که از نظر صفات به کار برده شده در تطابق با نتایج این پژوهش می‌باشد (Jaisi et al., 2021).

ولیکن در شرایط دیم اثر مستقیم معنی‌داری دیده نشد که می‌توان چنین استنباط کرد که صفات در مرحله القاء کالوس بیشتر با صفات زراعی در شرایط آبیاری همبستگی و ارتباط معنی‌داری داشته‌اند. که با توجه به اینکه در شرایط آبی، گیاه حداکثر کارایی ژنتیکی خود را نشان می‌دهد و پتانسیل واقعی گیاه را در شرایط آبی می‌توان دید و اینکه کشت بافت در شرایط کنترل شده و آزمایشگاهی انجام شده و در آن شرایط هم گیاه با در اختیار داشتن محیط مغذی برای رشد، حداکثر پتانسیل خود را نشان می‌دهد، بنابراین در این پژوهش ارتباط صفات کشت بافت با صفات زراعی در شرایط آبیاری بسیار معقول و منطقی است. صفات زراعی مانند عملکرد دانه و اجزاء آن صفات کمی شناخته شده و تحت کنترل تعداد زیادی از ژن‌ها با اثرات کوچک هستند. از سویی گزارشاتی مبنی بر اینکه صفات کشت بافتی نیز از نظر ژنتیکی کمی بوده و بطور پلی ژنیک کنترل می‌شوند وجود دارد (Bhaskaran & Smith, 1990; Henry et al., 1994; Bregitzer & Campbell, 2001). اطلاعات ما از جایگاه‌های کنترل کننده (QTL) صفات زراعی و صفات کشت بافتی بسیار محدود است. صفات کشت بافتی ممکن است توسط سیستم ژنتیکی کنترل کننده صفات زراعی کنترل شوند. در گزارشی بازوی کوتاه کروموزوم شماره سه گندم (3AL) در القاء کالوس از جنین نقش مؤثری دارد (Henry et al., 1994). در مطالعه‌ای ارتباط بین صفات زراعی و صفات کشت بافتی معنی‌دار گزارش شد. البته بین صفات در مرحله القاء کالوس با برخی از صفات

جدول ۵. ضرایب همبستگی و مسیر (اثرات مستقیم و غیر مستقیم) صفات زراعی در شرایط دیم بر صفات کشت جنین در ۲۵ ژنوتیپ گندم نان

وزن تر کالوس (میلی گرم)			قطر کالوس (میلی متر)			صفات
اثر غیر مستقیم	اثر مستقیم	ضریب همبستگی	اثر غیر مستقیم	اثر مستقیم	ضریب همبستگی	
۰/۸۲	-۰/۵۸	۰/۲۵	-۰/۱۶	۰/۵۷	۰/۴۰*	عملکرد دانه
-۰/۶۷	۰/۲۷	-۰/۴۱*	-۰/۰۵	-۰/۴۲	-۰/۴۷*	وزن هکتولیترا
۰/۸۲	-۰/۶۸	۰/۱۳	۰/۵۶	-۰/۳۷	۰/۱۹	وزن هزار دانه
۰/۵۷	-۰/۶۴	-۰/۰۶	۱/۰۸	-۱/۰۵	۰/۰۳	تعداد دانه در سنبله
۰/۹۲	-۰/۹۹	-۰/۰۷	۰/۴۷	-۰/۶۲	-۰/۱۴	تعداد سنبله در متر مربع
۰/۵۷	-۰/۳۵	۰/۲۲	۰/۵۶	-۰/۲۵	۰/۳۱	عملکرد چف
۰/۳۶	-۰/۴۱	-۰/۰۵	۰/۲۱	-۰/۰۸	۰/۲۹	عملکرد کاه
-۰/۵۱	۰/۷۶	۰/۲۵	۰/۱۹	۰/۱۰	۰/۳۰	طول اکستراژن
-۰/۰۴	۰/۳۰	۰/۲۶	۰/۳۱	-۰/۲۱	۰/۱۱	طول سایر میانگره‌ها
۰/۶۶	-۰/۶۶	۰	۰/۸۴	-۰/۶۳	۰/۲۲	تعداد سنبله‌چه در سنبله
۰/۵۴	-۰/۳۲	۰/۲۱	۰/۱۹	۰/۱۴	۰/۳۳	وزن خشک ساقه
۰/۱۱	-۰/۱۳	-۰/۰۲	-۰/۳۱	۰/۵۱	۰/۲۰	وزن دانه در سنبله
-۰/۰۶	۰/۱۸	۰/۱۲	-۰/۲۲	۰/۵۲	۰/۳۰	نسبت پدانکل به ارتفاع
۱/۴۹	-۱/۳۷	۰/۱۲	۲/۴۴	-۲/۲۷	۰/۱۷	شاخص برداشت
-۰/۲۸	۰/۲۶	-۰/۰۲	-۰/۰۲	-۰/۱۶	-۰/۱۸	روز تا سنبله‌دهی
-۱/۰۹	۱/۳۹	۰/۳۰	-۰/۴۷	۰/۸۲	۰/۳۵	دوره پر شدن دانه
۰/۸۸	-۰/۶۱	۰/۲۷	۱/۶۵	-۱/۱۷	۰/۴۷*	سرعت رشد رویشی
-۲/۸۸	۳/۱۳	۰/۲۵	-۱/۸۰	۲/۱۸	۰/۳۸	سرعت پر شدن دانه

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

جدول ۶. ضرایب همبستگی و مسیر (اثرات مستقیم و غیر مستقیم) صفات زراعی در شرایط آبیاری بر صفات کشت جنین در ۲۵ ژنوتیپ گندم نان

صفات	قطر کالوس (میلی متر)			وزن تر کالوس (میلی گرم)		
	ضریب همبستگی	اثر مستقیم	اثر غیر مستقیم	ضریب همبستگی	اثر مستقیم	اثر غیر مستقیم
عملکرد دانه	۰/۴۰*	۰/۰۰۲	۰/۴۰	۰/۱۵	-۱/۱۴	۱/۲۸
وزن هکتولیتیر	-۰/۳۹	-۰/۸۱	۰/۴۳	-۰/۱۶	-۰/۹۲*	۰/۷۵
وزن هزار دانه	۰/۴۳*	۴/۷۵**	-۴/۳۲	۰/۲۴	۵/۱۸**	-۴/۹۵
تعداد دانه در سنبله	۰/۱۲	۳/۷۴*	-۳/۶۲	-۰/۰۹	۳/۸۵*	-۳/۹۴
تعداد سنبله در متر مربع	۰/۱۱	۱/۸۴*	-۱/۷۲	۰/۱۶	۱/۶۷*	-۱/۵۱
عملکرد چف	۰/۰۸	-۱/۱۱	۱/۱۹	۰/۰۵	-۰/۹۲	۰/۹۷
عملکرد کاه	۰/۰۳	-۳/۰۴*	۳/۰۷	-۰/۰۳	-۲/۳۶	۲/۳۳
طول اکستراژن	۰/۰۳	-۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۱۹	۰/۵۶	-۰/۳۸
طول سایر میانگره‌ها	-۰/۰۲	۱/۵۳*	-۱/۵۴	۰/۲۱	۲/۰۲**	-۱/۸۱
تعداد سنبله در سنبله	۰/۲۴	۰/۲۳	۰/۰۱	-۰/۰۲	۰/۲۶	-۰/۲۸
وزن خشک ساقه	۰/۳۵	-۰/۳۶	۰/۷۱	۰/۱۸	-۱/۲۸	۱/۴۶
وزن دانه در سنبله	۰/۳۴	-۳/۵۹**	۳/۹۲	۰/۰۹	-۳/۶۸**	۳/۷۶
نسبت پدانکل به ارتفاع	۰/۱۰	۰/۹۷	-۰/۸۸	۰/۰۲	۱/۲۳	-۱/۲۱
شاخص برداشت	۰/۳۳	-۳/۹۲	۴/۲۵	۰/۱۳	-۲/۴۲	۲/۵۵
روز تا سنبله‌دهی	-۰/۳۲	-۱/۰۹*	۰/۷۷	-۰/۱۲	-۱/۰۸*	۰/۹۶
دوره پر شدن دانه	۰/۲۶	-۰/۸۸	۱/۱۴	-۰/۱۲	-۱/۲۴**	۱/۱۲
سرعت رشد رویشی	۰/۲۴	۳/۱۶*	-۲/۹۲	-۰/۰۵	۲/۶۵*	-۲/۷۰
سرعت پر شدن دانه	۰/۳۱	-۱/۲۰	۱/۵۱	۰/۰۸	-۱/۱۰	۱/۱۸

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

دانه را توجیه نمود، همچنین تابع W_1 بیشتر تحت تأثیر روی (Zn) و فسفر (P) و تابع V_1 بیشتر تحت تأثیر وزن هزار دانه و طول خوشه بود (Rabbani et al., 2022). ترکیب خطی همبستگی ارتباط بین دو سری صفت را نشان داد. در تابع اول ضرایب مربوط به صفات زراعی مهم (W_1) و صفات کشت بافت (V_1) به صورت روابط زیر بدست آمد:

رابطه (۳)

$$W_1 = -1/196 \text{ GY} + 0/456 \text{ HW} + 0/691 \text{ TSW} + 1/044 \text{ NSPS} + 0/618 \text{ NSP} + 0/762 \text{ Chaff} + 0/37 \text{ SY} - 1/963 \text{ XL} + 1/638 \text{ OIL} + 0/961 \text{ NSS} + 0/405 \text{ StW} - 0/802 \text{ SGW} + 1/665 \text{ PL/PH} + 3/517 \text{ HI} - 0/295 \text{ DAS} - 1/492 \text{ SFP} + 1/806 \text{ RVS} - 3/461 \text{ RFS}$$

رابطه (۴)

$$V_1 = -2/124 \text{ DC} + 0/078 \text{ FWC} + 1/677 \text{ CGR} + 3/56 \text{ RFWG} - 4/033 \text{ RGR} - 0/552 \text{ RWC}$$

ارتباط بین متغیرهای کانونی و متغیرهای اصلی از طریق ضرایب ساختاری (ضرایب استاندارد شده) ارزیابی می‌شوند. با

تجزیه همبستگی کانونیک در شرایط دیم: نتایج

همبستگی کانونی بین صفات کشت بافت با صفات مهم زراعی در شرایط دیم در جدول ۸ نشان داده شده است. معنی‌دار شدن آماره ویلکس لمدا^۱ در سطح احتمال یک درصد در ارتباط با تابع اول، حاکی از وجود همبستگی معنی‌دار بین دو گروه صفات مورد مطالعه و نشان‌دهنده ارتباط بالا بین صفات کشت بافت و صفات زراعی می‌باشد. این تابع صد درصد از واریانس کل را توضیح داده است. بدین معنی که صفات کشت بافت مورد مطالعه صد درصد از تغییرات صفات زراعی در شرایط دیم را توجیه نمود (جدول ۷). در پژوهشی به منظور بررسی ارتباط صفات زراعی با عناصر معدنی دانه با استفاده از تجزیه همبستگی کانونیک، این نتیجه حاصل شد که معنی‌دار شدن آماره ویلکس لمدا در سطح احتمال پنج درصد در ارتباط با تابع اول، حاکی از وجود همبستگی معنی‌دار بین دو گروه صفات مورد مطالعه بود و این تابع ۹۰ درصد از واریانس کل را توضیح داد، بدین معنی که صفات زراعی مورد مطالعه ۹۰ درصد از تغییرات صفات مربوط به عناصر معدنی

آزمایش نیز عملکرد دانه (۰/۹۱)، روز تا رسیدگی (۰/۱۹-) و ارتفاع (۰/۱۶) بودند (Nazari et al., 2022).

همبستگی بین متغیرهای اندازه‌گیری شده یک گروه با توابع کانونی مربوط به همان گروه در جدول ۸ آمده است. نتایج این ارزیابی نشان داد که در بین صفات کشت بافت تمامی متغیرها همبستگی معنی‌داری با تابع کانونی اول داشتند و از این بین، صفات سرعت رشد نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس به ترتیب با بارهای کانونی ۰/۶۴۵- و ۰/۵۶۲- بیشترین همبستگی را نشان دادند. از بین صفات زراعی، تنها متغیر عملکرد کاه با بار کانونی ۰/۳۳۶ همبستگی معنی‌داری با تابع کانونی اول داشت. در پیش‌بینی واریانس متغیر صفات زراعی، سهم متغیر سرعت رشد نسبی کالوس ۴۲ درصد و رشد نسبی کالوس ۳۲ درصد است. در پیش‌بینی واریانس صفات کشت بافت سهم متغیر عملکرد کاه ۱۲ درصد می‌باشد (جدول ۸). در مطالعه‌ای در رابطه با تجزیه همبستگی کانونی صفات رشدی و صفات مرتبط با عملکرد دانه ژنوتیپ‌های مختلف گندم نان تحت تنش رطوبتی پس از گلدهی، نتایج نشان داد که در شرایط مزرعه در بین متغیرهای رشدی، سرعت رشد رویشی (۰/۸۲۱) همبستگی مثبت و بالایی با تابع کانونی مربوط به اجزای عملکرد (V1) داشت. همبستگی سرعت پر شدن دانه در حد متوسط ولی همبستگی طول دوره پر شدن دانه منفی و ناچیز بود. در بین متغیرهای عملکرد و اجزای عملکرد همبستگی مثبت و بالایی بین عملکرد دانه (۰/۹۳۱) با تابع کانونی مربوط به صفات رشدی (W1) وجود داشت که در تطابق با نتایج حاصل از این پژوهش از نظر صفات به کار برده می‌باشد (Tahmasebpour et al., 2021a).

توجه به نتایج حاصل، تابع W_1 به ترتیب تحت تأثیر شاخص برداشت (HI)، سرعت پر شدن دانه (RFS)، طول اکستراژن (XL)، سرعت رشد رویشی (RVS)، نسبت پدانکل به ارتفاع (PL/PH)، طول سایر میانگره‌ها (OIL)، دوره پر شدن دانه (SFP)، عملکرد دانه (GY)، تعداد دانه در سنبله (NSPS)، تعداد سنبلچه در سنبله (NSS)، وزن دانه در سنبله (SGW)، عملکرد چف (Chaff)، وزن هزار دانه (TSW) و تعداد سنبله در متر مربع (NSP) و تابع V_1 به ترتیب تحت تأثیر سرعت رشد نسبی کالوس (RGR)، رشد نسبی کالوس (RFWG)، قطر کالوس (DC)، سرعت رشد کالوس (CGR) و محتوی آب نسبی کالوس (RWC) می‌باشد. از این رو، گیاهان دارای مقادیر بالاتر عملکرد دانه، طول اکستراژن، وزن دانه در سنبله، دوره پر شدن دانه و سرعت پر شدن دانه دارای قطر کالوس بالاتری نیز هستند و از طرفی ژنوتیپ‌هایی با عملکرد چف، وزن هزار دانه، شاخص برداشت و سرعت رشد رویشی بالاتر، سرعت رشد کالوس بیشتری هم دارند، به عبارتی این متغیرها، از متغیرهای تأثیرگذار بر متغیرهای کانونی در هر گروه از صفات اعم از کشت بافت و مزرعه‌ای می‌باشند. در پژوهشی به منظور به‌کارگیری تجزیه همبستگی کانونی برای بهبود عملکرد دانه ژنوتیپ‌های گندم از طریق گزینش غیرمستقیم تحت شرایط دیم، در بررسی ارتباط بین متغیرهای کانونی با متغیرهای اصلی چنین گزارش شد، متغیرهایی که در سال اول آزمایش بیشترین تأثیر را در ارتباط بین دو دسته متغیر داشتند به عنوان مثال عملکرد دانه (۰/۸۳)، روز تا رسیدگی (۰/۴۳) و روز تا سنبله‌دهی (۰/۴۰-) بودند و در سال دوم

جدول ۷. همبستگی‌های کانونی و سطح احتمال معنی‌دار بودن آن‌ها در شرایط دیم و آبیاری

سطح احتمال F	مقدار تقریبی F	ویلیکس لمبدا	مقادیر ویژه	همبستگی کانونی	متغیر کانونی
۰/۰۱**	۳/۲۵۹	۰	۲۵۶۵۸/۶۰۸	۱	۱
۰/۶۳۹	۰/۹۰۱	۰	۱۶/۹۴	۰/۹۷۲	۲
۰/۷۱۱	۰/۸۲۵	۰/۰۰۲	۱۳/۳۸۲	۰/۹۶۵	۳
۰/۸۸۴	۰/۶۱۶	۰/۰۳۲	۳/۰۵۷	۰/۸۶۸	۴
۰/۸۳۳	۰/۶۳۶	۰/۱۲۹	۲/۳۸۸	۰/۸۴	۵
۰/۷۹۹	۰/۵۹۲	۰/۴۳۸	۱/۲۸۲	۰/۷۵	۶
۰/۰۰۴**	۴/۰۲۶	۰	۱۵۳۴۶/۳۰۷	۱	۱
۰/۲۷۳	۱/۳۴۶	۰	۱۰۸/۸۹۷	۰/۹۹۵	۲
۰/۷۴۵	۰/۷۹۲	۰/۰۰۳	۲۰/۳۹۴	۰/۹۷۶	۳
۰/۹۶۸	۰/۴۷۱	۰/۰۵۴	۴/۸۶۸	۰/۹۱۱	۴
۰/۹۹۶	۰/۲۷۹	۰/۳۱۶	۱/۲۱	۰/۷۴	۵
۰/۹۹۳	۰/۲۰۰	۰/۶۹۷	۰/۴۳۴	۰/۵۵	۶

دیم

آبیاری

جدول ۸. ضرایب همبستگی کانونیک صفات کشت بافت و صفات زراعی در شرایط دیم

کانون ۳		کانون ۲		کانون ۱		صفات	متغیرهای تحقیق
ضرایب استاندارد	بارهای کانونی	ضرایب استاندارد	بارهای کانونی	ضرایب استاندارد	بارهای کانونی		
-۰/۳۳۵	-۰/۴۲۷	۰/۱۸۶	۱/۵۴	-۰/۳۵۸	-۲/۱۲۴	قطر کالوس	صفات کشت بافت
۰/۱۶۴	۱/۵۸	-۰/۱۹۴	-۰/۵۰۶	-۰/۴۹۹	۰/۰۷۸	وزن تر کالوس	
-۰/۳۳۲	-۱/۰۳۷	۰/۱۹۸	-۰/۶۳۷	-۰/۲۹۵	۱/۶۷۷	سرعت رشد کالوس	
-۰/۲۸۳	-۲/۰۸۷	-۰/۷۶۵	-۲/۴۴۸	-۰/۵۶۲	۳/۵۶	رشد نسبی کالوس	
-۰/۲۳۳	۱/۳۶۲	-۰/۷۲۲	۱/۷۱	-۰/۶۴۵	-۴/۰۳۳	سرعت رشد نسبی کالوس	
۰/۱۸۲	-۰/۱۰۹	۰/۲۰۲	۰/۵۱۶	-۰/۳۱۴	-۰/۵۵۲	محتوی آب نسبی کالوس	
-۰/۰۳۷	-۱/۴۱۹	۰/۳۶۲	۲/۰۰۴	۰/۰۳۶	-۱/۱۹۶	عملکرد دانه	صفات زراعی
-۰/۱۶۹	-۰/۳۵۸	-۰/۳۴۷	-۰/۹۲۹	۰/۰۸۱	۰/۴۵۶	وزن هکتولتر	
۰/۲۹۷	-۰/۱۴۲	۰/۵۵۷	۰/۸۳۶	-۰/۰۳۹	۰/۶۹۱	وزن هزار دانه	
-۰/۱۲۴	-۰/۷۵۳	۰/۰۱۵	-۰/۱۳	۰/۱۶۶	۱/۰۴۴	تعداد دانه در سنبله	
-۰/۰۹۷	-۰/۵۰۷	-۰/۰۱۷	۰/۳۵۸	-۰/۰۸۶	۰/۶۱۸	تعداد سنبله در متر مربع	
-۰/۰۶۷	-۰/۳۵۳	۰/۲۱۹	-۰/۲۹۳	۰/۱۴۹	۰/۷۶۲	عملکرد چف	
-۰/۴۴۸	-۰/۶۵۷	۰/۰۲۶	-۰/۱۸۲	۰/۳۳۶	۰/۳۷	عملکرد کاه	
-۰/۲۱۷	۰/۷۹۲	-۰/۰۲۶	-۰/۳۶۵	-۰/۱۱۱	-۱/۹۶۳	طول اکستراژن	
۰/۴۳۳	-۰/۷۶۶	-۰/۰۲۵	-۰/۶۴۶	۰/۲۲۱	۱/۶۲۸	طول سایر میانگره‌ها	
-۰/۱۶	-۰/۲۹۸	۰/۳۴۸	-۰/۳۰۸	۰/۲۵۸	۰/۹۶۱	تعداد سنبله در سنبله	
-۰/۰۸۱	-۱/۲۳۳	۰/۱۷۵	-۰/۱۶۵	۰/۱۷۵	۰/۴۰۵	وزن خشک ساقه	
-۰/۰۲	-۰/۵۱۸	۰/۵۰۳	۰/۷۵۷	۰/۱۲۱	-۰/۸۰۲	وزن دانه در سنبله	
-۰/۴۷۶	-۰/۶۸۸	۰/۰۶۱	-۰/۰۵۶	-۰/۱۳۷	۱/۶۶۵	نسبت پدانکل به ارتفاع	
۰/۱۷۳	۱/۶۰۴	۰/۴۳۳	-۱/۸۱۱	-۰/۰۶۲	۳/۵۱۷	شاخص برداشت	
۰/۳۸۸	-۰/۴۱۲	۰/۱۱۳	-۰/۲۱۳	-۰/۰۴۱	-۰/۲۹۵	روز تا سنبله‌دهی	
-۰/۱۶۴	۰/۰۳	-۰/۰۴۹	-۰/۶۲۹	-۰/۲۴۸	-۱/۴۹۲	دوره پر شدن دانه	
-۰/۲۵۶	۰/۹۹۳	۰/۰۷۸	-۱/۲۸۲	۰/۱۷۸	۱/۸۰۶	سرعت رشد رویشی	
۰/۰۶۲	-۰/۸۴۳	۰/۵۱۷	-۰/۱۰۸	۰/۱۱۱	-۳/۴۶۱	سرعت پر شدن دانه	

رابطه ۶)

$$V1 = 2/518 DC + 0/541 FWC - 2/486 CGR - 2/329 RFWG + 2/161 RGR + 0/85 RWC$$

با توجه به نتایج حاصل، تابع W_1 بیشتر تحت تأثیر به ترتیب، شاخص برداشت (HI)، وزن هزار دانه (TSW)، وزن دانه در سنبله (SGW)، عملکرد دانه (GY)، عملکرد کاه (Chaff)، طول اکستراژن (XL)، دوره پر شدن دانه (SFP) و تعداد دانه در سنبله (NSPS) و تابع V_1 تحت تأثیر همه صفات کشت بافت شامل به ترتیب: قطر کالوس (DC)، سرعت رشد کالوس (CGR)، رشد نسبی کالوس (RFWG)، سرعت رشد نسبی کالوس (RGR)، محتوی آب نسبی کالوس (RWC) و وزن تر کالوس (FWC) می‌باشد. لذا گیاهان دارای مقادیر بالاتر عملکرد دانه و وزن دانه در سنبله در شرایط آبیاری از سرعت رشد کالوس بالاتری هم برخوردارند و گیاهان دارای وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله و شاخص برداشت بالاتر دارای قطر کالوس بیشتری هستند.

تجزیه همبستگی کانونیک در شرایط آبیاری: نتایج

همبستگی کانونی بین صفات کشت بافت با صفات مهم زراعی در شرایط آبی نشان داد آماره ویلکس لمدا در سطح احتمال یک درصد در ارتباط با تابع اول معنی‌دار بود که صد درصد از واریانس کل را توضیح داده است و نشان‌دهنده ارتباط بالا بین صفات کشت بافت و صفات زراعی می‌باشد (جدول ۷). در ترکیب خطی همبستگی و ارتباط بین دو سری صفت، ضرایب مربوط به صفات زراعی مهم (W_1) و صفات کشت بافت (V_1) به شکل زیر است:

رابطه ۵)

$$W1 = -1/199 GY + 0/19 HW + 1/863 TSW + 0/524 NSPS - 0/181 NSP - 0/096 Chaff + 1/013 SY + 1/013 XL - 0/482 OIL - 0/078 NSS - 0/068 StW - 1/27 SGW + 0/228 PL/PH + 2/222 HI + 0/414 DAS - 0/628 SFP - 0/481 RVS - 0/488 RFS$$

۰/۶۶۲ و ۰/۴۲۱ بیشترین همبستگی با تابع کانونی اول را داشتند، در بین صفات زراعی در شرایط آبیاری، هیچ یک از متغیرها همبستگی بالایی با تابع کانونی اول نداشتند. در پیش‌بینی واریانس متغیر صفات زراعی، سهم متغیر محتوی آب نسبی کالوس ۴۴ درصد و وزن تر کالوس ۱۸ درصد است (جدول ۹). در تحقیقی به منظور بررسی تجزیه کانونیک صفات فیزیولوژیک با صفات فنولوژیک و ریشه‌ای در ژنوتیپ‌های مختلف گندم نان، نتایج همبستگی بین متغیرهای اندازه‌گیری شده یک گروه با توابع کانونیک گروه دیگر نشان داد که در شرایط مزرعه، در بین متغیرهای فنولوژیک، صفات تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (**۰/۸۳۵)، سرعت پر شدن دانه (**۰/۸۱۳) و طول دوره پر شدن دانه (**۰/۷۱۴-) همبستگی معنی‌داری با تابع کانونیک مربوط به صفات فیزیولوژیک داشتند، ولی سرعت رشد رویشی دارای همبستگی مثبت و غیر معنی‌دار بود (Tahmasebpour et al., 2020).

مطالعه‌ای با هدف بررسی تجزیه همبستگی کانونیک صفات فنولوژیک و سایر صفات مرتبط با عملکرد دانه در ژنوتیپ‌های مختلف گندم تحت شرایط آبیاری طبیعی و تنش رطوبتی پس از گلدهی، نتایج حاصل از همبستگی ساختاری بین متغیرهای اندازه‌گیری شده یک گروه با توابع کانونیک مربوط به همان گروه در شرایط طبیعی در مزرعه نشان داد که، در بین متغیرهای اجزای عملکرد، همبستگی مثبت و متوسط وزن دانه در سنبله (۰/۵۸۴) و تعداد دانه در سنبله (۰/۵۲۹) با تابع کانونیک (V₁) مشاهده شد، ولی بقیه اجزای دارای همبستگی پایین بودند (Tahmasebpour et al., 2021a).

همبستگی بین متغیرهای اندازه‌گیری شده یک گروه با توابع کانونی مربوط به همان گروه در جدول ۹ آمده است. نتایج این ارزیابی نشان داد که در بین صفات کشت بافت، متغیرهای محتوی آب نسبی کالوس و وزن تر کالوس با بارهای کانونی به ترتیب

جدول ۹. ضرایب همبستگی کانونیک صفات کشت بافت و صفات زراعی در شرایط آبیاری

متغیرهای تحقیق	صفات	کانون ۱		کانون ۲		کانون ۳		
		ضرایب استاندارد	بارهای کانونی	ضرایب استاندارد	بارهای کانونی	ضرایب استاندارد	بارهای کانونی	
صفات کشت بافت	قطر کالوس	۲/۵۱۸	۰/۱۴۶	۲/۲۹	-۰/۴۸	۱/۱۸	۰/۵۱۲	
	وزن تر کالوس	۰/۵۴۱	۰/۴۲۱	-۱/۲۳۱	-۰/۷۵۱	-۰/۲۷۳	۰/۰۶۶	
	سرعت رشد کالوس	-۲/۴۸۶	۰/۱۰۵	-۱/۸۷۱	-۰/۵۴۳	-۰/۲۶۱	۰/۵۲۴	
	رشد نسبی کالوس	-۲/۳۲۹	۰/۱۷۱	-۳/۲۲	-۰/۲۱۸	-۱/۴۶۵	-۰/۷۰۶	
	سرعت رشد نسبی کالوس	۲/۱۶۱	۰/۲۳۱	۳/۴۵۱	-۰/۱۶۶	۰/۶۸۱	-۰/۶۷۷	
	محتوی آب نسبی کالوس	۰/۸۵	۰/۶۶۲	۰/۲۰۲	۰/۱۳۴	۰/۰۹۵	-۰/۲۴	
	صفات زراعی	عملکرد دانه	-۱/۱۹۹	۰/۰۳۵	۱/۶۱۷	-۰/۱۴۸	-۰/۲۲۳	۰/۵۸۴
		وزن هکتولیتتر	۰/۰۱۹	۰/۱۲۹	۰/۶۵	۰/۱۹	-۰/۰۸۸	-۰/۳۹۲
		وزن هزار دانه	۱/۸۶۳	۰/۲۵۹	-۳/۴۳۵	-۰/۱۳۴	-۰/۶۲۵	۰/۸۱
		تعداد دانه در سنبله	۰/۵۲۴	-۰/۰۵۳	-۲/۰۹۸	۰/۱۱۸	-۰/۰۹۶	۰/۲۴۶
تعداد سنبله در متر مربع		-۰/۱۸۱	-۰/۱۶۸	-۰/۷۱۷	۰/۲۸۱	-۰/۰۳۹	-۰/۰۳۷	
عملکرد چف		-۰/۰۹۶	-۰/۲۲۴	۰/۲۱۱	-۰/۲۴۹	-۰/۰۴۱	۰/۰۸۴	
عملکرد کاه		۱/۰۱۳	۰/۱۲۹	۱/۶۳۹	۰/۰۷۵	-۰/۰۵۲	۰/۰۲۵	
طول اکستراژن		۱/۰۱۳	۰/۲۲۴	۰/۳۲۳	-۰/۰۶۳	-۰/۰۸۵۱	-۰/۴۳۶	
طول سایر میانگره‌ها		-۰/۴۸۲	۰/۰۳۵	-۲/۶۱۳	-۰/۴۱۲	-۰/۲۲۸	۰/۰۴۱	
تعداد سنبله در سنبله		-۰/۰۷۸	-۰/۱۴۷	-۰/۳۳۸	-۰/۰۷۵	-۰/۰۳۳	۰/۵۳۸	
صفات زراعی	وزن خشک ساقه	-۰/۰۶۸	۰/۱۰۶	۱/۲۵۴	-۰/۱۴۸	۰/۹۹۱	۰/۴۸۵	
	وزن دانه در سنبله	-۱/۲۷	۰/۰۷۸	۲/۰۶۲	-۰/۰۸	-۰/۱۲۶	۰/۷۲۱	
	نسبت پدانکل به ارتفاع	۰/۲۲۸	-۰/۰۶۸	-۲/۱۹۲	۰/۰۳۹	-۰/۲۳۵	-۰/۳۲۹	
	شاخص برداشت	۲/۲۲۲	۰/۰۵۶	۱/۱۶۶	-۰/۱۱۷	-۰/۰۵۶۵	۰/۶۰۳	
	روز تا سنبله‌دهی	۰/۴۱۴	۰/۱۴	۱/۱۹۷	۰/۰۳۵	-۰/۳۳۳	-۰/۱۳۹	
	دوره پر شدن دانه	-۰/۶۲۸	-۰/۲۱۲	۱/۰۸۴	۰/۲۸۴	-۰/۱۹۸	۰/۲۹۱	
	سرعت رشد رویشی	-۰/۴۸۱	۰/۰۶	-۱/۸۳۳	۰/۰۹	-۰/۵۸۷	۰/۵۳۲	
	سرعت پر شدن دانه	-۰/۴۸۸	-۰/۰۲۹	۰/۴۶۹	-۰/۱۲۸	-۰/۴۶۴	۰/۵۵۸	

نتیجه‌گیری

حاکمی از وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات زراعی و کشت بافت مورد مطالعه است. با توجه به نتایج بدست آمده در شرایط دیم، گیاهان دارای مقادیر بالاتر عملکرد دانه، طول اکستراژن، وزن دانه در سنبله، دوره پر شدن دانه و سرعت پر شدن دانه دارای قطر کالوس بالاتری هستند و از طرفی ژنوتیپ‌هایی با عملکرد چف، وزن هزار دانه، شاخص برداشت و سرعت رشد رویشی بالاتر سرعت رشد کالوس بیشتری هم دارند. در شرایط آبیاری، گیاهان دارای مقادیر بالاتر عملکرد دانه و وزن دانه در سنبله از سرعت رشد کالوس بالاتری هم برخوردارند و گیاهان دارای وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله و شاخص برداشت بالاتر دارای قطر کالوس بیشتری هستند. این نتایج می‌تواند بر کنترل ژنتیکی مشترک این دو گروه از صفات و امکان غربال مستقیم ژنوتیپ‌های دارای صفات کشت بافتی مناسب از طریق صفات زراعی که انتخاب آنها آسان و سریع است، دلالت داشته باشد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که در این آزمایش صفات معرفی شده به عنوان معیارهای گزینشی جهت گزینش ارقام در شرایط این ویوو و این ویترو مفید هستند و اهمیت تجزیه علیت و تجزیه همبستگی کانونیک به منظور درک ارتباط بین صفات کشت بافت و زراعی در گندم نان را نشان داد. همچنین کشت جنین‌های بالغ روش مناسبی برای کشت بافت در گیاه گندم تشخیص داده شد و در نتیجه جنین بالغ می‌تواند به عنوان یک منبع ریزنمونه مؤثر در برنامه‌های اصلاحی و مطالعات گندم مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج جهت در اختیار قرار دادن بذره‌های این پژوهش تقدیر و تشکر می‌گردد.

در این پژوهش نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در شرایط کشت بافت بین تمامی صفات بررسی شده به جز درصد محتوی آب نسبی کالوس و همچنین در شرایط مزرعه تحت شرایط دیم، برای تمامی صفات به استثنای تعداد سنبله در متر مربع، عملکرد کاه، نسبت پدانکل به ارتفاع و سرعت رشد رویشی و تحت شرایط آبیاری برای اکثر صفات به جز وزن هکتولتر، تعداد سنبله در متر مربع، عملکرد چف، عملکرد کاه، نسبت پدانکل به ارتفاع و سرعت رشد رویشی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد دیده شد. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای می‌توان بیان داشت که ژنوتیپ‌های شماره ۱۵ (WC-47638)، ۶ (WC-4840)، ۱۳ (WC-5001)، ۱۸ (WC-47569) و رقم پیش‌تاز به طور مشترک در هر دو شرایط برتر بودند. در نهایت براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین و تجزیه خوشه‌ای در شرایط کشت بافت می‌توان ژنوتیپ شماره ۵ (WC-4965) را ژنوتیپ برتر در این آزمایش معرفی کرد و تأثیر ژنوتیپ را در القاء کالوس معنی‌دار اعلام نمود. بر اساس نتایج تجزیه علیت صفات کشت بافتی با صفات زراعی، به ترتیب صفات وزن هزار دانه، تعداد دانه در سنبله، سرعت رشد رویشی، طول سایر میانگره‌ها، تعداد سنبله در متر مربع، وزن دانه در سنبله و روز تا سنبله‌دهی در شرایط آبیاری بیشترین اثر مستقیم را بر صفات کشت بافت دارند. می‌توان چنین استنباط کرد که در شرایط آبی، گیاه حداکثر کارایی ژنتیکی خود را نشان می‌دهد، بنابراین در این پژوهش ارتباط صفات کشت بافت با صفات زراعی در شرایط آبیاری بسیار معقول و منطقی است. نتایج تجزیه همبستگی کانونیک نشان داد که معنی‌دار شدن آماره ویلکس لمدا در سطح احتمال یک درصد در ارتباط با تابع اول،

References

- Abbasi, M. & Mohammadi, R. (2023). Response of durum wheat mature embryo to callus induction and salt stress in vitro condition. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 2 (2), 190-208.
- Akbari, L., Cheghamirza, K. & Farshadfar, E. (2023). Investigation Callus Induction and Regeneration via Immature Embryo Culture to in vitro in Durum Wheat. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 2 (2), 209-220.
- Allen, A. M., Winfield, M. O., Burridge, A. J., Downie, R. C., Benbow, H. R., Barker, G. L., Wilkinson, P. A., Coghill, J., Waterfall, C., Davassi, A., Scpes, G., Pirani, A., Webster, T., Brew, F., Bloor, C., Griffiths, S., Bentley, A. R., Alda, M., Jack, P., Phillips, A. L. & Edwards, K. J. (2017). Characterization of a wheat breeders' array suitable for high-throughput SNP genotyping of global accessions of hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Biotechnology Journal*, 15, 390-401.
- Aparna, S., Patel, K., Patel, S. & Pinto, S. (2015). Wheat and Its Application in Dairy Products, A Review. *Research & Reviews, Journal of Dairy Science and Technology*, 4 (2), 19-34.
- Araújo, M. C. R., Chagas, E. A., Vendrame, W., Ribeiro, M. I. G., Moura, E. A., Taveira, D. L.

- L., Chagas, P. C. & Grigio, M. L. (2021). Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 21 (2), 1-8.
- Ashish, Sethi, S. K., Vikram, Phougat, D. & Antim. (2020). Genetic variability, correlation and path analysis in bread wheat (*Triticum aestivum*) genotypes for yield and its contributing traits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9 (6), 388-391.
- Azizi Dargahlou, Sh., Dorani Uliaei, E. & Bandehagh, A. (2014). Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum*). The First International Congress and the 13th National Congress of Agronomy Science and Plant Breeding and & 3rd Iranian Congress of Seed Science and Technology Conference. pp. 1-3.
- Benlioglu, B., Koçak, N. & Avci Birsin, M. (2020). Response of some durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes on tissue culture parameters. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33 (1), 123-128.
- Bhaskaran, S. & Smith, R. H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture, a review. *Crop Science*, 30, 1328-1336.
- Birsin, A., Onde, M. S. & Ozgen, M. (2007). A comparison of callus and plant regeneration from mature embryos of oat (*Avena Sativa* L.). *Turkish Journal of Biology*, 25, 427-437.
- Bregitzer, P. & Campbell, R. D. (2001). Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley. *Crop Science*, 41, 173-179.
- Chen, J. Y., Yue, R. Q., Xu, H. X. & Chen, X. J. (2006). Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm supported culture. *Agricultural Science in China*, 5, 572-578.
- Dodig, D., Zoric, M., Mitic, N., Nikolic, R. & Surlan-Momirovic, G. (2008). Tissue culture and agronomic traits relationship in wheat. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 95, 107-114.
- Errabii, T. ch., Bernard, J., Essalmani, G., Idaomar, M. & skali-senhaji, N. (2007). Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. *African Journal of Biotechnology*, 5 (16), 1488-1493.
- Farshadfar, A. (2018). Genetic modification of environmental stresses. Vosough Publications. First Edition, pp. 844.
- Gholami, A. A. & Tarinejad, A. (2017a). Callus induction and regeneration of bread wheat lines from coleoptile explants. *Journal Genetic Engineering Biosafety*, 5 (2), 101-112.
- Gholami, A. A. & Tarinejad, A. (2017b). Callus induction and regeneration of bread wheat cultivars and barley from mature embryo explants. *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 13 (3), 89-102.
- Golkar, P., Arzani, A. & Mirmohammadi Meybodis, A. M. (2008). Callus induction and plant regeneration from immature embryos of wheat cultivars. *Journal of Agriculture*, 9 (1), 39-50.
- Haliloglu, K., Ozturk, A., Tosun, M. & Bulut, S. (2005). Relationship between tissue culture and agronomic traits of winter wheat. *Cereal Research Communications*, 33 (2-3), 469-476.
- Halina, S., Grzegorz, G., Helena, P., Barbara, S., Marzena, P. K. & Joachimiak, A. J. (2013). The effect of genotype on a barley scutella culture Histological aspects. *Central European Journal of Biology*, 8 (1), 30-37.
- Hamze, H., Asghri, A., Mohammadi, S. A., Sofalian, O. & Mohammadi, S. (2020). Grouping of spring wheat recombinant inbred lines in term of phenological and partitioning of assimilates in normal and water deficit conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 12 (4), 989-1002.
- Haqua, M., Siddique, A. B. & Shahinul Islam, S. M. (2015). Effect of Silver Nitrate and Amino Acids on High Frequency Plants Regeneration in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Tissue Culture and Biotech*, 25 (1), 37-50.
- Henry, Y., Marcotte, J. L. & De Buyser, J. (1994). Chromosomal location of genes controlling short-term and long-term somatic embryogenesis in wheat revealed by immature embryo culture of aneuploid lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 344-350.
- Herrmann, M. (2007). A diallel analysis of various traits in winter triticale. *Plant Breeding*, 126, 19-23.
- Jaisi, S., Thapa, A. & Poudel, M. R. (2021). Study of correlation coefficient and path analysis among yield parameters of wheat, a review. *Inwascon Technology Magazine*, 3, 01-04.
- Johnson, R. A. & Wichern, D. W. (2002). *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice hall Upper Saddle River, New Jersey, USA. 5 (8), 808.
- Li, W., Ding, C. H., Hu, Z., Lu, W. & Guo, G. Q. (2003). Relationship between tissue culture and

- agronomic traits of spring wheat. *Plant Science*, 164, 1079-1085.
- Mohammadi, S., Aroiee, H., Aminifard, M. H. & Jahanbakhsh, V. (2012). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against strawberry grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45 (20), 2474-2484.
- Musavi, S. F., Siahpoosh, M. R. & Sorkheh, K. (2021). Influence of sowing date and terminal heat stress on phenological features and yield components of bread wheat genotypes. *Plant Productions*, 44 (2), 157-170.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *The Journal of Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Naderi, F., Bavandpori, F., Farshadfar, E. & Farshadfar, M. (2020). Screening and identification of drought tolerant bread wheat landraces (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Crop Ecophysiology*, 14 (2), 275-292.
- Naseri, R., Cheghamirza, K., Zarei, L. & Saroei, E. (2017a). Induced dedifferentiation of barley (*Hordeum vulgare* L.) embryonic cells and its relationship with agronomic traits. *Cellular and Molecular Biology*, 63 (10), 11-19.
- Naseri Myankali, R., Cheghamirza, K., Zarei, L. & Saroei, E. (2017b). Evaluation of relationship between the associated traits with callus induction of mature embryo and agronomic traits in different barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.). *Cereal Research*, 7 (3), 421-435.
- Nazari, H., Golkari, S., Alavi Siney, S. M. & Namdari Geshnigani, A. 2022. Use of canonical correlation analysis to improve grain yield of wheat genotypes through indirect selection under rainfed conditions. *Iranian Dryland Agronomy Journal*, 10 (2), 183-198.
- Rabbani, B., Khoramivafa, M., Saeidi, M., Bagheri, M. & Zarei, L. 2022. Study the relationship between agronomical traits and mineral elements of grain in three genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) under effect of planting date and planting density. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 1 (3), 390-413.
- Rachana, P., Binju, M., Suprava, A., Bigyan K. C., Rishav, P., Rashmi, R., Bishnu, B., Pritika, N., Kushal, B. & Ram, P. M. (2021). Correlation and path coefficient analysis of yield in wheat, a review. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 5 (113), 121-127.
- Raykov, T. & Marcoulides, G. A. (2008). *An introduction to applied multivariate analysis*. Routledge/Psych Press. 498 p.
- Soleimani Fard, A. & Naseri, R. (2020). Evaluation of relationships between grain yield and agro-physiological traits of bread wheat genotypes under rainfed conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 13 (3), 701-714.
- Suleiman, A. A., Nganya, J. F. & Ashraf M. A. (2014). Correlation and path analysis of yield and yield components in some cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L) in Khartoum State, Sudan. *Journal of Forest Products and Industries*, 3 (6), 221-228.
- Tahmasebpour, B., Jahanbakhsh Godehkahriz, S., Tarinejad, A. R. & Raeesi Sadati, S. Y. (2020). Analysis of canonical correlation of physiological traits with phenological and root traits in different bread wheat genotypes. *Cereal Research*, 10 (2), 167-180.
- Tahmasebpour, B., Jahanbakhsh, S., Tarinejad, A., Mohammadi, H. & Ebadi, A. (2021a). Canonical correlation analysis of phenological and other traits related to grain yield in different wheat genotypes under normal irrigation and stressed conditions at flowering time. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 52 (2), 121-132.
- Tahmasebpour, B., Jahanbakhsh, S., Tarinejad, A., Mohammadi, H. & Ebadi, A. (2021b). Canonical Correlation Analysis of Growth and Grain Yield Traits in Different Bread Wheat Genotypes under Stress Conditions at Flowering Time. *Plant Production Technology*, 13 (1), 119-134.

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the growth and phytochemical characteristics in the *in vitro* cultivation of *Nitraria schoberi* under salt stress

Hamideh Khalaj¹, Nasim Zarinpanjeh^{2*}, Mojtaba Askarizadeh¹, Hadi Kalantari Khalilabad², Javad Shahghaghi³

¹Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

²Medicinal Plants Research Center, Institute of medicinal plants, ACECR, Karaj, Iran.

³Department of Plant Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Karaj, Iran.

Correspondence

Nasim Zarinpanjeh

Email: zarinpanjeh@imp.ac.ir

How to cite

Khalaj, H., Zarinpanjeh, N., Askarizadeh, M., Kalantari Khalilabad, M., & Shahghaghi, J. (2023). Investigating the growth and phytochemical characteristics in the *in vitro* culture of *Nitraria schoberi* under salt stress. *Crop Biotechnology*, 12(42), 37-47.

ABSTRACT

To investigate the effect of salt stress on the growth and phytochemical characteristics in the *in vitro* cultivation of *Nitraria schoberi*, an experiment was conducted in the form of a factorial design with a completely random basis. The treatments included different concentrations of sodium chloride (0, 50 and 100 mM) and sodium sulfate (0, 10 and 20 mM). First, the seeds were germinated *in vitro* and then the cotyledon leaves with the hypocotyl of germinated seeds were placed as explants in MS cultivation environment with 2 mg/L BAP, 0.5 mg/L IBA, and the mentioned treatments. The explants were placed in the growth room under the conditions of 16 hours of light and 8 hours of darkness at a temperature of 25±2. After 4 weeks, stem length, number of leaves, and total phenol and flavonoids were measured. The results of variance analysis showed that different levels of salt have a significant effect (at the 99% level) on the growth indices of seedlings such as the length of the stem and the number of leaves, as well as on the total amount of phenol and flavonoid in the tissue of leaves. Based on comparisons, the maximum length of the stem (4.3 cm) and the number of leaves (5.5) related to the cultivation environment without salt and the highest amount of total phenol (35.37 mg/g) and flavonoid (24.6 mg/g) related to the cultivation environment containing 50 mM sodium chloride with 10 mM sodium sulfate.

KEYWORDS

Sodium Sulfate, total Flavonoid, total Phenol, Sodium Chloride, *Nitraria schoberi*.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی در کشت درون شیشه‌ای *Nitraria schoberi* تحت تنش شوری

حمیده خلیج^۱، نسیم زرین پنجه^{۲*}، مجتبی عسکری زاده^۱، هادی کلانتری خلیل آباد^۲، جواد شقاقی^۳

چکیده

به منظور بررسی اثر تنش شوری بر خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه قره‌داغ (*Nitraria schoberi*) آزمایشی در قالب طرح فاکتوریل با پایه کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارها شامل غلظت‌های مختلف کلرید سدیم (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و سولفات سدیم (۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) بود. ابتدا بذرها در شرایط درون شیشه‌ای جوانه دار شدند و سپس قسمت‌های برگ‌های کوتیلدونی به همراه هیپوکوتیل بذرها جوانه زده به عنوان ریزنمونه در محیط کشت MS به همراه ۲ میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA و تیمارهای ذکر شده قرار گرفتند. ریزنمونه‌های آماده شده در اتاق رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی دمای 25 ± 2 قرار داده شدند. پس از ۴ هفته طول ساقه، تعداد برگ و میزان فنل و فلاونوئید کل اندازه گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که سطوح مختلف نمک بر شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها چون طول ساقه و تعداد برگ‌ها و همینطور بر میزان فنل و فلاونوئید کل موجود در بافت برگ‌ها تاثیر معنی‌داری (در سطح ۹۹ درصد) دارد. بر اساس مقایسات میانگین بیشترین طول ساقه (۴/۳ سانتی متر) و تعداد برگ (۵/۵) مربوط به محیط کشت فاقد نمک و بیشترین میزان فنل کل (۳۵/۳۷ میلی گرم در گرم) و فلاونوئید کل (۲۴/۶ میلی گرم در گرم) مربوط به محیط کشت حاوی ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به همراه ۱۰ میلی‌مولار سولفات سدیم بوده است.

واژه‌های کلیدی

سولفات سدیم، فلاونوئید کل، فنل کل، کلرید سدیم، قره‌داغ (*Nitraria schoberi*).

^۱گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
^۲مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران.
^۳گروه بانک گیاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:

نسیم زرین پنجه

رایانامه: zarinpanjeh@imp.ac.ir

استناد به این مقاله:

خلیج، حمیده، زرین پنجه، نسیم، عسکری زاده، مجتبی، کلانتری خلیل آباد، هادی و شقاقی، جواد (۱۴۰۲). بررسی خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی در کشت درون شیشه‌ای گیاه قره‌داغ تحت تنش شوری. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۲): ۱-۱۳.

مقدمه

شرایط محیط رشد گیاهان دارویی بر میزان و کیفیت متابولیت‌های ثانویه آنها تأثیر زیادی دارند و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و مسیرهای متابولیکی متناظر با آنها به شدت با شرایط رشد گیاهی ارتباط دارد (behdad et al., 2020). تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و سرما می‌توانند تأثیرات منفی بر تولیدات گیاهی داشته باشند و حتی بقای گیاه را تهدید کنند (Boyer, 1982). شوری یکی از عوامل محیطی است که با تأثیر بر روی بیشتر فعالیت‌های مرفوفیزیولوژیکی، رشد و نمو گیاه را تغییر می‌دهد. شوری با تأثیر بر روی جذب عناصر مختلف نظیر فسفر، پتاسیم و نیترات سبب کاهش رشد گیاه می‌شود (Iraji Mareshk and Moghaddam, 2021). با توجه به توسعه شوری در اراضی کشاورزی و وجود منابع آب شور، لزوم تعیین حد تحمل به شوری گیاهان مختلف به ویژه گیاهان دارویی ضروری است و استفاده از گیاهان متحمل به شوری به عنوان یک عامل مدیریتی در شرایط آب یا خاک شور توصیه می‌شود. گیاه دارویی قره‌داغ (*Nitraria schoberi* L.) از گیاهان دارویی بسیار مفید و مقاوم به تنش شوری است.

قره‌داغ از جنس *Nitraria* و از خانواده zygothymaceae می‌باشد. به دلیل تحمل بالای گونه‌های جنس *Nitraria* به شرایط خشکی و شوری، این گیاه در جهت کاهش اثرات شوری خاک و همینطور تثبیت شن‌های روان بسیار ارزشمند می‌باشد (Zhao et al., 2002). تحقیقات بسیاری نشان داده است که گونه قره‌داغ دارای خواص دارویی گسترده‌ای چون خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد التهابی و ضد ویروسی می‌باشد (Sharifi-Rad et al., 2014; Zheleznichenko et al., 2018). واژه ایستور در گیاهان به موادی اطلاق می‌شود که منجر به پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک و در نهایت تجمع فیتوالکسین‌ها می‌شود. ایستورها بر اساس طبیعتشان به ایستورهای زیستی و غیرزیستی و بر اساس منشاشان به ایستورهای درونی و بیرونی طبقه بندی می‌شوند (Angelova et al., 2006). استفاده از ایستورها یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه است (Patel et al., 2013). با این حال، دسترسی به این ترکیبات در گیاهان، اغلب با مشکلاتی روبرو است. سیستم‌های کشت سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که اهمیت تجاری در صنایع غذایی و دارویی دارند قابل جایگزینی می‌باشند. در تحقیق علی و همکاران

(۲۰۱۸) تأثیر ایستورها بر روی میزان فنل و فلاونوئید کل در بافت کالوس گیاه *Zingiber officinale* Rosc مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که تیمار کالوس با ایستور تفاوت معنی داری را در سطح احتمال ۹۵ درصد بر میزان ترکیبات فنلی کل نشان داد. در زمینه کاربرد ایستور در افزایش میزان فنل و فلاونوئید کل در گیاه قره‌داغ، پژوهشی توسط رفیعی و همکاران (۲۰۲۲) انجام گرفت. کالوس‌های به دست آمده در کشت سوسپانسیون سلولی با ایستورهای اسیدسالسیلیک و نمک طعام تیمار شدند. نتایج حاکی از سودمند بودن این روش زیست‌فناورانه در افزایش تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی بوده است.

از آنجایی که تنش‌های محیطی و بویژه تنش شوری یکی از موانع اصلی در کاهش تولید محصولات گیاهان دارویی در بسیاری از نقاط دنیا خصوصاً در مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران محسوب می‌شود، بنابراین بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید سدیم و سولفات سدیم بر میزان تولید فنل و فلاونوئید کل در کشت درون شیشه‌ای گیاه دارویی قره‌داغ انجام شد.

مواد و روش‌ها

گندزدایی سطحی و کشت درون شیشه‌ای بذور قره‌داغ

بذرهای گیاه قره‌داغ (*Nitraria schoberi*) ابتدا برای مدت ۵ ساعت زیر آب جاری شست و شو داده شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت درون آب مقطر استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی (یخچال) نگهداری شدند. سپس پوسته که در اثر خیس خوردن، نرم شده بودند با کمک مالش و حین شست و شو زیر آب جاری از بذر جدا شدند. بذرهای قره‌داغ برای مدت ۲۴ ساعت دیگر درون آب مقطر استریل و در یخچال نگهداری شدند. سپس با محلول ۷۰ درصد اتانل برای مدت ۱ دقیقه و متعاقباً با محلول ۰/۱ درصد هیپو کلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط استریل (زیر هود لامینار) ضد عفونی و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل، شستشو داده شدند. پس از انجام مراحل گندزدایی سطحی، با کمک انبر، شکاف کوچکی در بذر ایجاد گردید، بدون آنکه به جنین بذر آسیبی وارد گردد. سپس با استفاده از پنس اتوکلاو شده به صورت افقی در محیط کشت MS (Murashige and skoog, 1962) کشت داده شدند. بذرهای پس از استقرار در محیط کشت درون شیشه، در شرایط محیطی شامل شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با

اسید در آب تهیه شد. سپس در بالن‌های ۱۰ میلی لیتری، مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده سپس از محلول‌های استاندارد و نمونه که قبلاً تهیه شده، به مقدار ۱ میلی لیتر به هر بالن اضافه شد. در ادامه مقدار ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین - سیوکالتو هم به نمونه و هم به استاندارد اضافه گردید. محلول‌ها به خوبی هم زده شد و بعد از گذشت ۳ دقیقه، ۱ میلی لیتر از محلول ۲۰ درصد از کربنات سدیم که قبلاً تهیه شده بود به بالن‌های ۱۰ میلی لیتری واکنش اضافه گردید. بلافاصله بالن‌ها با آب مقطر به حجم رسانده شدند. در انتها بعد از گذشت زمان یک ساعت، جذب تمامی محلول‌های در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه UV خوانده شد. برای هر آزمایش سه تکرار انجام گرفت.

سنجش میزان فلاونوئید کل

ابتدا جهت رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد کوئرستین در آب تهیه شد. در بالن‌های ۱۰ میلی لیتری، مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده و از محلول‌های استاندارد و نمونه که قبلاً تهیه شده، به مقدار ۰/۵ میلی لیتر به هر بالن اضافه شد. سپس ۳۰۰ ماکرولیت از نیتريت سدیم ۵ درصد، ۳۰۰ ماکرولیت از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۲ میلی لیتر از NaOH یک نرمال اضافه شد. پس از آنکه محلول‌ها به خوبی هم زده شدند، بالن‌ها با آب مقطر به حجم رسانده شدند. در انتها جذب تمامی محلول‌های در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه UV خوانده شد. برای هر آزمایش سه تکرار انجام گرفت.

آنالیز داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار طراحی و انجام شد. برای محیط‌های کشت جامد برای هر تکرار چهار ریزنمونه در نظر گرفته شد. به منظور آنالیز داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS استفاده شد و تیمارها به کمک روش ANOVA و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد گروه بندی و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 رسم شدند.

نتایج

پس از گذشت چهار هفته از انتقال ریزنمونه‌ها که شامل کوتیلدون به همراه هیپوکوتیل حاصل از گیاهچه‌های جوانه زده قره‌داغ در شرایط

دمای 25 ± 2 و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس نگهداری شدند (Rafiee *et al.*, 2022).

اعمال تیمارهای مختلف شوری در کشت درون شیشه‌ای قره‌داغ

یک ماه پس از کشت بذرها در محیط جوانه زنی، بذرها جوانه زده و تبدیل به گیاهچه شدند. در مرحله بعدی، برگ‌های کوتیلدونی به همراه هیپوکوتیل (۱ سانتی متر) حاصل از گیاهچه‌های جوانه‌زده بر روی محیط کشت پایه MS به همراه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل BAP به میزان ۲ میلی گرم در لیتر و IBA به میزان ۰/۵ میلی گرم در لیتر (Kheirabadi *et al.*, 2020) همراه با نمک‌های کلرید سدیم (در غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) و سولفات سدیم (در غلظت‌های ۰، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) کشت داده شدند. در نهایت ریزنمونه‌های کشت شده در تیمارهای مختلف شوری در اتاق رشد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی دمای 25 ± 2 و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس به مدت ۴ هفته قرار داده شدند.

بررسی شاخص‌های رشدی

شاخص‌های طول ساقه و تعداد برگ گیاهچه‌های باززا شده در شرایط درون شیشه‌ای حدود ۸ هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت ساقه‌زایی با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شدند.

عصاره گیری از پودر بافت گیاه برای استخراج کامل

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

در این روش ابتدا، برگ‌های گیاه قره‌داغ پس از خارج شدن از محیط درون شیشه، در دمای ۳۰ درجه به مدت ۳ روز خشک شدند. برگ‌ها پس از خشک شدن با هاون چینی به صورت پودر درآمدند. مقدار ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به ۰/۵ گرم از پودر برگ اضافه شد و سپس به مدت نیم ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در دستگاه التراسونیک (مدل الما ۶۰ کیلو هرتز) قرار گرفتند. در نهایت محلول با کاغذ صافی صاف گردید.

سنجش میزان فنل کل

ابتدا جهت رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد گالیک



شکل ۱. ریزنمونه‌های قره‌داغ بعد از گذشت چهار هفته قرارگرفتن در غلظت کم شوری ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و ۱۰ میلی‌مولار سولفاتسدیم



شکل ۲. ریزنمونه‌های قره‌داغ بعد از گذشت چهار هفته قرارگرفتن در غلظت زیاد شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و ۲۰ میلی‌مولار سولفاتسدیم

درون شیشه‌ای بودند، میزان فنل کل آنها به روشی که در قسمت مواد و روش‌ها توضیح داده شده است، اندازه‌گیری شد. ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت بدون شوری و شوری ملایم یعنی ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و ۱۰ میلی‌مولار سولفاتسدیم سبز و شاداب بودند (شکل ۱). این در حالی است که ریزنمونه‌ها در غلظت‌های شوری زیاد یعنی در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌مول کلریدسدیم و ۲۰ میلی‌مولار سولفاتسدیم کاملاً زرد شدند (شکل ۲).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به طول نو ساقه (سانتی متر) نشان داد که اثر متقابل اعمال غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفاتسدیم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۱).

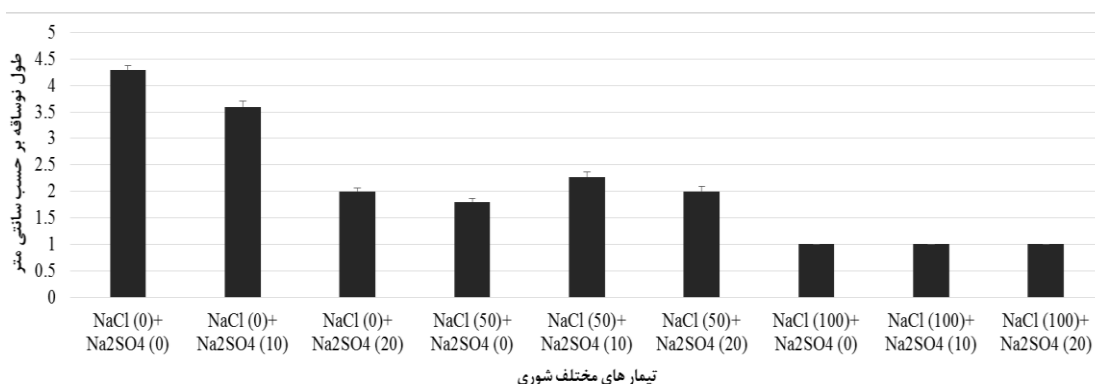
بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم × غلظت‌های مختلف سولفاتسدیم، بیشترین میانگین طول نوساقه (۴/۳ سانتی متر) گیاه قره‌داغ مربوط به تیمار بدون نمک در محیط کشت درون شیشه‌ای بود. همچنین کمترین میانگین طول نوساقه (۱ سانتی متر) مربوط به تیمارهای کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم با و بدون سولفاتسدیم بود (شکل ۳).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تعداد برگ نشان داد که اثر متقابل اعمال غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفاتسدیم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۲).

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفاتسدیم بر طول نو ساقه (سانتی متر)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
اثر کلریدسدیم	۲	۱۶/۳۷۵	۱۹۵۳/۰۳۳**
اثر سولفاتسدیم	۲	۱/۷۴۱	۲۰۸/۹۳۳**
اثر متقابل گندزدایی کلریدسدیم × سولفاتسدیم	۴	۲/۰۷۱	۲۴۸/۵۳۳**
خطای آزمایشی	۲۷	۰/۰۰۸	-

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۳. مقایسات میانگین تیمارهای مختلف شوری بر طول نوساقه (سانتی متر)

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفاتسدیم بر تعداد برگ

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۲۵۶/۵۰ **	۴۲/۷۵۰	۲	اثر کلریدسدیم
۱۸/۵۰ **	۳/۰۸۳	۲	اثر سولفاتسدیم
۳۸/۷۵۰ **	۶/۴۵۸	۴	اثر متقابل گندزدایی کلریدسدیم × سولفاتسدیم
-	۰/۱۶۷	۲۷	خطای آزمایشی

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

کل (۱۳/۱۵ میلی گرم در گرم) مربوط به تیمار کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۲۰ میلی‌مولار سولفاتسدیم بود (شکل ۵).

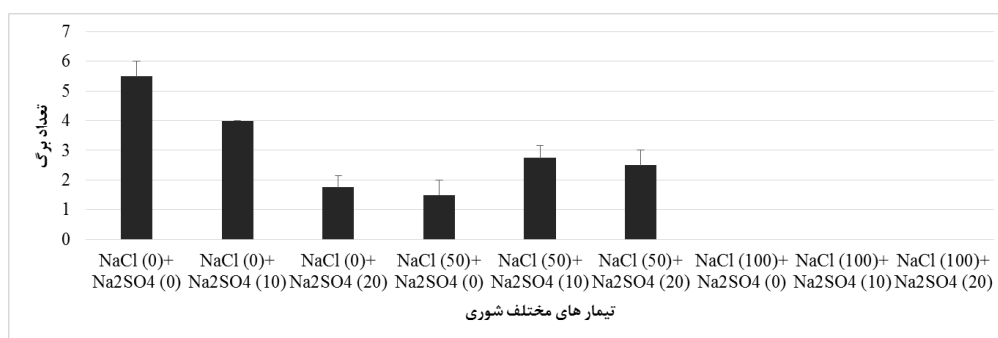
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان فلاونوئید کل ریزنمونه‌های قره‌داغ نشان داد که اثر متقابل اعمال غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفاتسدیم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۴).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم × غلظت‌های مختلف سولفاتسدیم، بیشترین میانگین فلاونوئید کل (۲۴/۶ میلی گرم در گرم) موجود در بافت برگ گیاه قره‌داغ مربوط بوده است به تیمار کاربرد ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۱۰ میلی‌مولار سولفاتسدیم در محیط کشت درون شیشه‌ای. همچنین کمترین میانگین فنل کل (۸/۱۷ میلی گرم در گرم) مربوط بوده است به تیمار کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۲۰ میلی‌مولار سولفاتسدیم (شکل ۶).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم × غلظت‌های مختلف سولفاتسدیم، بیشترین میانگین تعداد برگ (۵/۵) گیاه قره‌داغ مربوط به تیمار بدون نمک در محیط کشت درون شیشه‌ای بود. همچنین کمترین میانگین تعداد برگ (۰) مربوط به تیمارهای کاربرد ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم با و بدون سولفاتسدیم بود (شکل ۴).

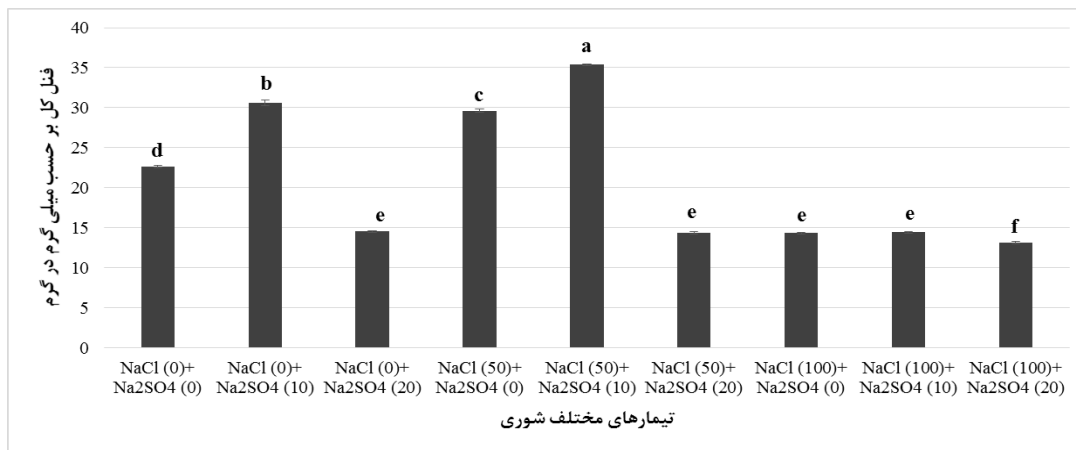
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان فنل کل ریزنمونه‌های قره‌داغ نشان داد که اثر متقابل اعمال غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفاتسدیم در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شده است (جدول ۳).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسات میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلریدسدیم × غلظت‌های مختلف سولفاتسدیم، بیشترین میانگین فنل کل (۳۵/۳۷ میلی گرم در گرم) موجود در بافت برگ گیاه قره‌داغ مربوط به تیمار کاربرد ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم به همراه ۱۰ میلی‌مولار سولفاتسدیم در محیط کشت درون شیشه‌ای بود. همچنین کمترین میانگین فنل

**شکل ۴.** مقایسات میانگین تیمارهای مختلف شوری بر تعداد برگ**جدول ۳.** تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفاتسدیم بر میزان فنل کل

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۱۴۲۳۹۸/۸۹۶ **	۴۸۹/۶۷۷	۲	اثر کلریدسدیم
۴۳۸۵/۱۷۲ **	۵۰۲/۸۴۳	۲	اثر سولفاتسدیم
۱۰۴۵۰۳/۰۷۵ **	۱۱۳/۹۶۸	۴	اثر متقابل گندزدایی کلریدسدیم × سولفاتسدیم
-	۰/۱۱۲	۲۷	خطای آزمایشی

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

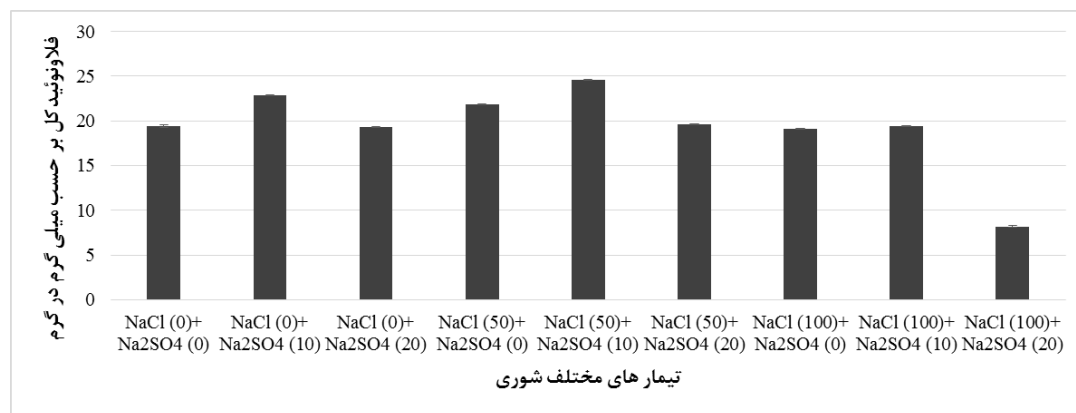


شکل ۵. مقایسات میانگین تیمارهای مختلف شوری بر میزان فنل کل

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلریدسدیم و سولفاتسدیم بر میزان فلاونوئید کل

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۷۴.۴۴۷/۶۵۰ **	۱۳۷/۴۷۱	۲	اثر کلریدسدیم
۷۵۳۶/۴۸۷**	۱۳۵/۳۷۵	۲	اثر سولفاتسدیم
۱۹۰۹/۸۸۸**	۳۴/۸۳۸	۴	اثر متقابل گذردایی کلریدسدیم × سولفاتسدیم
-	۰/۰۱۸	۲۷	خطای آزمایشی

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۶. مقایسات میانگین تیمارهای مختلف شوری بر میزان فلاونوئید کل

بسیاری از گونه‌های گیاهی مفید است که در نهایت به انتخاب صفات مطلوب در سلول و باززایی به گیاهان برتر منجر می‌شود (Rai et al., 2011). اگرچه تنش شوری به عنوان یک عامل موثر در کاهش عملکرد محصول در نظر گرفته می‌شود، ولیکن در بهبود کیفیت محصول نقش مثبت دارد (Rouphael, et al., 2018). تنش اسمزی ناشی از نمک منجر به اختلالات فیزیولوژیکی متعددی در گیاهان می‌شود، از جمله کمبود آب، عدم تعادل مواد مغذی، آسیب غشا، عدم تعادل هورمونی و آسیب اکسیداتیو (Hasanuzzaman et al., 2013) با این وجود، تنش

بحث

کشت بافت گیاهی، شرایط کنترل شده و مستقل از تغییرات محیطی برای رشد سریعتر گیاه و تولید و بازدهی بیشتر در سطح کمتر، در سیستم درون شیشه و در تمامی طول سال مهیا می‌سازد. از سوی دیگر روش کشت بافت تاکنون در بررسی مسیره‌های بیوسنتزی، بیوشیمیایی و آنزیمی، متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دارویی و مهم گیاهان، اثر عوامل مختلف همچون تنش‌های زیستی و غیر زیستی کاربرد زیادی داشته است. کشت‌های درون شیشه‌ای برای ارزیابی مقاومت به شوری در

فشار درون سلول را حفظ کنند. از طرف دیگر، افزایش میزان نمک می‌تواند منجر به تنش اکسیداتیو به دلیل تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) شود. برای مقابله با این پدیده، گیاهان ممکن است سنتز متابولیت‌های ثانویه با خواص آنتی‌اکسیدانی مانند پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و کاروتنوئیدها را افزایش دهند (Jogaiah *et al.*, 2013; Gill and Tuteja, 2010). البته توجه به این نکته مهم است که پاسخ به تنش شوری در بین گونه‌های مختلف گیاهی و حتی ارقام مختلف در یک گونه متفاوت است. برخی از گیاهان ممکن است تولید متابولیت‌های ثانویه خاص را در پاسخ به تنش شوری افزایش دهند، در حالی که برخی دیگر ممکن است تغییرات قابل توجهی را نشان ندهند (Kim *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2015). در تائید اینکه نمک‌ها می‌توانند به عنوان عامل مثبتی در افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان موثر واقع شوند، پژوهشی در رابطه با تاثیر کلریدسدیم از غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌مولار بر میزان فنل و فلاونوئید کل در سه گونه از کلم (Brassica) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، تیمار شوری، که یکی از عوامل تنش غیرزیستی است، باعث افزایش ترکیبات فنلی کل در گیاه شده است. بالاترین سطح فنل کل در کلم چینی و کلم سفید در گیاهان تیمار شده با ۱۰۰ میلی‌مولار نمک طعام مشاهده شد. در حالی که در کلم پیچ بیشترین میزان فنل کل با تیمار ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم حاصل شد (Samec *et al.*, 2021). شوری متوسط (۲۵-۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم) همچنین در جوانه‌های کلزا نیز بالاترین افزایش نسبی محتوای فنلی را نشان داده است (Falcinelli *et al.*, 2017). نتایج حاصل از اعمال تنش شوری از طریق کاربرد غلظت‌های ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم در کشت درون شیشه و گلدان گیاه *Ballota nigra* هم راستا با تحقیق حاضر بود و نشان داد که کاربرد شوری متوسط (۵۰ میلی‌مولار) می‌تواند محتوای فنل و فلاونوئید کل را افزایش دهد (Younessi-Hamzekhanlu *et al.*, 2021). در تحقیق دیگری، پاسخ به تنش شوری در گیاه دارویی *Stevia rebaudiana* طی کشت درون شیشه‌ای گزارش شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، علاوه بر افزایش قابل توجه‌ای در پارامترهای فیزیولوژیکی، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، در محتوای فنول و فلاونوئید کل نیز در طول فرآیند تشکیل شاخساره تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم مشاهده شده (Rathore *et al.*, 2014). در مطالعه دیگری، اثر NaCl، برای افزایش بیوسنتز و

شوری در سطوح متوسط، می‌تواند یک روش موثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی باشد (Ampofo and Ngadi, 2021). در مطالعات مختلفی مشخص شده است که شوری در بهبود خواص فیزیکی، ترکیبات طعم دهنده، ترکیبات فعال زیستی موثر می‌باشد. اثرات شوری بر گیاهان عبارتند از: (۱) تنش اسمزی ناشی از کمبود آب به علت افزایش غلظت نمک در محیط رشد و (۲) تنش خاص یونی که منجر به کمبود K⁺ به دلیل تغییر نسبت K⁺/Na⁺ می‌شود (Keisham *et al.*, 2018). تغییر نسبت K⁺/Na⁺ به دلیل افزایش هجوم Na⁺ تحت تنش شوری می‌باشد. کاهش Na⁺ در شاخساره، با حفظ هموستاز K⁺، جزء کلیدی تحمل به شوری در بسیاری از گیاهان است (Negrao *et al.*, 2017). تنش شوری با افزایش غلظت املاح در محیط رشد، می‌تواند منجر به توقف رشد در گیاهان شود. کلریدسدیم و سولفات سدیم قادرند رشد گیاه را به دلیل افزایش شوری در محیط مهار کنند. غلظت بالای نمک پتانسیل اسمزی محیط را کاهش داده و جذب آب را برای گیاهان دشوارتر می‌کند. این موضوع منجر به کاهش انبساط سلولی و در نهایت کندتر شدن رشد می‌گردد. سطوح بالای نمک می‌تواند منجر به کاهش طول ساقه شود که اغلب نتیجه تنش اسمزی است و جذب آب را محدود می‌کند؛ باعث پژمرده شدن و توقف رشد ساقه می‌شود. تنش شوری بیش از حد همچنین می‌تواند تعداد برگ‌های گیاه را کاهش دهد که به دلیل کاهش فعالیت فتوسنتزی می‌باشد، زیرا غلظت بالای نمک عملکرد کلروفیل را مختل کرده و منجر به زرد شدن برگ‌ها می‌گردد (Munns and Tester, 2008; Flowers and Colmer, 2008). هم‌راستا با مطالب ذکر شده، نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیشترین میزان شاخص‌های رشدی چون طول ساقه و تعداد برگ در محیط بدون نمک و تنش شوری به دست آمده است. شایان ذکر است، اگر چه کاربرد نمک‌های کلریدسدیم و سولفات سدیم در کشت درون شیشه‌ای گیاه قره‌داغ منجر به کاهش طول ساقه و تعداد برگ شده است ولیکن به عنوان الیستور در افزایش فنل و فلاونوئید کل تاثیر مثبت داشته است. اثرات خاص تنش شوری بر تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی بسته به گونه گیاهی خاص، غلظت نمک‌ها و مدت زمان قرار گرفتن در معرض می‌تواند متفاوت باشد. تنش شوری می‌تواند از طریق ایجاد تنش اسمزی تولید متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی و ترپنوئیدها را افزایش دهد. این متابولیت‌ها اغلب به عنوان محافظ اسمز عمل می‌کنند و به سلول‌های گیاهی کمک می‌کنند آب و

کلریدسدیم از سولفاتسدیم نیز برای اعمال تنش شوری استفاده شده است و بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل در کاربرد ۵۰ میلی مولار از کلریدسدیم حاصل شده است. چنین می توان نتیجه گرفت که کاربرد ۱۰ میلی مولار از سولفاتسدیم میزان مصرف کلریدسدیم را به نصف کاهش داده است. در زمینه کاربرد توام کلریدسدیم و سولفاتسدیم جهت اعمال تنش شوری، تحقیقی بر روی جوانه زنی گیاه قره داغ و بررسی شاخص های رشدی گیاهچه های حاصل انجام گرفت. جوانه زنی، طول ریشه چه، ساقه چه و تعداد برگچه ها در دامنه ای از شوری (۰ تا ۱۲۰ دسی زیمنس از هر دو نمک) در شرایط خارج از شیشه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، جوانه زنی، طول ساقه چه و تعداد برگ ها به طور معنی داری با افزایش شوری در هر دو نمک، کاهش یافت (Naseri *et al.*, 2011). این نتایج، دقیقاً هم راستا با نتایج تحقیق ما می باشد که نشان می دهد شاخص های رشدی چه در شرایط درون شیشه و چه خارج از شیشه با افزایش غلظت نمک ها، به شدت کاهش می یابند. در شوری زیاد نیز کل گیاه زرد شده و از بین می رود.

نتیجه گیری

از تحقیق حاضر چنین می توان نتیجه گرفت که اعمال تنش شوری شامل کاربرد ۵۰ میلی مولار کلریدسدیم به همراه ۱۰ میلی مولار سولفاتسدیم در محیط کشت درون شیشه ای گیاه قره داغ می تواند ضمن حفظ خصوصیات بهینه رشدی و سبز و شاداب نگه داشتن گیاهان، تاثیر مثبتی بر خصوصیات فیتوشیمیایی (محتوی فنل و فلاونوئید کل) داشته باشد. این نتایج می تواند به درک بهتر از پاسخ گیاه به تنش شوری برای کشت این گیاه در شرایط تنش شوری کمک کند.

References

- Ahmed Ali, A.M., Mohamed El-Nour, M.E., Mohamed Yagi, S. (2018). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16 (2), 677-682.
- Ampofo, JO., & Ngadi, M. (2021). Stimulation of the phenylpropanoid pathway and antioxidant capacities by biotic and abiotic elicitation strategies in common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. *Process Biochem.*, 100, 98-106.
- Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.*, 20, 72-83.
- Behdad, A., Mohsenzadeh, S., Azizi, M. and Moshtaghi, N. (2020). Salinity effects on physiological and phytochemical characteristics and gene expression of two *Glycyrrhiza glabra* L. populations. *phytochemistry*, 171, 112236
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218, 443-448.
- Falcinelli, B., Sileoni, V., Marconi, O., Perretti, G., Quinet, M., Lutts, S., Benincasa, P. (2017). Germination under Moderate Salinity Increases Phenolic Content and Antioxidant Activity in Rapeseed (*Brassica napus* var *oleifera* Del.) Sprouts. *Molecules*, 22, 1377.

تجمع متابولیت های ثانویه فنلی در گیاه مریم گلی *Melissa officinalis* L مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی، تیمارهای NaCl گرچه موجب مهار رشد گیاهان گردید ولی به طور همزمان باعث افزایش تجمع ترکیبات فنلی (فنولیک کل، فلاونول های محلول، آنتوسیانین، اسیدهای فنولیک)، به ویژه در ۱۰۰ میلی مولار NaCl گشت (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021). همچنین سطوح مختلف کلریدسدیم (۲۵ الی ۵۰۰ میلی مولار) بر میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دو گونه کمیاب هالوفیت *Spergularia marina* (L.) و *Glaux maritima* L کشت درون شیشه ای مورد بررسی قرار گرفت. در مورد گیاه *G. maritima* L، حداکثر محتوی فنلی و فلاونوئید کل به ترتیب در غلظت ۵۰ - ۱۰۰ میلی مولار و ۷۵ - ۴۰۰ میلی مولار از کلریدسدیم به دست آمد. مسلماً افزایش میزان فنل و فلاونوئید کل در این غلظت های بالا از کلریدسدیم در این گیاه می تواند ناشی از تفاوت در تحمل به تنش شوری و هالوفیت بودن این گونه گیاهی داشته باشد. در مقابل، میزان فنل و فلاونوئید کل در گونه قره داغ در شوری بالا کاهش معنی داری نشان داده است. جالب توجه است که گونه *S. marina* نتایج مشابه گونه قره داغ در مقاله حاضر را نشان داده است و کاربرد کلریدسدیم در مقادیر بالا باعث کاهش میزان فنل و فلاونوئید کل گشته است (Pungin *et al.*, 2023). همانطور که در متن اشاره شده است، در تمام مطالعات نام برده از کلریدسدیم به تنهای برای اعمال تنش شوری و بررسی میران فنل و یا فلاونوئید کل در گیاهان مختلف استفاده شده است و در اکثر آنها کاربرد میزان ۱۰۰ میلی مولار از کلریدسدیم منجر به بیشینه افزایش در محتوی فنل و فلاونوئید کل شده است. در حالی در این تحقیق در کنار

- Flowers, T. J., Colmer, T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179(4), 945-963.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Hasanuzzaman, M., Nahar K, Fujita M. (2012). Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*; Springer, New York, NY, USA, pp. 25–87.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. (2012). Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*; Springer, New York, NY, USA, pp. 25–87.
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, Stasi., nska-Jakubas, M., Wójciak, M., Sowa, I., Matraszek-Gawron, R. (2012). NaCl-Induced Elicitation Alters Physiology and Increases Accumulation of Phenolic Compounds in *Melissa officinalis* L. *J. Mol. Sci.*, 22, 6844.
- Iraji Mareshk, M. and Moghaddam M. (2021). Physiological and biochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to mycorrhizal fungi application under salinity stress condition. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, 60, 79-94.
- Jogaiah, S., Govind, S.R., Tran, L.S. (2013). Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(1), 23-39.
- Keisham, M., Mukherjee, S., Bhatla, SC.(2018). Mechanisms of sodium transport in plants-progresses and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 647.
- Khan, M.I., Nazir, F., Asgher, M., Per, T. S., Khan, N.A. (2015). Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *Journal of Plant Physiology*, 173,9-18.
- Kheirabadi, S., Zarinpanjeh, N., Ebrahimi, M.A., Bakhshi Khaniki, G.R., Naseri, H. R. (2020). Effective *in vitro* seed germination and direct regeneration from cotyledonary leaf explants of *Nitraria schoberi*. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 9 (1), 10-16.
- Kim, J.Y., Lee, S. H., Lee, J. S. (2012). Differential responses of three perennial grasses to salt stress by sodium chloride, Growth, ion accumulation, the role of anti-oxidant enzymes and osmolyte concentration. *African Journal of Biotechnology*, 11(40), 9719-9729.
- Naseri, H.R., Jafari, M., Sadeghi Sangdehi, S.A., Mohammadzadeh Khani, H., Saffariha, M. (2011). The effect of salinity on seed germination and the growth of Qara Dagh species (*Nitraria schoberi*). *Journal of Rangland*, 5(1), 81-90. (In Persian).
- Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
- Negrao, S., Schmockel, SM., Tester, M.(2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann. Bot.*, 119, 1-11.
- Pangin, A., Lartseva, L., Loskutnikova, V., Shakhov, V., Popova, E., Skrypnik, L., Krol, O. (2023). Effect of Salinity Stress on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Halophytes *Spergularia marina* (L.) Griseb. and *Glaux maritima* L. Cultured In Vitro. *Plants*, 12, 1905.
- Patel, H., & Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2, 60-65.
- Rafiee, D., Ebrahimi, MA., Qavami, N., Zarinpanjeh, N. (2022). The Effect of NaCl and Salicylic Acid on Total Phenolic and Flavonoid Contents in Suspension Culture of *Nitraria schoberi*. *Journal of Medicinal Plants and By-products*. Doi, 10.22092/JMPB.2022.358302.1465
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. and Dhawan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection- an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71, 89-98.
- Rathore, S., Singh, N., Singh, SK. (2014). Influence of NaCl on biochemical parameters of two cultivars of *Stevia rebaudiana* regenerated *in vitro*. *J Stress Physiol Biochem.*, 10, 287-29.
- Rouphael, Y., Petropoulos, SA., Cardarelli, M., Colla, G. (2018). Salinity as eustressor for enhancing quality of vegetables. *Sci. Hort.*, 234, 361-369.
- Samec, D., Linić, I., Salopek-Sondi, B. (2021). Salinity Stress as an Elicitor for Phytochemicals and Minerals Accumulation in Selected Leafy Vegetables of Brassicaceae. *Agronomy*, 11, 361.
- Sharifi-Rad, J., Hoseini-Alfatemi, SM., Sharifi-Rad, M., Iriti, M. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activities of different parts of *Nitraria schoberi* L. *J Biol Act Prod Nat.*, 4(1), 44-51.

- Younessi-Hamzekhanlu, M., Dibazarnia, Z., Oustan, S., Vinson, T., Katam, R., Mahna, N. (2021). Mild Salinity Stimulates Biochemical Activities and Metabolites Associated with Anticancer Activities in Black Horehound (*Ballota nigra* L.). *Agronomy*, 11, 2538.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 23, 283-333.
- Zheleznichenko, T., Banaev, E., Asbaganov, S., Voronkova, M., Kukushkina, T., Filippova, E., Mazurkova, N., Shishkina, L., Novikova, T. (2018). *Nitraria schoberi* L. hairy root culture as a source of compounds with antiviral activity against influenza virus subtypes A (H5N1) and A (H3N2). 3 *Biotech.*, 8, 260.

ORIGINAL ARTICLE

Gene network analysis and finding key genes involved in response to different bacterial strains in tomato

Seyyed Mohsen Sohrabi^{1*}, Ali Akbarabadi², Kamran Samiei³, Anahita Panji⁴

¹Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

²Horticultural Science Research Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.

³Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

⁴Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Correspondence

Seyyed Mohsen Sohrabi
Email: ms.seyyed@gmail.com

How to cite

Sohrabi, S. M., Akbarabadi, A., Samiei, K., & Panji, A. (2023). Gene network analysis and finding key genes involved in response to different bacterial strains in tomato. *Crop Biotechnology*, 12(42), 49-61.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is an annual, self-pollinated and diploid plant belonging to the potato family (Solanaceae). Different types of this plant form an important part of the world's diet. Bacterial diseases are one of the most important factors limiting tomato production worldwide. In the present study, by using transcriptome (RNA-seq) analysis followed by gene network analysis, the key genes involved in response to bacterial diseases were identified and their various characteristics were investigated. The results of the transcriptome analysis showed that bacterial pathogens have different effects on the transcriptome of tomato. Further analysis revealed 913 common differentially expressed genes among different bacterial treatments. Network analysis identified five key genes named large guanine nucleotide binding protein, mitogen-activated protein kinase 5, mitogen-activated protein kinase 7, heat shock protein 90 kDa and hop-interacting protein. Further analysis of identified key genes showed that all of them contain biotic stress related regulatory elements (w-box, WRE3 and WUN-motif) in their promoter region and have an important role in responding to biotic stresses. The key genes identified in this research can be used in classic breeding programs or in production of disease-resistant transgenic plants after a more detailed examination.

KEYWORDS

Plant breeding, Plant diseases, Transcriptome, Environmental stresses, Disease resistant plant.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

آنالیز شبکه ژنی و یافتن ژن‌های کلیدی پاسخ به سویه‌های باکتریایی مختلف در گوجه‌فرنگی

سید محسن سهرابی^{۱*}، علی اکبرآبادی^۲، کامران سمیعی^۳، آناهیتا پنجمی^۴

چکیده

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* گیاهی یک‌ساله، خودگشن و دیپلوئید متعلق به خانواده سیب‌زمینی (Solanaceae) است. گونه‌های مختلف گوجه‌فرنگی بخش مهمی از رژیم غذایی مردم جهان را تشکیل می‌دهد. بیماری‌های باکتریایی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید گوجه‌فرنگی در سطح جهان هستند. در این پژوهش با استفاده از آنالیز داده‌های ترنسکریپتومی (RNA-seq) و به دنبال آن آنالیز شبکه‌های ژنی، ژن‌های کلیدی پاسخ به بیماری‌های باکتریایی در گوجه‌فرنگی شناسایی و خصوصیات مختلف آنها بررسی شد. نتایج تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ترنسکریپتوم گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد که پاتوژن‌های باکتریایی دارای اثر متفاوتی بر ترنسکریپتوم این گیاه هستند. بررسی بیشتر تغییرات ترنسکریپتومی نشان داد که تعداد ۹۱۳ مورد ژن با بیان متفاوت وجود دارد که بین تیمارهای باکتریایی مختلف مشترک هستند. آنالیز شبکه، پنج ژن کلیدی به نام‌های پروتئین بزرگ متصل‌شونده به نوکلئوتید گوانین، پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن ۵، پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن ۷، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلودالتونی بتا و پروتئین برهم‌کنش‌کننده با hop را مشخص کرد. آنالیز پروموتور در ناحیه‌ی بالادست ژن‌های کلیدی نشان داد که همه آنها دارای عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی (W-box، WRE3 و WUN-motif) در ناحیه پروموتوری خود هستند و نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های زیستی ایفا می‌کنند. پس از بررسی‌های بیشتر روی ژن‌های کلیدی شناسایی‌شده در این پژوهش، می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی کلاسیک و یا در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری بهره برد.

واژه‌های کلیدی

اصلاح نباتات، بیماری‌های گیاهی، ترنسکریپتوم، تنش‌های محیطی، گیاهان مقاوم به بیماری.

^۱گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
^۲بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.
^۳گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.
^۴گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

نویسنده مسئول:

سید محسن سهرابی

رایانامه: ms.seyyed@gmail.com

استناد به این مقاله:

سهرابی، سید محسن، اکبرآبادی، علی، سمیعی، کامران و پنجمی، آناهیتا (۱۴۰۲). آنالیز شبکه ژنی و یافتن ژن‌های کلیدی پاسخ به سویه‌های باکتریایی مختلف در گیاه گوجه‌فرنگی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۲)، ۴۹-۶۱.

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* گیاهی یک‌ساله، خودگشن، دیپلوئید ($2n = 2x = 24$) از خانواده سیب‌زمینی (Solanaceae) است که سازگاری مناسبی با آب و هوای گرمسیری دارد. این گیاه در اصل بومی مناطقی از آمریکای مرکزی و جنوبی بوده و از آنجا به سایر مناطق جهان انتقال یافته است. امروزه ارقام مختلفی از گوجه‌فرنگی در سرتاسر جهان کشت داده می‌شود و این گیاه به صورت خام و فرآوری شده بخش مهمی از رژیم غذایی مردم جهان را تشکیل می‌دهد (Gerszberg et al., 2015; Kumar et al., 2021). تنش‌های محیطی و به ویژه آفات و بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید گوجه‌فرنگی در سطح جهان هستند (Gatahi, 2020).

پاتوژن‌های باکتریایی عامل ایجاد بیماری‌های مهمی در گیاهان زراعی بوده و باعث ایجاد خسارت به محصولات کشاورزی می‌شوند. امروزه روش‌های جدید بیماری‌شناسی مولکولی و زیست‌شناسی مولکولی به طور عمده در پی شناسایی مکانیسم‌های کنترل کننده پاسخ گیاهان به پاتوژن‌های گیاهی و برهم‌کنش پاتوژن-گیاه هستند (Kumar & Verma, 2018; Cheng et al., 2019). اغلب برهم‌کنش‌های گیاه و پاتوژن‌های باکتریایی به صورت اختصاصی عمل کرده و وابسته به اتصال مولکول‌های سطح سلولی در پاتوژن و گیاه است. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که برهم‌کنش گیاه و پاتوژن‌های باکتریایی شامل مکانیسم‌های شناسایی مولکولی بین گیاه و پاتوژن است. برای مثال، ژن مقاومت *Pto* در گوجه‌فرنگی که یک پروتئین کیناز سیتوپلاسمی را تولید می‌کند، به طور مستقیم با پروتئین *Pto avr* پاتوژن باکتریایی *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* برهم‌کنش کرده و باعث ایجاد مقاومت گیاه در برابر باکتری می‌شود (Pedley & Martin, 2003; Agrios, 2005).

بازسازی و بررسی شبکه‌های تنظیمی ژنی، امکان شناسایی روابط بین ژن‌های مختلف گیاه در پاسخ به تنش‌های محیطی و از جمله بیماری‌ها را فراهم کرده و تعیین ژن‌های کلیدی دخیل در این گونه پاسخ‌ها را ایجاد می‌کند (Long et al., 2008; Martinelli et al., 2013; Heidari et al., 2015). برای شناسایی ژن‌های کلیدی موجود در یک شبکه ژنی، روش‌های گوناگونی وجود دارد که یکی از بهترین آنها استفاده از رتبه‌بندی ژن‌های موجود در شبکه بر اساس الگوریتم‌های مختلف رتبه‌بندی است. در این روش با استفاده از الگوریتم‌های رتبه‌بندی مختلف موجود در نرم‌افزارهایی مانند Cytohubba، می‌توان ژن‌های

کلیدی دارای بهترین رتبه‌ها را در یک شبکه شناسایی کرد (Chin et al., 2014). بازسازی و بررسی شبکه‌های تنظیمی ژنی بر اساس داده‌های ترنسکریپتومی حاصل از روش‌های میکروآرای و توالی‌یابی نسل جدید و بررسی نواحی تنظیمی موجود در ژن‌های کلیدی، کمک قابل توجهی به محققان در شناسایی ژن‌های کلیدی و نقش آنها در فرآیندهای مختلف مانند پاسخ گیاهان به حملات پاتوژن‌ها می‌کند (Martinelli et al., 2013; Heidari et al., 2015; Nobori et al., 2020).

واکنش‌های گیاهان نسبت به حمله پاتوژن‌ها با پیچیدگی‌های زیادی همراه بوده و در آن ژن‌های زیادی که در فرآیندهای دفاعی دخیل هستند، تحریک می‌شوند (Jwa et al., 2006). گیاهانی که تحت تأثیر حمله پاتوژن قرار گرفته‌اند، در مرحله‌ی اول ممکن است موانع ساختاری مختلفی مانند لیگنین و سوبرین را برای جلوگیری از پیشرفت پاتوژن ایجاد کنند که این امر در گیاهان لوبیا و آرابیدوپسیس پس از آلودگی توسط پاتوژن‌های *P. syringae* و *Verticillium dahliae* مشاهده شده است (Milosevic & Slusarenko, 1996; Yao et al., 2015). مراحل بعدی، گیاهان با فعال کردن مکانیسم‌هایی مانند القاء و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) و فیتوالکسین‌ها به حملات پاتوژن‌ها پاسخ داده و با آنها مقابله می‌کنند (Henriquez et al., 2012; Derksen et al., 2013). در این بین، گیاهان در طول حملات پاتوژن‌ها گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید می‌کنند که رادیکال‌های سمی هستند و به عنوان محصولات جانبی فرآیندهای مختلف در سلول‌های زنده تولید می‌شوند (Mehdy, 1994; Bolwell & Wojtaszek, 1997). این گونه‌های فعال اکسیژن در طول حملات پاتوژن‌ها می‌توانند به عنوان مولکول‌های کشنده یا پیام دهنده عمل کرده و برای فعال کردن مکانیسم‌های مقاومت اکتسابی سیستمیک عمل نمایند (Noctor & Foyer, 1998; Sharma et al., 2012; Wang et al., 2014).

اغلب پروتئین‌های R یا مقاومت میزبان به طور معمول فاکتورهای نسخه‌برداری و یا پروتئین‌های دخیل در پیام‌دهی سلولی هستند که خانواده پروتئین‌های متصل به نوکلئوتید حاوی تکرار غنی از لوسین (NB-LRR) نمونه‌هایی از آنها هستند. این پروتئین‌های کلیدی تمامی واکنش‌های گیاهان در پاسخ به حملات پاتوژن‌ها را تنظیم کرده و به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی نقش مهمی در محافظت از گیاهان بازی می‌کنند. تاکنون خانواده‌های مختلفی از فاکتورهای نسخه‌برداری و پروتئین‌های

شده نرمال بودند، خوانش‌های مربوط به هر تیمار باکتریایی در سه تکرار به طور مجزا با سه تیمار شاهد بدون باکتری با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 مورد مقایسه قرار گرفتند. در این مقایسه ابتدا میانگین تیمارهای باکتریایی و شاهد برای هر سویه باکتری محاسبه شد و بر اساس آن میزان تغییرات بیان هر ژن (FC) Fold change محاسبه گردید. در مرحله‌ی بعد، به منظور تعیین ژن‌های افزایش یا کاهش بیان یافته، لگاریتم در پایه ۲ تغییرات بیان (Log_2FC) محاسبه گردید. علامت منفی و مثبت مقدار Log_2FC به ترتیب به معنی کاهش بیان و افزایش بیان ژن‌های مورد نظر بود. در نهایت، به منظور بررسی آماری تغییرات بیان، از آزمون t استفاده گردید و p. value و False Discovery rate (FDR) محاسبه شدند. به منظور به دست آوردن ژن‌های با بیان متفاوت معنی‌دار بین تیمارهای باکتریایی و شاهد، فیلتر کردن بر اساس دو پارامتر FDR و Log_2FC صورت گرفت. ابتدا داده‌ها بر اساس FDR کمتر از ۰/۰۵ و فیلتر ژن‌های با تفاوت بیان معنی‌دار مشخص شدند و در مرحله‌ی بعد، فیلتر کردن بر اساس Log_2FC بیشتر از قدر مطلق ۱ صورت گرفت. پس از انجام فیلتر کردن بر اساس FDR و Log_2FC ، ژن‌های با بیان متفاوت (Differentially Expressed Genes: DEGs) معنی‌دار بین هر تیمار باکتریایی با تیمار شاهد مشخص شدند. برای به دست آوردن ژن‌های با بیان متفاوت مشترک بین تیمارهای باکتریایی مختلف از نرم‌افزار آنالیز Venn (InteractiVenn) استفاده شد (Heberle et al., 2015).

ترسیم شبکه ژنی، آنالیز شبکه ژنی و تعیین ژن‌های کلیدی شبکه ژنی

ترسیم شبکه ژنی، آنالیز شبکه ژنی و تعیین ژن‌های کلیدی شبکه ژنی با استفاده از پایگاه STRING v11 (<https://string-db.org>) و نرم‌افزار Cytoscape v3.9.1 صورت گرفت (Shannon et al., 2003; Szklarczyk et al., 2019). به این منظور، ژن‌های با بیان متفاوت مشترک بین تیمارهای باکتریایی وارد پایگاه STRING v11 شده و ژن‌های برهم‌کنش کننده با آنها با میزان اطمینان بالا شناسایی شدند. لیست ژن‌های برهم‌کنش کننده خروجی از پایگاه STRING v11 وارد نرم‌افزار Cytoscape v3.9.1 شده و شبکه برهم‌کنشی ژن‌های با بیان متفاوت ترسیم گردید. در مرحله‌ی بعد، از ۱۲ الگوریتم (شامل

دخیل در پیام‌دهی سلولی در گیاهان مختلف شناسایی شده‌اند (Zhang & Klessig, 2001; Singh et al., 2002; McHale et al., 2006). به طور مثال، در گوجه‌فرنگی تعداد ۳۵۵ ژن NB-LRR شناسایی شده است (Piquerez et al., 2014). با این حال، به دلیل عدم غربال‌گری و شناسایی ژن‌های کلیدی از بین این ژن‌های شناسایی شده، نقش ژن‌های مذکور به خوبی شناخته نشده است.

با توجه به موارد مذکور و نظر به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی، هدف از انجام این پژوهش، آنالیز داده‌های ترنسکریپتومی و یافتن ژن‌های دارای نقش کلیدی در پاسخ گیاه گوجه‌فرنگی نسبت به بیماری‌های باکتریایی است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌ها

در این مطالعه، از پنج مجموعه داده توالی‌یابی RNA بافت برگ گوجه‌فرنگی رقم RioGrande تلقیح شده با سویه‌های باکتریایی مختلف *Pseudomonas syringae* pv. tomato، *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas fluorescens* تیمار شاهد بدون باکتری بودند استفاده شد. داده‌های مذکور که حاوی تعداد خوانش‌های مربوط به هر نمونه در ۳ تکرار بودند، از پایگاه Tomago Functional Genomics (TFGD) Database (<http://ted.bti.cornell.edu>) دریافت شدند (Fei et al., 2010). داده‌های خام این آزمایش با شماره دسترسی PRJNA214335 در پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) در دسترس هستند. در آزمایش مربوط به این مجموعه‌های داده، سویه باکتری *P. syringae* pv. tomato به میزان 5×10^6 cfu/mL و سویه‌های *P. putida* و *P. fluorescens* به میزان 10^8 cfu/mL به برگ‌های گیاهان چهار هفته‌ای تزریق شده بودند. همچنین برای تیمار شاهد بدون باکتری، کلرید منیزیم با غلظت ۱۰ میلی‌مولار برگ‌های گیاهان چهار هفته‌ای تزریق شده بود. نمونه‌برداری برای تیمارهای باکتریایی و شاهد ۶ ساعت پس از تزریق انجام گرفته بود.

تجزیه و تحلیل بیان و بدست آوردن ژن‌های با بیان متفاوت

پس از جمع‌آوری داده‌ها که حاوی خوانش‌های مستندسازی

(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/>) PlantCare، (PlantPAN و [webtools/plantcare/html](http://webtools.plantcare/html)) <http://plantpan.itps.ncku.edu.tw/plantpan4/index>.) (html) مورد بررسی قرار گرفت و عناصر تنظیمی موجود در آنها مشخص گردید (Higo *et al.*, 1999; Lescot *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2019).

بررسی بیان بافتی ژن‌های کلیدی شناسایی شده

برای تعیین میزان بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده در بافت‌های مختلف گیاه گوجه فرنگی، از پایگاه داده ژنومیکس عملکردی گوجه فرنگی (TFGD) استفاده شد (Fei *et al.*, 2010). ابتدا مجموعه داده‌های مربوط به ترنسکرپتوم بافت‌های مختلف گوجه فرنگی شامل برگ، ریشه، جوانه، گل، میوه نارس و میوه رسیده که میانگین سه تکرار بودند و به صورت RPKM موجود بودند از پایگاه TFGD دریافت شد. در مرحله‌ی بعد، میانگین میزان بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده در هر بافت محاسبه شد و نقشه حرارتی (Heatmap) تمامی ژن‌ها با استفاده از ابزار آنلاین Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca>) ترسیم گردید (Babicki *et al.*, 2016).

نتایج

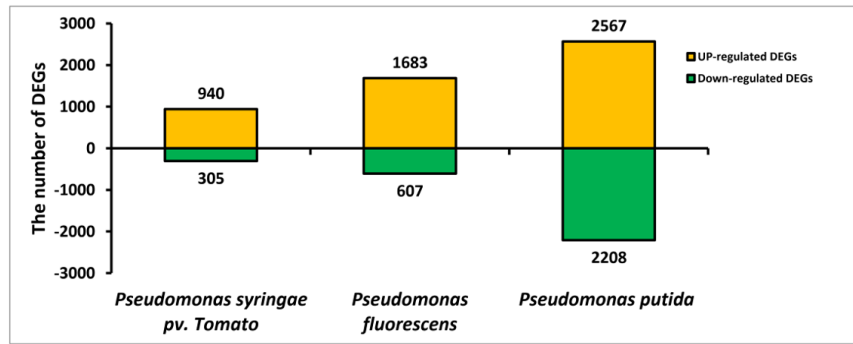
تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ترنسکرپتوم گیاه گوجه فرنگی نشان داد که پاتوژن‌های باکتریایی دارای اثر متفاوتی بر ترنسکرپتوم این گیاه هستند و آلودگی گیاه گوجه فرنگی با باکتری‌های مذکور تعداد ژن‌های متفاوتی را تحریک به افزایش یا کاهش بیان می‌کند (شکل ۱).

بررسی تغییرات ترنسکرپتومی مشخص کرد که بیشترین تعداد DEGها در آلودگی برگ گوجه فرنگی با باکتری *P. putida* است، در حالی که کمترین تعداد DEGها در آلودگی برگ گوجه فرنگی با باکتری *P. syringae* pv. *tomato* مشاهده می‌شود. بررسی تغییرات ترنسکرپتومی همچنین نشان داد که به طور کلی در تمام تیمارهای باکتریایی، تعداد DEGهای افزایش بیان یافته بیشتر از تعداد DEGهای با کاهش بیان بود (شکل ۱). بررسی بیشتر تغییرات ترنسکرپتومی، تعداد ۹۱۳ مورد DEG مشترک را بین تیمارهای باکتریایی مختلف نشان داد (شکل ۲).

.Closeness .BottleNeck .Betweenness .DMNC .Degree .ClusteringCoefficient (Stress و Radiality) MNC .MCC .EPC .EcCentricity موجود در افزونه Cytohubba نرم‌افزار v3.9.1 برای آنالیز شبکه برهم‌کنشی ترسیم شده استفاده شد (Chin *et al.*, 2014). در نهایت، بر اساس رتبه‌بندی نهایی ۱۲ الگوریتم مختلف، ۵ ژن انتخاب و به عنوان ژن‌های کلیدی در نظر گرفته شدند.

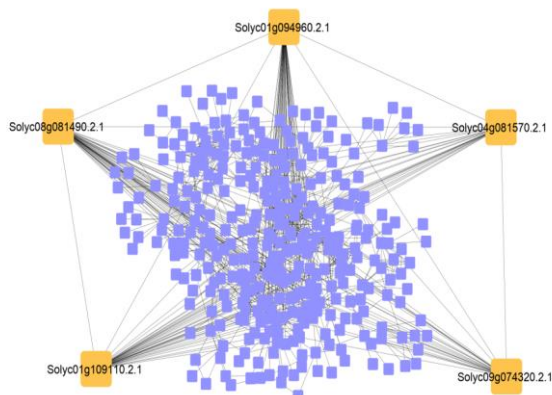
بررسی ویژگی ژن‌های کلیدی شناسایی شده

توالی ژن و پروتئینی ژن‌های کلیدی شناسایی شده از بانک ژن و پروتئین پایگاه NCBI دریافت شد. تعداد اینترون‌ها و اگزون‌های موجود در توالی ژنی، طول توالی کد کننده و توالی پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 10.3 و نرم‌افزار آنلاین FGENESH (<http://linux1.softberry.com>) مشخص گردید (Solovyev *et al.*, 2006). وجود یا عدم وجود دمین‌های عملکردی محافظت شده در ساختار توالی پروتئینی ژن‌های کلیدی شناسایی شده با سه نرم‌افزار آنلاین Interproscan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence>) Pfam (<http://pfam.xfam.org>) و CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) پایگاه NCBI مشخص گردید و دمین‌هایی که همزمان با سه ابزار آنلاین مورد تأیید قرار گرفته بودند، به عنوان دمین عملکردی محافظت شده نهایی در نظر گرفته شدند (Jones *et al.*, 2014; Marchler-Bauer *et al.*, 2015; El-Gebali *et al.*, 2019). وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید و همچنین محل تجمع سلولی محصول ژن‌های کلیدی شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0>) و CELLO2GO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go>) مشخص گردید (Yu *et al.*, 2014; Almagro Armenteros *et al.*, 2019). به منظور آنالیز پروموتور ژن‌های کلیدی شناسایی شده، ابتدا ۱۵۰۰ جفت باز از ناحیه بالادست ژن‌های مذکور (قبل از کدون شروع ATG) از ژنوم گیاه گوجه فرنگی (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) موجود در بانک ژنوم پایگاه NCBI دریافت شد. سپس نواحی بالادست با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>)



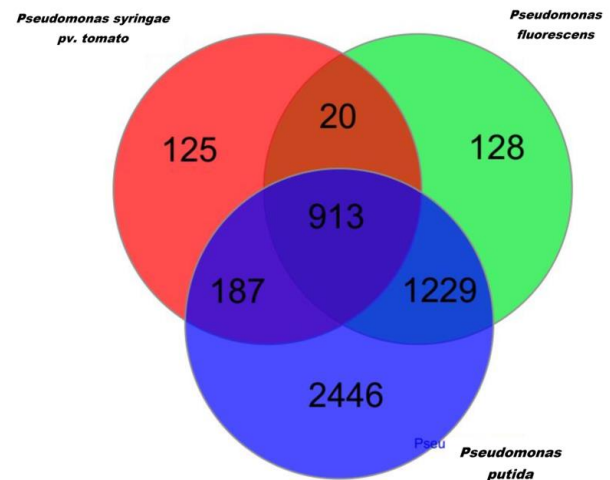
شکل ۱. تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ترنسکرپتوم گیاه گوجه فرنگی در اثر آلودگی با پاتوژن‌های باکتریایی. اعداد انتهایی ستون‌ها نشان دهنده تعداد DEG های افزایش یا کاهش بیان یافته هستند.

فعال شده با میتوزن ۷ با شماره شناسایی Solyc08g081490، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلودالتونی بتا با شماره شناسایی Solyc04g081570 و پروتئین برهم‌کنش کننده با hop با شماره دسترسی Solyc09g074320 بودند (شکل ۳).



شکل ۳. شبکه ژنی DEGsهای مشترک بین تمام تیمارهای باکتریایی

بررسی ساختار نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های کلیدی شناسایی شده نشان داد که ژن Solyc01g109110 دارای چارچوب خوانش بازی به طول ۲۷۱۲ جفت باز است که توسط ۷ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۹۰۳ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، در هسته سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود دارای دمین محافظت شده G-alpha است (جدول ۱). بررسی ژن Solyc08g081490 مشخص کرد که این ژن دارای چارچوب خوانش بازی به طول ۱۱۴۰ جفت باز است که توسط ۵ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۳۷۹ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، در سیتوپلاسم سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود دارای دمین



شکل ۲. نمودار Venn برای مقایسه ژن‌های با بیان متفاوت حاصل از آلودگی برگ گوجه فرنگی با باکتری‌های مختلف

مقایسه ژن‌های با بیان متفاوت نشان داد که آلودگی بافت برگ با باکتری *P. syringae* pv. *tomato* دارای تعداد ۱۲۵ مورد DEG اختصاصی است. برای آلودگی با باکتری *P. fluorescens* نیز تعداد ۱۲۸ مورد DEG اختصاصی مشاهده شد. در نهایت، آلودگی بافت برگ با باکتری *P. putida* دارای بیشترین میزان DEG اختصاصی و به تعداد ۲۴۴۶ بود (شکل ۲). پس از ترسیم و آنالیز شبکه ژنی DEGsهای مشترک بین تمام تیمارهای باکتریایی و بر اساس رتبه‌بندی نهایی، ۵ ژن انتخاب و به عنوان ژن‌های کلیدی در نظر گرفته شدند (شکل ۳).

پنج ژن کلیدی شناسایی شده در این پژوهش عبارت از پروتئین بزرگ متصل شونده به نوکلئوتید گوانین با شماره شناسایی Solyc01g109110، پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن ۵ با شماره شناسایی Solyc01g094960، پروتئین کیناز

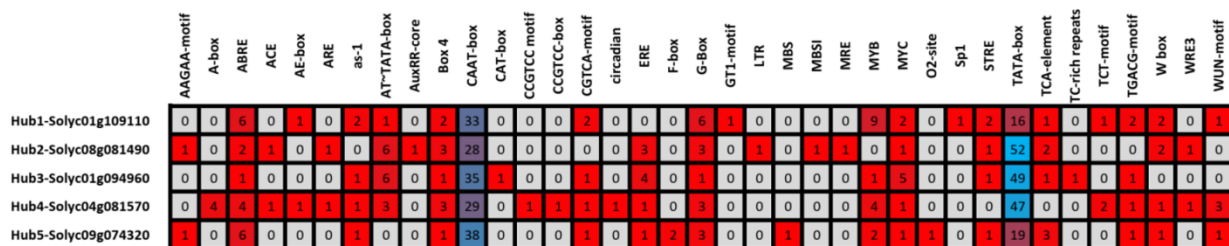
دارای زمین‌های محافظت شده MPP، PLN02153 و Kelch_4 است (جدول ۱).

آنالیز پروموتور، وجود عناصر هسته پروموتوری، تشدید کننده، پاسخ به نور، پاسخ به تنش‌های محیطی و پاسخ به هورمون‌ها را در ناحیه پروموتوری ژن‌های کلیدی شناسایی شده نشان داد (شکل ۴). در بین عناصر تنظیمی عمومی، عناصر تنظیمی هسته پروموتوری (TATA-box و CAAT-box) دارای بیشترین فراوانی در تمامی ژن‌های کلیدی شناسایی شده بودند (شکل ۴). عناصر تنظیمی پاسخ به هورمون‌های آبسازیک اسید (ABRE)، اتیلن (ERE)، سالیسیلیک اسید (TCA-element)، متیل جاسمونات (TGACG-motif و CGTCA-motif) در ناحیه پروموتوری همه یا اغلب ژن‌های کلیدی وجود داشتند (شکل ۴). عناصر تنظیمی پاسخ به نور (Box 4 و G-Box) نیز جزء فراوان‌ترین عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتوری همه یا اغلب ژن‌های کلیدی بودند (شکل ۴). عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی (WRE3، w-box و WUN-motif) و تنش‌های غیرزیستی (STRE و MYC) نیز در ناحیه پروموتوری همه یا اغلب ژن‌های کلیدی وجود داشتند (شکل ۴).

محافظت شده STKc-TEY-MAPK است (جدول ۱). ژن Solyc01g094960 دارای چارچوب خوانش بازی به طول ۱۱۲۲ جفت باز است که توسط ۵ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۳۷۳ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، در سیتوپلاسم سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود دارای زمین محافظت شده STKc-TEY-MAPK است (جدول ۱). ژن Solyc04g081570 دارای چارچوب خوانش بازی به طول ۲۴۳۹ جفت باز است که توسط ۱۴ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۸۱۲ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن دارای توالی سیگنال پپتیدی به طول ۲۳ اسید آمینه بوده، در شبکه اندوپلاسمی سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود دارای زمین‌های محافظت شده HSP90 و HATPase است (جدول ۱). ژن Solyc09g074320 چارچوب خوانش بازی به طول ۲۶۳۷ جفت باز است که توسط ۲۰ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۸۷۸ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، در سیتوپلاسم سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود

جدول ۱. مشخصات ساختاری ژن‌های کلیدی شناسایی شده

نام ژن	طول چارچوب خوانش باز (جفت باز)	تعداد اینترون	تعداد اگزون	طول توالی پروتئینی (اسید آمینه)	سیگنال پپتید	طول سیگنال پپتید (اسید آمینه)	تجمع سلولی	زمین‌های محافظت شده
Solyc01g109110	۳۷۱۲	۷	۸	۹۰۳	ندارد	-	هسته	G-alpha
Solyc08g081490	۱۱۴۰	۵	۶	۳۷۹	ندارد	-	سیتوپلاسم	STKc-TEY-MAPK
Solyc01g094960	۱۱۲۲	۵	۶	۳۷۳	ندارد	-	سیتوپلاسم	STKc-TEY-MAPK
Solyc04g081570	۲۴۳۹	۱۴	۱۵	۸۱۲	دارد	۲۳	شبکه اندوپلاسمی	HSP90 and HATPase
Solyc09g074320	۲۶۳۷	۲۰	۲۱	۸۷۸	ندارد	-	سیتوپلاسم	MPP, PLN02153 and Kelch_4



شکل ۴. آنالیز نواحی پروموتوری ژن‌های کلیدی شناسایی شده. اعداد نشان دهنده تعداد عناصر تنظیمی شناسایی شده هستند.

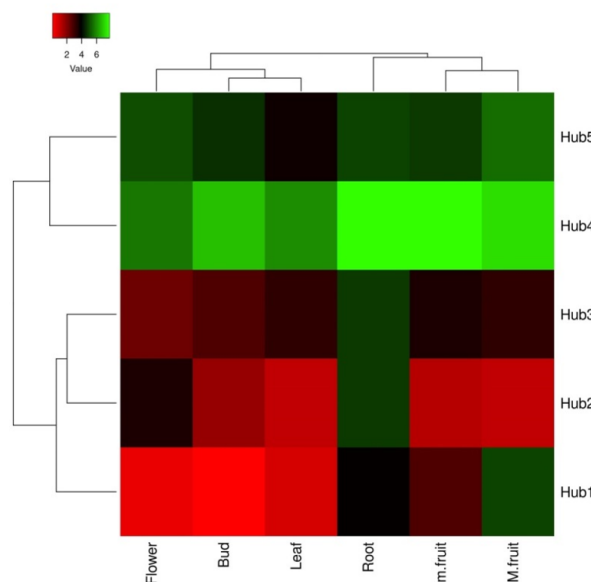
بحث

نتایج تحلیل ترنسکریپتوم بیشترین و کمترین تعداد DEGها را به ترتیب برای باکتری‌های *P. putida* و باکتری *P. syringae* pv. *tomato* مشخص کرد و همچنین نشان داد که فراوانی DEGهای افزایش بیان یافته نسبت به DEGهای کاهش بیان بیشتر است. باکتری‌های *P. putida* و *P. fluorescens* هر دو باکتری غیربیماری‌زای گیاهی و از عوامل بیوکنترلی هستند و به احتمال زیاد در مواجهه با میزبان‌های گیاهی با روش متفاوتی نسبت به عوامل بیماری‌زا مانند باکتری *P. syringae* pv. *Tomato* عمل می‌کنند. این مواجهه متفاوت باعث ایجاد پاسخ‌های رشدی و ترنسکریپتومی متفاوت و تفاوت در تعداد DGEهای تحریک شده خواهد شد. بررسی بیشتر تغییرات ترنسکریپتومی نشان داد که تعداد ۹۱۳ مورد DEG وجود دارد که بین تیمارهای باکتریایی مختلف مشترک هستند. این نشان می‌دهد که با وجود تفاوت در باکتری‌ها، گیاه میزبان از مکانیسم‌های تقریباً یکسانی برای مواجهه با آنها استفاده کرده و ژن‌های مشترکی را بیان می‌کند.

آنالیز شبکه ژنی DEGهای مشترک تعداد پنج ژن کلیدی پروتئین بزرگ متصل شونده به نوکلئوتید گوانین با شماره شناسایی Solyc01g109110، پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن ۵ با شماره شناسایی Solyc01g094960، پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن ۷ با شماره شناسایی Solyc08g081490، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلودالتونی بتا با شماره شناسایی Solyc04g081570 و پروتئین برهم کنش کننده با hop با شماره دسترسی Solyc09g074320 را مشخص کرد.

بررسی عملکردی نشان داد که ژن کلیدی شناسایی شده Solyc01g109110 یک پروتئین G است و عضوی از خانواده‌ای است که پروتئین‌های اتصال به نوکلئوتید گوانین نیز نامیده می‌شوند. پروتئین‌های G متعلق به گروه بزرگتری از آنزیم‌ها به نام GTPase هستند. پروتئین‌های این خانواده به عنوان سوئیچ‌های مولکولی در داخل سلول عمل می‌کنند و در انتقال پیام محرک‌های خارج سلولی به درون سلول نقش دارند (Urano & Jones, 2014). پروتئین‌های G نقش مهمی در پاسخ ایمنی ذاتی گیاه دارند. هنگام حمله عوامل بیماری‌زای پروتئین‌های G فعال شده و مجموعه‌ای از رویدادها را آغاز می‌کنند که در نهایت منجر به فعال شدن پاسخ‌های دفاعی در گیاهان می‌شود. این فرآیند شامل تنظیم کانال‌های یونی،

بررسی بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده، روند بیان متفاوتی را برای این ژن‌ها در بافت‌های مختلف گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد (شکل ۵). ژن کلیدی Solyc01g109110 (Hub 1) بیشترین میزان بیان را در بافت میوه رسیده و کمترین میزان بیان را در بافت جوانه نشان داد (شکل ۵). ژن کلیدی Solyc08g081490 (Hub 2) بیشترین و کمترین میزان بیان را به ترتیب در بافت‌های ریشه و برگ نشان داد (شکل ۵). ژن کلیدی Solyc01g094960 (Hub 3) دارای بیشترین میزان بیان در بافت ریشه و کمترین میزان بیان در بافت گل بود (شکل ۵). ژن کلیدی Solyc04g081570 (Hub 4) دارای میزان بیان نسبتاً بالایی در اغلب بافت‌های گیاه گوجه‌فرنگی بود ولی بیشترین میزان بیان آن در بافت‌های ریشه و میوه نارس و کمترین میزان بیان آن در بافت گل مشاهده شد (شکل ۵). در نهایت، بیشترین و کمترین میزان بیان ژن کلیدی Solyc09g074320 (Hub 5) به ترتیب در بافت‌های میوه رسیده و برگ مشاهده شد (شکل ۵). نتایج بررسی بیان نشان داد که ژن‌های کلیدی Solyc01g109110 (Hub 1)، Solyc08g081490 (Hub 2) و Solyc01g094960 (Hub 3) با هم دارای روند بیان نسبتاً یکسانی بودند و ژن‌های کلیدی Solyc04g081570 (Hub 4) و Solyc09g074320 (Hub 5) با هم روند بیان نسبتاً مشابهی را نشان دادند (شکل ۵).



شکل ۵. نمودار حرارتی میزان بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده در بافت‌های مختلف گیاه گوجه‌فرنگی. میزان بیان بر اساس میانگین Log2RPKM در سه تکرار محاسبه شده است.

بیماری کپک خاکستری *Botrytis cinerea* شد (Zhang et al., 2018).

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs)، خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که به چاپرون‌ها معروف بوده و توسط گیاهان و در پاسخ به قرار گرفتن در معرض شرایط تنش تولید می‌شوند. این پروتئین‌ها ابتدا در رابطه با شوک حرارتی شناسایی شدند اما بعدها مشخص شد که در سایر تنش‌های غیر زیستی و همچنین تنش‌های زیستی نقش بازی می‌کنند (Lindquist & Craig, 1988; Waters & Vierling, 2020). پروتئین‌های شوک حرارتی در گیاه فلفل با برهم‌کنش با فاکتورهای بیماری‌زایی *X. campestris* pv *vesicatoria* باعث القای مرگ سلولی و ایجاد مقاومت نسبت به آلودگی پاتوژن مذکور می‌شوند (Kim & Hwang, 2015). القای پروتئین‌های شوک حرارتی در گیاه توتون باعث القای مقاومت علیه باکتری عامل بیماری پژمردگی باکتریایی *Ralstonia solanacearum* می‌شود (Maimbo et al., 2007). در گیاه کاساوا، پروتئین‌های مرتبط با اتوفازای با برهم‌کنش با پروتئین‌های شوک حرارتی باعث ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن عامل بلایت *X. axonopodis* pv *manihotis* می‌شوند.

بررسی عملکردی نشان داد که ژن کلیدی شناسایی شده Solyc09g074320 یک پروتئین اسید متالوفسفاتاز ارغوانی است. پروتئین‌های این خانواده بزرگترین گروه اسید فسفاتازها بوده و به دلیل وجود یون‌های فلزی مانند آهن در ساختار آنها باعث ایجاد رنگ ارغوانی یا بنفش در محلول آبی شده و اسید متالوفسفاتاز ارغوانی نامیده می‌شوند (Bhadouria & Giri, 2022). پروتئین‌های این گروه به طور عمده در حفظ هموستازی فسفات در سلول نقش داشته، با این حال، نقش آنها در فرآیندهای متعدد گیاهی مانند گل‌دهی، توسعه ریشه، توسعه بذر، پیری، متابولیسم کربن، انتقال پیام‌های سلولی، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی سیگنال دهی نیز اثبات شده است (Olczak et al., 2003; Bhadouria & Giri, 2022). در گوجه فرنگی، اسید متالوفسفاتاز ارغوانی باعث تولید ROS شده و با ایجاد انفجار اکسیداتیو باعث ایجاد مقاومت علیه حمله پاتوژن می‌شود (Bozzo et al., 2002; Bhadouria & Giri, 2022). گزارشی مشخص شد که یک اسید متالوفسفاتاز ارغوانی برای ایجاد مقاومت علیه باکتری *P. syringae* pv *syringae* آراییدوپسیس مورد نیاز بوده و جهش یافته‌های مربوط به ژن مذکور حساسیت بالایی را نسبت به این پاتوژن باکتریایی نشان

پروتئین‌های کینازها و سایر اجزای انتقال پیام است. پروتئین‌های G برای عملکرد مناسب سیستم ایمنی ذاتی گیاه ضروری هستند و اختلال در تنظیم آنها می‌تواند منجر به افزایش حساسیت به عوامل بیماری‌زا شود (Trusov & Botella, 2016). در مطالعه‌ای که روی گیاه آراییدوپسیس صورت گرفت مشخص شد که پروتئین‌های G برای مقاومت کامل بیماری در برابر سویه‌های مختلف باکتری *P. syringae* مورد نیاز بوده و فقدان آن باعث ایجاد حساسیت نسبت به این سویه‌ها خواهد شد (Torres et al., 2013). در مطالعات مشابهی گیاه آراییدوپسیس جهش یافته برای پروتئین‌های G مقاومت خود را در برابر پاتوژن‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی مختلفی مانند CMV، TuMV، *Fusarium Agrobacterium tumefaciens*، *syringae* از دست داد (Ishikawa, 2009; Torres et al., 2013; Maruta et al., 2015; Brenya et al., 2016).

بررسی عملکردی نشان داد که ژن‌های کلیدی شناسایی شده Solyc01g094960 و Solyc08g081490، هر دو از خانواده پروتئین‌های کیناز فعال شده با میتوژن بودند. پروتئین‌های کینازهای فعال شده با میتوژن (MAPKs) خانواده‌ای از پروتئین‌های کینازها هستند که به طور اختصاصی اسیدهای آمینه سرین و ترئونین را فسفریله می‌کنند و در واقع سرین-ترئونین کیناز هستند (Zhang & Klessig, 2001; Bigeard & Hirt, 2018). این پروتئین‌ها در موجودات مختلف وجود داشته و نقش مهمی در عملکردهای سلولی (از جمله تقسیم سلولی، تنظیم بیان ژن، تمایز، میتوز، آپوپتوز و غیره) و پاسخ به محرک‌ها و تغییرات محیطی بازی می‌کنند (Zhang & Klessig, 2001; Meng & Zhang, 2013). پروتئین‌های کیناز MPK3، MPK4 و MPK6 در گیاهان آراییدوپسیس و گوجه فرنگی واسطه‌های کلیدی پاسخ به تنش‌های غیر زیستی اسمزی، اکسیداتیو، سرما و تنش‌های زیستی هستند (Göhre & Robatzek, 2008; Pitzschke et al., 2009; Cristina et al., 2010; Sinha et al., 2011). پروتئین کیناز MPK6 گیاه برنج تنظیم کننده‌ی منفی مقاومت نسبت به بیماری‌های باکتریایی بوده و به طور منفی مقاومت گیاه برنج را در برابر پاتوژن‌های باکتریایی تنظیم می‌کند. سرکوب یا حذف کیناز MPK6، مقاومت برنج را در برابر سویه‌های مختلف باکتری *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* عامل بلایت باکتریایی افزایش داد (Yuan et al., 2007). حذف کیناز MAPK3 از گیاه گوجه فرنگی، مقاومت این گیاه نسبت به

پاسخ این ژن‌ها به پاتوژن‌های مختلف ضروری بوده و در صورت عدم وجود این عناصر تنظیمی، ژن‌های کلیدی شناسایی شده فاقد عملکرد مناسب در مواجهه با پاتوژن‌ها خواهند بود.

در این پژوهش با استفاده از یک رویکرد مبتنی بر زیست‌شناسی سامانه‌ای ژن‌های کلیدی پاسخ به بیماری‌های باکتریایی در گوجه‌فرنگی شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند. ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این پژوهش می‌توانند با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی مورد بررسی دقیق‌تری قرار گرفته و نقش کلیدی احتمالی آنها در پاسخ به پاتوژن‌ها و یا سایر تنش‌های محیطی مورد بررسی قرار گیرد. در صورت اثبات نقش کلیدی ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش، می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی کلاسیک و یا در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری استفاده کرد.

References

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5th eds, Department of Plant Pathology. *University of Florida. United States of America*.
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, 37(4), 420-423.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic acids research*, 44(W1), W147-W153.
- Bhadouria, J., & Giri, J. (2022). Purple acid phosphatases: roles in phosphate utilization and new emerging functions. *Plant Cell Reports*, 41(1), 33-51.
- Bigéard, J., & Hirt, H. (2018). Nuclear signaling of plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science*, 9, 469.
- Blancard, D. (2012). *Tomato diseases: identification, biology and control: a colour handbook*. CRC Press.
- Bolwell, G. P., & Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51(6), 347-366.
- Bozzo, G. G., Raghothama, K. G., & Plaxton, W. C. (2002). Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *European Journal of Biochemistry*, 269(24), 6278-6286.
- Brenya, E., Trusov, Y., Dietzgen, R. G., & Botella, J. R. (2016). Heterotrimeric G-proteins facilitate resistance to plant pathogenic viruses in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant signaling & behavior*, 11(8), e1212798.
- Cheng, Y. T., Zhang, L., & He, S. Y. (2019). Plant-microbe interactions facing environmental challenge. *Cell Host & Microbe*, 26(2), 183-192.
- Chin, C.-H., Chen, S.-H., Wu, H.-H., Ho, C.-W., Ko, M.-T., & Lin, C.-Y. (2014). cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC systems biology*, 8(4), 1-7.
- Chow, C.-N., Lee, T.-Y., Hung, Y.-C., Li, G.-Z., Tseng, K.-C., Liu, Y.-H., Kuo, P.-L., Zheng, H.-Q., & Chang, W.-C. (2019). PlantPAN3. 0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1155-D1163.
- Cristina, M. S., Petersen, M., & Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 61, 621-649.
- Derksen, H., Rampitsch, C., & Daayf, F. (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant science*, 207, 79-87.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., & Smart, A. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1), D427-D432.

دادند (Ravichandran *et al.*, 2013). در پژوهش دیگری مشخص شد که یک اسید متالوفسففاتاز ارغوانی هیچ تغییر بیانی در پاسخ به تغییرات و کمبود فسفات در گیاه نداشته ولی در پاسخ به آلودگی قارچی القا شده و بیان آن به طور قابل توجهی در بافت‌های آوندی افزایش پیدا می‌کند (Zamani *et al.*, 2014).

آنالیز پروموتور ژن‌های کلیدی شناسایی شده، وجود عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی (WUN- و WRE3, w-box) و تنش‌های غیرزیستی (MYC و STRE) را در ناحیه پروموتوری همه یا اغلب ژن‌های کلیدی نشان داد. این مورد نشان دهنده‌ی نقش ژن‌های کلیدی شناسایی شده در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف است. وجود چنین عناصر تنظیمی در نواحی پروموتوری ژن‌های کلیدی شناسایی شده برای

- Fei, Z., Joung, J.-G., Tang, X., Zheng, Y., Huang, M., Lee, J. M., McQuinn, R., Tieman, D. M., Alba, R., & Klee, H. J. (2010). Tomato Functional Genomics Database: a comprehensive resource and analysis package for tomato functional genomics. *Nucleic acids research*, 39(suppl_1), D1156-D1163.
- Gatahi, D. M. (2020). Challenges and opportunities in tomato production chain and sustainable standards. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 7(3), 235-262.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120, 881-902.
- Göhre, V., & Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 189-215.
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*, 16, 1-7.
- Heidari, P., Ahmadizadeh, M., & Najafi-Zarrini, H. (2015). In silico analysis of Cis-regulatory elements on co-expressed genes. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 9(25).
- Henriquez, M. A., Adam, L. R., & Daayf, F. (2012). Alteration of secondary metabolites' profiles in potato leaves in response to weakly and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 8-14.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, 27(1), 297-300.
- Ishikawa, A. (2009). The Arabidopsis G-protein β -subunit is required for defense response against *Agrobacterium tumefaciens*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(1), 47-52.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., & Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Jwa, N.-S., Agrawal, G. K., Tamogami, S., Yonekura, M., Han, O., Iwahashi, H., & Rakwal, R. (2006). Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5-6), 261-273.
- Kim, N. H., & Hwang, B. K. (2015). Pepper heat shock protein 70a interacts with the type III effector AvrBsT and triggers plant cell death and immunity. *Plant physiology*, 167(2), 307-322.
- Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? *Microbiological research*, 207, 41-52.
- Kumar, M., Tomar, M., Bhuyan, D. J., Punia, S., Grasso, S., Sa, A. G. A., Carciofi, B. A. M., Arrutia, F., Changan, S., & Singh, S. (2021). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112018.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), 631-677.
- Long, T. A., Brady, S. M., & Benfey, P. N. (2008). Systems approaches to identifying gene regulatory networks in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 81-103.
- Maimbo, M., Ohnishi, K., Hikichi, Y., Yoshioka, H., & Kiba, A. (2007). Induction of a small heat shock protein and its functional roles in *Nicotiana glauca* plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum*. *Plant physiology*, 145(4), 1588-1599.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., & Hurwitz, D. I. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research*, 43(D1), D222-D226.
- Martinelli, F., Reagan, R. L., Uratsu, S. L., Phu, M. L., Albrecht, U., Zhao, W., Davis, C. E., Bowman, K. D., & Dandekar, A. M. (2013). Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. *PLoS one*, 8(9), e74256.
- Maruta, N., Trusov, Y., Brenya, E., Parekh, U., & Botella, J. R. (2015). Membrane-localized extralarge G proteins and G $\beta\gamma$ of the heterotrimeric G proteins form functional complexes engaged in plant immunity in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 167(3), 1004-1016.
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome biology*, 7, 1-11.
- Mehdy, M. C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant physiology*, 105(2), 467.

- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51, 245-266.
- Milosevic, N., & Slusarenko, A. (1996). Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(3), 143-158.
- Nobori, T., Wang, Y., Wu, J., Stolze, S. C., Tsuda, Y., Finkemeier, I., Nakagami, H., & Tsuda, K. (2020). Multidimensional gene regulatory landscape of a bacterial pathogen in plants. *Nature Plants*, 6(7), 883-896.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Olczak, M., Morawiecka, B., & Watorek, W. (2003). Plant purple acid phosphatases-genes, structures and biological function. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1245-1256.
- Pedley, K. F., & Martin, G. B. (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 215-243.
- Piquerez, S. J., Harvey, S. E., Beynon, J. L., & Ntoukakis, V. (2014). Improving crop disease resistance: lessons from research on Arabidopsis and tomato. *Frontiers in Plant Science*, 5, 671.
- Pitzschke, A., Schikora, A., & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 421-426.
- Ravichandran, S., Stone, S. L., Benkel, B., & Prithiviraj, B. (2013). Purple Acid Phosphatase5 is required for maintaining basal resistance against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *BMC plant biology*, 13(1), 1-12.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
- Singh, K. B., Foley, R. C., & Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 430-436.
- Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech*, 7, 1-10.
- Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., & Tuteja, N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 196-203.
- Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I., & Vorobyev, D. (2006). Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome biology*, 7(1), 1-12.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., & Bork, P. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 47(D1), D607-D613.
- Topcu, Y., Nambeesan, S. U., & van der Knaap, E. (2022). Blossom-end rot: a century-old problem in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and other vegetables. *Molecular Horticulture*, 2(1), 1.
- Torres, M. A., Morales, J., Sánchez-Rodríguez, C., Molina, A., & Dangl, J. L. (2013). Functional interplay between Arabidopsis NADPH oxidases and heterotrimeric G protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(6), 686-694.
- Trusov, Y., & Botella, J. R. (2016). Plant G-proteins come of age: breaking the bond with animal models. *Frontiers in chemistry*, 4, 24.
- Urano, D., & Jones, A. M. (2014). Heterotrimeric G protein-coupled signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 65, 365-384.
- Wang, C., El-Shetehy, M., Shine, M., Yu, K., Navarre, D., Wendehenne, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2014). Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Reports*, 7(2), 348-355.
- Waters, E. R., & Vierling, E. (2020). Plant small heat shock proteins—evolutionary and functional diversity. *New Phytologist*, 227(1), 24-37.
- Yao, Z., Islam, M. R., Badawi, M. A., El-Bebany, A. F., & Daayf, F. (2015). Overexpression of StRbohA in Arabidopsis thaliana enhances defence responses against *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 90, 105-114.
- Yu, C.-S., Cheng, C.-W., Su, W.-C., Chang, K.-C., Huang, S.-W., Hwang, J.-K., & Lu, C.-H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. *PloS one*, 9(6), e99368.

- Yuan, B., Shen, X., Li, X., Xu, C., & Wang, S. (2007). Mitogen-activated protein kinase OsMPK6 negatively regulates rice disease resistance to bacterial pathogens. *Planta*, 226, 953-960.
- Yuqing, W., Zhang, Y., Zhipeng, G., & Wencai, Y. (2018). Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. *Horticultural Plant Journal*, 4(5), 193-207.
- Zamani, K., Lohrasebi, T., Sabet, M. S., Malboobi, M. A., & Mousavi, A. (2014). Expression pattern and subcellular localization of Arabidopsis purple acid phosphatase AtPAP9. *Gene Expression Patterns*, 14(1), 9-18.
- Zhang, S., & Klessig, D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in plant science*, 6(11), 520-527.
- Zhang, S., Wang, L., Zhao, R., Yu, W., Li, R., Li, Y., Sheng, J., & Shen, L. (2018). Knockout of SIMAPK3 reduced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(34), 8949-8956.

ORIGINAL ARTICLE

The Effect of Drought Stress on some Rapeseed Genotypes under Tissue Culture and Field Conditions

Zeinab Chaghakaboodi^{1*}, Mehdi Kakaei², Alireza Zebarjadi¹, Danial Kahrizi³

¹Department of Plant Production Engineering and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

²Department of Agriculture, Faculty of Engineering, Payame Noor University, Tehran-Iran.

³Agriculture Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Correspondence

Zeinab Chaghakaboodi

Email: z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

How to cite

Chaghakaboodi, Z., Kakaei, M., Zebarjadi, A., & Kahrizi, D. (2023). The Effect of Drought Stress on some Rapeseed Genotypes under Tissue Culture and Field Conditions. *Crop Biotechnology*, 12(42), 63-77.

ABSTRACT

Rapeseed (*Brassica napus*) is recognized as one of the most important oilseed crops worldwide and its development of cultivation has received attention due to the importance of importing oil. The current study aimed to investigate the effect of drought stress on some Rapeseed genotypes under tissue culture and field conditions and to identify stable genotypes in the field. The possible responses of 14 different canola genotypes to Callus induction resulting from Hypocotyl cultivation and evaluation their drought tolerance were studied using Polyethylene Glycol 6000 (PEG 6000) at five different levels, including zero (as control), 10%, 20%, 30%, and 40% PEG concentrations based on a completely randomized design (CRD) with three replications. Measured traits included relative growth rate, growth rate, relative water content, and proline content of the Callus. Furthermore, in the field sector, the genotypes were investigated in four environments (two consecutive years in 2016-2018 under rainfed and irrigated conditions) based on randomized complete block design with three replications. According to the Callus culture results, the assessed traits, except the Proline content of Callus, decreased with increasing stress level. In laboratory conditions, genotype number seven (Dante) was introduced as the superior genotype. The results of Additive Main effects and Multiplicative Interaction (AMMI) analysis showed the significance of both additive effects of genotype and environment and the multiplicative effect of genotype × environment interaction. The results of cumulative additive effects (decomposition of variance) and multiplicative interaction effects (decomposition into principal components) showed that the first two components explained 53.02 and 33.65% of the variance of the interaction effect for oil yield. Dante and SLM-046 genotypes were introduced as stable genotypes.

KEYWORDS

Callus induction, Biplot, Drought Stress, Callus growth rate, Stability indicators, Rapeseed.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی اثر تنش خشکی بر برخی ژنوتیپ‌های کلزا در شرایط کشت بافت و مزرعه

زینب چقاکبودی^{۱*}، مهدی کاکایی^۲، علیرضا زبرجدی^۱، دانیال کهریزی^۳

چکیده

کلزا یکی از مهمترین گیاهان روغنی در جهان است که به دلیل اهمیت واردات روغن توسعه‌ی کشت آن مورد توجه قرار گرفته است. این تحقیق به منظور بررسی اثر تنش خشکی بر ژنوتیپ‌های کلزا در شرایط کشت بافت و مزرعه و نیز شناسایی ژنوتیپ‌های پایدار در مزرعه اجرا گردید. در شرایط آزمایشگاه، واکنش ۱۴ ژنوتیپ مختلف کلزا به القاء کالوس حاصل از کشت هیپوکوتیل و ارزیابی تحمل به خشکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در پنج سطح صفر (بعنوان شاهد)، ۱۰٪، ۲۰٪، ۳۰٪، و ۴۰٪ در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. صفات مورد ارزیابی شامل سرعت رشد نسبی، سرعت رشد، محتوای آب نسبی و محتوای پرولین کالوس بود. در بخش مزرعه، ژنوتیپ‌ها در چهار محیط (دو سال متوالی ۸۷-۱۳۸۶ در شرایط دیم و آبیاری) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج کشت کالوس نشان داد که صفات مورد ارزیابی به غیر از محتوای پرولین کالوس با افزایش سطح تنش کاهش یافتند. در شرایط آزمایشگاه ژنوتیپ شماره‌ی هفت (Dante) به عنوان ژنوتیپ برتر معرفی گردید. نتایج حاصل از تجزیه‌ی AMMI حاکی از معنادار بودن اثرات افزایشی ژنوتیپ و محیط و اثر ضربی ژنوتیپ × محیط بود. نتایج اثرات افزایشی تجمعی (تجزیه واریانس) و اثرات متقابل ضربی (تجزیه به اجزای اصلی) نشان داد که دو مؤلفه‌ی اول ۵۳/۰۲ و ۳۳/۶۵ درصد از واریانس اثر متقابل را برای عملکرد روغن تبیین کردند. ژنوتیپ‌های Dante و SLM-046 بعنوان ژنوتیپ‌های پایدار معرفی گردیدند.

واژه‌های کلیدی

القاء کالوس، بای‌پلات، تنش خشکی، سرعت رشد کالوس، شاخص‌های پایداری، کلزا

^۱گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
^۲گروه علوم کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
^۳گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

زینب چقاکبودی

رایانامه: z.chaghakaboodi@razi.ac.ir

استناد به این مقاله:

چقاکبودی، زینب، کاکایی، مهدی، زبرجدی، علیرضا و کهریزی، دانیال (۱۴۰۲). بررسی اثر تنش خشکی بر برخی ژنوتیپ‌های کلزا در شرایط کشت بافت و مزرعه. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۲)، ۶۳-۷۷

<https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/>

مقدمه

با توجه به نیاز روزافزون کشور به روغن های گیاهی و وابستگی شدید کشور به واردات روغن خوراکی، باید به توسعه و گسترش کشت دانه های روغنی مانند کلزا توجه ویژه ای شود (کاکایی و همکاران ۲۰۱۳). با توجه به مشکل و محدودیت ناشی از خشکسالی در تولید کلزا، ارزیابی ژنوتیپ های متحمل به خشکی در شرایط محدودیت رطوبتی بسیار ضروری بوده و ثبات در این شرایط بسیار مهم است (کاکایی و همکاران، ۲۰۱۴ و زبرجدی و همکاران ۲۰۱۱). دانه کلزا دارای ۴۰ تا ۴۸ درصد روغن در دانه و ۳۸ تا ۴۵ درصد پروتئین در کنجاله می باشد و میزان رطوبت آن حدود ۵ درصد است. نسبت اسیدلینولئیک به اسیدلینولئیک در روغن کلزا تقریباً ۱:۲ می باشد که برای مصرف انسان نسبت متعادلی بشمار می رود. کنجاله کلزا حاوی ۱۳ درصد فیبر است. وجود مقدار نسبتاً زیاد فیبر در کنجاله یک عامل محدود کننده در استفاده از آن به عنوان خوراک دام محسوب می شود زیرا توان تولید انرژی در جیره غذایی را کاهش می دهد. پوسته کلزا تقریباً ۱۶/۵ تا ۱۸/۵ درصد وزن خشک دانه را تشکیل می دهد و ثابت شده است که رنگ پوست دانه کلزا با ترکیب شیمیایی دانه در ارتباط می باشد (شیرانی راد و دهشیری، ۱۳۸۱). خشکی یکی از متداول ترین تنش های محیطی در سرتاسر دنیا است که رشد و تولید گیاهان را از طریق تغییر متابولیسم و تظاهر ژن ها تحت تاثیر قرار می دهد (لئو پولد، ۱۹۹۰). به نظر مارتین (۱۹۹۳) تنش خشکی در حقیقت کاهش پتانسیل آب خاک است. در کشاورزی خشکسالی عبارت از یک دوره خشکی است که نتیجه آن کاهش عملکرد در حد پایین تر از شرایط مناسب فراهمی آب است (کافی و مهدوی دامغانی، ۱۳۸۱). شرایط محیطی خشکی توسط نوسان شدید در بارندگی و مقدار و توزیع آن در بین فصول و درون فصول مشخص می شود (آرائوس، ۲۰۰۲). خشکی یک عامل محیطی مهم محدود کننده تولید محصول در دنیا است. کمیاب شدن منابع آب سبب شده است که تکامل ارقام زراعی با سازگاری بهبود یافته به خشکی هدف مهمی در بسیاری برنامه های اصلاحی گیاهان می شود (سیوامانی و همکاران، ۲۰۰۰). وراثت پذیری پایین مقاومت و فقدان استراتژی های مؤثر انتخاب مانع تکامل ارقام مقاوم می شود. به نظر می رسد که نمود نسبی عملکرد ژنوتیپ ها در محیط تنش خشکی و محیط های مطلوب تر، نقطه مشترک شروع شناسایی صفات وابسته به مقاومت به خشکی و انتخاب ژنوتیپ ها برای استفاده در اصلاح گیاهان برای محیط های خشک باشد (کلارک و همکاران،

۱۹۹۲). در سال های اخیر فنون کشت بافت گیاهی به یک ابزار بسیار قدرتمندی جهت تکثیر بسیاری از گونه های گیاهی تبدیل شده اند. کشت سلول و بافت گیاهی شامل دامنه ی وسیعی از روش های کشت برای باززایی گیاهان فعال از بافت های جنینی، قطعات بافت، کالوس ها، سلول های ایزوله شده یا پروتوپلاست ها می گردد. باززایی گیاهچه از طریق کشت بافت نیاز اولیه ای برای کاربرد فن آوری ژنتیک مولکولی در یک گونه ی گیاهی خاص می باشد (کههریزی و همکاران، ۱۳۸۶). امروزه تکنیک های کشت بافت گیاهی به عنوان ابزاری ارزشمند جهت ایجاد تنوع ژنتیکی با هدف به نژادی گیاهان و همچنین تولید گیاهان عاری از ویروس کاربرد فراوانی دارند (کاکایی و همکاران، ۲۰۲۳). برای کاربرد کامل فناوری ژنتیک مولکولی و متداول شدن آن در یک طرح به نژادی، معمولاً روش های اختصاصی نیاز است که به ماده ژنتیکی و محیط کشتی که اصلاح کننده با آن کار می کند، سازگار باشد (پولمن و اسلیپر، ۱۳۷۸). نوبکورت، ۱۹۳۹ کشت کالوس پایدار را از ریز نمونه ریشه هویج بدست آورد. اوربیک، ۱۹۴۱ شیر نارگیل را به عنوان ترکیب جدید در محیط کشت برای کشت کالوس معرفی نمود. اسکوگ، ۱۹۴۵ تکنیکی را برای کشت بافت از قسمت های ایزوله شده توتون توسعه داد (سنگبوش، ۱۹۹۸). گامبورگ و همکاران (۱۹۶۵) اولین کشت سوسپانسیون از گندم را انجام داد. شیمادا و همکاران (۱۹۶۹) تشکیل کالوس و کشت سلول در گندم را گزارش کردند. لیو و همکاران (۱۹۸۸) القاء کالوس از سنبله های جوان، قسمت های ساقه و میانگره در گندم را بدست آورد. وانگ و همکاران (۱۹۸۸) تکنیک های تشکیل کالوس و باززایی گیاهچه از پروتوپلاست کشت سوسپانسیون گندم نیمه زمستانه را توسعه داد (احسان شاه و همکاران، ۲۰۰۳). در آزمایشی که به منظور بررسی اثرات تنش خشکی بر روی کالوس های ایجاد شده توسط کشت هیپوکوتیل های پنج ژنوتیپ کلزای پاییزه با استفاده از غلظت های مختلف اسمزی مانیتول انجام شد نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش معنی دار صفات محتوای آب نسبی کالوس، رشد نسبی کالوس و افزایش محتوای پرولین کالوس شد (قاسم پور و همکاران، ۲۰۰۸). در آزمایشی که به منظور بررسی اثرات تنش خشکی بر جوانه زنی بذور ۱۵ ژنوتیپ گلرنگ با استفاده از غلظت های مختلف اسمزی مانیتول (۰، ۱۸۰، ۳۵۰ و ۵۰۵ میلی مول) انجام شد نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش معنی دار در صفات طول ساقچه، سرعت جوانه زنی، شاخص تنش جوانه زنی و افزایش طول ریشه چه گردید (سهیلی، ۱۳۸۷). انتخاب ژنوتیپ ها (از نظر

کرده و همچنین استفاده از این روش امکان بررسی روابط میان محیطها و شناسایی محیطهای هدف در برنامه های به‌نژادی را به سادگی میسر می‌سازد (یان و همکاران ۲۰۰۱). هدف از این تحقیق بررسی سازگاری و پایداری برخی از ژنوتیپ‌های کلزا در شرایط تنش خشکی با استفاده از آزمایش مزرعه‌ای و آزمایشگاهی برای به دست آوردن ژنوتیپ پایدار با بالاترین عملکرد روغن دانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش کشت بافت

استریل نمودن نمونه بذری

نمونه‌های بذری ژنوتیپ‌های کلزا از مرکز تحقیقات دیم سرارود کرمانشاه دریافت گردید. چهارده ژنوتیپ کلزا (جدول ۱) به مدت ده دقیقه با هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد ضد عفونی گردیدند. سپس سه مرتبه هر بار به مدت پنج دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. در نهایت نمونه‌های استریل در زیر هود روی محیط کشت جوانه قرار داده شدند.

جدول ۱. اسامی و منشأ ژنوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیق

No.	Genotype and cultivar	Origin	Spring/Autumn
1	Geronimo	Rostica-france	Autumn
2	Celecious	Svalof	Autumn
3	Milena	Germany	Autumn
4	Sahra	Danisco	Autumn
5	Sunday	Danisco	Autumn
6	Zarfam	Iran	Both
7	Dante	Germany	Autumn
8	SLM-046	Germany	Autumn
9	Talaye	Iran	Autumn
10	Talent	Germany	Autumn
11	ARC2	USA	Autumn
12	Opera	Sweden	Autumn
13	ARC5	USA	Spring
14	Licord	Germany	Spring

تهیه محیط کشت

در این مطالعه از محیط کشت MS به عنوان محیط پایه برای کشت استفاده گردید. به منظور تهیه محیط‌های کشت مورد نظر، ابتدا اقدام به تهیه محلول‌های (استوک) مادری نموده و سپس طبق فرمول محیط مورد نظر تهیه گردید. pH محیط کشت با استفاده از NaOH و HCl روی ۵/۸ تنظیم شد. سپس مقدار مناسب آگار (۷ گرم در لیتر) به آن اضافه نموده و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد رسید محیط کشت در پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری توزیع شد. بعد از بسته شدن محیط کشت، درب پتری‌دیش‌ها با پارافیلیم‌ها بسته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

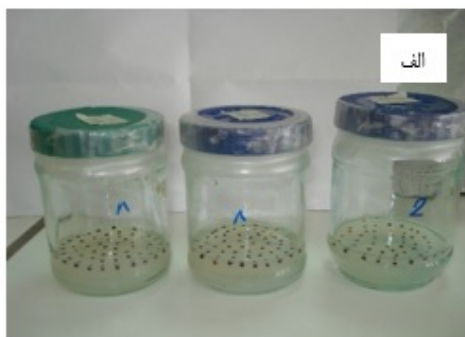
عملکرد) در یک محیط نمی‌تواند معیار مناسبی برای انتخاب باشد. بنابراین ارزیابی ژنوتیپ‌ها باید در محدوده وسیعی از شرایط محیطی (یعنی شرایط محیطی مختلف و چندین ساله) انجام شود تا بتوان با اطلاعات به دست آمده ژنوتیپ یا ژنوتیپ‌های برتر را انتخاب کرد. با بهره‌برداری از پایداری نسبتاً خوب عملکرد روغن در ژنوتیپ‌های کلزا، می‌توان ارقام با عملکرد روغن بالاتر و سازگارتر را شناسایی کرد. کشت و توسعه ارقام با عملکرد روغن بالا و پایداری بیشتر هدف نهایی پرورش دهندگان است (گاوش و زویل، ۱۹۹۶). برای بررسی پایداری، روش‌های چند متغیره مختلفی از جمله تجزیه ارزش منفرد، تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی، تحلیل عاملی، تحلیل خوشه‌ای، تجزیه و تحلیل متمایز، تحلیل الگو، و روش AMMI (اثر اصلی افزایشی و برهمکنش ضربی) پیشنهاد شده‌اند (کراسا، ۱۹۹۰). برای انجام یک آزمایش چند محیطی، معمولاً چندین ژنوتیپ در محیط‌های مختلف (مانند مکان‌ها، سال‌ها و/یا ترکیبی از هر دو) مورد بررسی قرار می‌گیرند، که در نتیجه مناسب‌ترین ژنوتیپ‌ها به محیط‌های خاص توصیه می‌شوند (اولیوتو و همکاران، ۲۰۱۹؛ واعظی و همکاران، ۲۰۱۹). آمار پایداری مبتنی بر AMMI که به طور کامل تعاملات ژنوتیپ به محیط را توصیف می‌کند، به مدل‌های پیچیده یا رویکردهای بیشتری نسبت به ANOVA نیاز دارد. به عنوان یک مدل افزایشی، ANOVA تنها اثرات اصلی را توصیف می‌کند و تعیین می‌نماید که آیا تعامل بین ژنوتیپ و محیط یک منبع ضروری اختلاف است یا خیر. بسیاری از محققین در تجزیه و تحلیل پایداری به روش AMMI در گیاهان دانه‌های روغنی تحقیقاتی داشته‌اند از جمله کوزمانوویچ و همکاران، ۲۰۲۱ که در مطالعه گیاه دانه روغنی کاملینا با استفاده از روش تحلیل پایداری AMMI بیان کردند که روش AMMI در جداسازی و شناسایی چهار لاین بر حسب ثبات و ثبات عملکرد در اروپای جنوب شرقی مؤثر بوده است. در تحقیقی توسط حاج سغایر و همکاران، ۲۰۲۲ تنش خشکی بذر کلزا و جوانه‌زنی آنها را در شرایط مختلف رطوبتی و شرایط اقلیمی مختلف مورد مطالعه قرار دادند. به منظور شناسایی میزان سازگاری لاین‌های جدید با شرایط مختلف محیطی، ارزیابی آنها در قالب آزمایش‌های یکنواختی برای تعیین پایداری عملکرد روغن ژنوتیپ‌ها در مکان‌های متنوع و انتخاب ژنوتیپ‌های پایدار ضروری است (آگاهی و همکاران، ۲۰۲۰). روش GGE بای‌پلات از طریق نمایش گرافیکی اثر متقابل ژنوتیپ × محیط به‌نژادگر کمک می‌کند تا به سادگی پایداری ژنوتیپ‌ها و ترکیب پایداری با عملکرد ژنوتیپ‌ها در محیط‌های مختلف را ارزیابی

محیط جوانه زنی

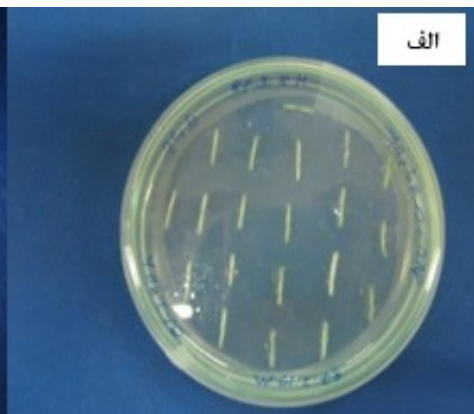
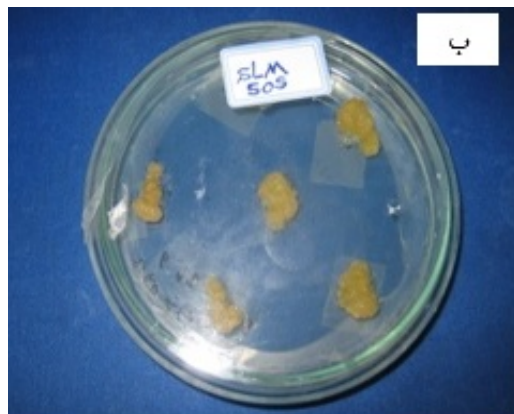
تعداد ۵۰ بذر ضد عفونی شده بر روی محیط MS (موراشیک و اسوک، ۱۹۶۲) حاوی ۳ درصد ساکارز، ۸ درصد آگار و pH برابر ۵/۸ قرار داده شد. بذرها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند (شکل ۱-الف و ب). بعد از ۵ الی ۷ روز، ریز نمونه‌های هیپوکوتیل (در حدود یک سانتی‌متر) از گیاهچه‌ها جدا (شکل ۲-ب) و در محیط کشت القاء کالوس قرار داده شدند.

القاء کالوس

محیط القاء کالوس MS با مقادیر ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA، ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP (تنظیم کننده‌های رشد گیاهی) و حاوی ۳٪ ساکارز، ۸٪ آگار و pH برابر ۵/۸ بود. نمونه‌ها هر دو هفته یکبار به محیط مشابه واگشت (Subculture) (گردیدند و پس از ۴ هفته کالوس‌ها تشکیل شد (شکل ۲-الف و ب)).



شکل ۱. الف) بذر کشت شده روی محیط کشت MS و ب) گیاهچه‌های ۵-۷ روزه مناسب جهت تهیه ریز نمونه



شکل ۲. الف) هیپوکوتیل‌های کشت شده کلزا در محیط کشت القاء کالوس و ب) کالوس‌های حاصل شده از کشت هیپوکوتیل کلزا

اندازه‌گیری پرولین کالوس

ابتدا از هر نمونه میزان پنجاه میلی گرم کالوس را جدا نموده و به آن ۱/۲ میلی متر اسید سولفو سالیسیلیک سه درصد اضافه نموده، سپس سانتی‌یوفیوژ به مدت ده دقیقه با دور ۱۸۰۰۰ را انجام داده و از محلول رویی ۵۰۰ میکرولیتر با سمپلر برداشته به نمونه حاصل یک میلی لیتر آب مقطر، یک میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و یک میلی لیتر معرف نین هیدرین اضافه نموده، و به مدت یک ساعت در بن ماری (حمام آب گرم) ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از زمان مذکور نمونه‌ها را روی یخ گذاشته و پس از اینکه دمای نمونه‌ها به ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای اتاق) رسید به

صفات اندازه‌گیری شده شامل صفات ذیل بود (الخیری و البحرانی، ۲۰۰۴):

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

$$\text{سرعت رشد کالوس (CGR)} = \frac{\text{میانگین قطر کالوس}}{\text{زمان}} \times 100$$

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

از مدل امی و از مولفه‌های اثر متقابل اول و دوم AMMI (IPCA1, IPCA2) به‌عنوان پارامترهای پایداری برای ژنوتیپ‌ها و محیط‌ها استفاده گردید (آنیسچاریکو ۱۹۹۷). جهت انجام آنالیز داده‌های به‌دست آمده و تفسیر اثر متقابل ژنوتیپ × محیط و تعیین ابر محیط‌ها (Mega-environment) از روش GGE بای‌پلات با استفاده از نرم افزار GENSTA استفاده شد. مدل GGE بای‌پلات بر پایه مقادیر ویژه تفکیک‌پذیر برای دو مولفه اول به‌صورت رابطه (۱) است:

$$Y_{ij} - \mu - \beta_j = \lambda_1 \xi_{i1} \eta_{j1} + \lambda_2 \xi_{i2} \eta_{j2} + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

که در این مدل میانگین Y_{ij} میانگین i امین محیط، μ میانگین کل β_j میانگین اثر محیط j ام، λ_1 و λ_2 مقادیر ویژه برای اولین و دومین مولفه، ξ_{i1} و ξ_{i2} بردارهای ویژه ژنوتیپی، η_{j1} و η_{j2} بردارهای محیطی مولفه اول و دوم و ε_{ij} مقدار باقیمانده برای ژنوتیپ i ام هستند (ریگر و پرابهکر ۲۰۰۱).

تجزیه واریانس صفات آزمایش کشت کالوس با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. مقایسه میانگین اثرات متقابل نیز با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد. آنالیز خوشه‌ای مبتنی بر نقشه حرارتی نیز با نرم افزار ClusVis و با استفاده از فاصله اقلیدوسی و روش WARD انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از کشت بافت

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مربوطه در محیط کشت کالوس در سطوح مختلف خشکی در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر صفات محتوای آب نسبی کالوس، سرعت رشد کالوس، رشد نسبی کالوس و محتوای پروتئین کالوس اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد. بین سطوح مختلف خشکی از نظر این صفات اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد، همچنین برای صفات مورد بررسی اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل ژنوتیپ و سطوح مختلف خشکی با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ در جدول ۳ آورده شده است.

معنی‌دار شدن اثر متقابل ژنوتیپ و خشکی از لحاظ سرعت رشد کالوس و رشد نسبی کالوس حاکی از آن است که هر چند میزان رشد نسبی و سرعت رشد کالوس با افزایش غلظت خشکی

آنها ۲ میلی لیتر تولوئن اضافه نموده و جذب محلول رویی نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید (ارابی و همکاران، ۲۰۰۶).

آزمایش مزرعه‌ای

این پژوهش با تعداد ۱۴ ژنوتیپ کلزای پائیزه در دو سایت خشکی و آبی به طور مجزا در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی کرمانشاه در سال زراعی ۱۳۸۷-۱۳۸۶ اجرا گردید. محل اجرای آزمایش در ۴۶ درجه و ۲۰ دقیقه طول شرقی و ۳۴ درجه و ۲۰ دقیقه عرض شمالی قرار دارد. خاک محل آزمایش دارای بافت سیلتی رسی می‌باشد. قطعات زمین محل آزمایش پس از عملیات زراعی لازم و مصرف کود با توجه به نتایج آزمایش تجزیه خاک مورد استفاده قرار گرفت. هر کرت آزمایشی شامل چهار ردیف به طول چهار متر با فواصل ردیف ۳۰ سانتی‌متر و فاصله بین کرت‌ها ۶۰ سانتی‌متر بود. عملیات کاشت در اواخر شهریور ماه انجام شد. بعد از کشت به منظور رسیدن به سطح سبز یکنواخت در هر دو قطعه آبیاری انجام شد. در مراحل بعدی، در قطعه تحت تنش خشکی آبیاری صورت نگرفت ولی قطعه‌ی دیگر در مراحل گلدهی و نیامده‌ی آبیاری گردید. از چهار ردیف دو ردیف به عنوان اثر حاشیه‌ای حذف و از دو ردیف باقیمانده پنج بوته به تصادف انتخاب و صفات درصد روغن و عملکرد دانه به منظور اندازه‌گیری عملکرد روغن اندازه‌گیری شد.

عملکرد روغن

استخراج روغن نمونه‌های بذری چهارده ژنوتیپ کلزا با استفاده از دستگاه سوکسله در آزمایشگاه گروه مهندسی علوم دام دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی انجام شد. عملکرد روغن بعد از اندازه‌گیری درصد روغن و عملکرد دانه از فرمول زیر محاسبه گردید.
درصد روغن × عملکرد دانه = عملکرد روغن

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس داده‌های آزمایش کشت بافت با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 انجام شد، جهت مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای در محیط کشت بافت نیز با نرم افزار R انجام شد. تجزیه امی بر اساس عملکرد روغن در محیط‌های مختلف با استفاده از نرم افزار GENSTA صورت پذیرفت. جهت تجزیه پایداری عملکرد ژنوتیپ‌های مورد بررسی

نظر می‌رسد که ارقام با رشد نسبی کالوس بیشتر از سرعت رشد کالوس بالاتری نیز برخوردار باشند. اما این نکته در مورد برخی ارقام صادق نمی‌باشد. دلیل این مسئله شاید ناشی از این است که معیار سرعت رشد کالوس صفتی کاملاً کمی 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.

در محیط کشت کاهش یافته، لیکن روند این کاهش در بین ارقام متفاوت بوده است. در کل، تنوع زیادی که بین ژنوتیپ‌های کلزا از لحاظ سرعت رشد و رشد نسبی کالوس در سطوح مختلف خشکی 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. این انتظار منطقی به

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده بر روی کالوس تحت تنش خشکی

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییرات
محتوای پرولین کالوس (%)	رشد نسبی کالوس (%)	سرعت رشد کالوس (%)	محتوای آب نسبی کالوس (%)		
۱۶۰۰/۷۱۲**	۱۶۷۲/۸۶۸**	۰/۲۱۵**	۱۵۹۸/۳۵۳**	۱۳	ژنوتیپ
۱۲۵۰۹/۸۰۳**	۲۵۰۹۷/۲۸۷**	۱/۰۱۶**	۱۵۶۳۶/۵۸۱**	۴	سطوح خشکی
۹۲/۴۱۳**	۲۲۸/۴۷۴**	۰/۰۱۱**	۲۵۶/۱۸۴**	۵۲	ژنوتیپ × خشکی
۱/۹۸۴	۰/۶۱۲	۰/۰۰۰۲	۱/۳۷۱	۱۴۰	خطای آزمایشی
۲/۷۶	۲/۱۷	۲/۸۸	۲/۲۹		CV%

** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ با آزمون LSD در خشکی در کشت کالوس

ژنوتیپ	خشکی	محتوای پرولین کالوس (میلی گرم / گرم وزن خشک)	رشد نسبی کالوس (درصد)	سرعت رشد کالوس (درصد)	محتوای آب نسبی کالوس (درصد)
Geronimo	.	۹۸/۱۲b	-۵۴/۰۲c	-۱/۲۴de	۳۶/۷۲z
Celecious	.	۱۱۸/۷a	-۷۷/۴۱e	-۱/۲۴de	۵۲/۶۲b
Milena	.	۳۴/۰۲i	-۴/۳۱c	۰/۵۸۹i	۷۴/۷d
Sahra	.	۴۱/۹۱yz	-۲۷/۰۷mn	۰/۳۸۹i	۶۱/۷۱gh
Sunday	.	۵۲/۱۸n-q	-۳۷/۸۱s	۰/۳۹cd	۵۸/۱۲i-l
Zarfam	.	۶۰/۹۲ij	-۵۰/۹۲xy	۰/۲۵۸a	۴۱/۷۱w
Dante	.	۷۲/۵f	۰/۲۲۲۹a	۱/۰۵۹cd	۹۶/۳a
SLM-046	.	۳۴/۰۲i	-۲۶/۳۱m	۰/۲۶fg	۹۲/۴۱b
Talaye	.	۴۳/۲۵w-z	-۲۷/۸۲n	۰/۶۵۲jk	۸۴/۵۲c
Talent	.	۵۱/۲۸o-r	-۶۳/۲۱i	۰/۵۸/t-w	۶۶/۲e
ARC2	.	۶۳/۰۲hi	-۶۸/۰۲c	۰/۴۶i	۵۵/۰۲m-o
Opera	.	۷۷/۲۱e	-۷۶/۸۱e	۰/۳۸i-k	۳۵/۱i
ARC5	.	۲۵/۱b	-۳/۱۷۶c	۰/۵۹i	۵۹/۶۲h-j
Licord	.	۳۷/۳i	-۲۰/۲۱j	۰/۳۹۸i-k	۳۲/۶۲j
Geronimo	-/۱۰	۶۲/۹۸hi	-۶۸/۰۶c	۰/۲۲e	۱۲/۹۴ef
Celecious	-/۱۰	۲۲/۷۲b	-۷/۵۴d-f	۰/۵۹i-k	۳۱/۵۹i
Milena	-/۱۰	۴۵/۰۲u-y	-۱۴/۱۸h	۰/۳۸i	۵۲/۷۱o-q
Sahra	-/۱۰	۵۸/۶۱jk	-۲۶/۲۷m	۰/۳۱ab	۳۲/۱۸i
Sunday	-/۱۰	۶۸/۷۱g	-۵۴/۹۱i	۰/۲۸abc	۱۴/۰۱de
Zarfam	-/۱۰	۹۲/۴۶c	-۶۱/۵i	۰/۲۷cd	۱۰/۹۲f
Dante	-/۱۰	۴۵/۵۸t-x	-۱۹/۸۴j	۰/۶۹ode	۵۶/۸۷j-m
SLM-046	-/۱۰	۵۶/۲۵k-m	-۲۱/۹۶k	۰/۴۶۵t-w	۵۵/۵۱-l-n
Talaye	-/۱۰	۵۶/۲۲k-m	-۴۱/۶۴u	۰/۵۰۷n-s	۳۷/۸۲yz
Talent	-/۱۰	۵۵/۸۷i	-۲۳/۵i	۰/۵۵۶k-m	۴۵/۹۲uv
ARC2	-/۱۰	۳۹/۰۸yz	-۳۴/۶۳q	۰/۶۵۲fg	۵۸/۲۵i-l
Opera	-/۱۰	۴۱/۷۲t-t	-۴۵/۱w	۰/۴۵۵u-x	۵۶/۳۹k-m
ARC5	-/۱۰	۴۸/۶۸v-z	-۴۹/۷x	۰/۶۳۳gh	۳۴/۴i

ادامه جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل ژنوتیپ با آزمون LSD در خشکی در کشت کالوس

ژنوتیپ	خشکی	محتوای پرولین کالوس (میلی گرم / گرم وزن خشک)	رشد نسبی کالوس (درصد)	سرعت رشد کالوس (درصد)	محتوای آب نسبی کالوس (درصد)
Licord	۰/۱۰	۴۳/۵۲p-s	-۴۹/۶۵x	۰/۵۰۲n-s	۵۱/۷۷p-r
Geronimo	۰/۲۰	۴۹/۸۸d	-۲۷/۷۸n	۰/۵۱۳n-q	۵۸/۴۲i-k
Celecious	۰/۲۰	۸۳/۳۶n-q	-۳۴/۲۶q	۰/۴۱۶yz	۵۳/۲۱i-k
Milena	۰/۲۰	۵۲/۲۹m-p	-۳۷/۱rs	۰/۳۸۱i	۶۶/۶۶n-p
Sahra	۰/۲۰	۵۳/۲۱t-w	-۵۲/۶۹z	۰/۶۲۳g-i	۳۱/۶۱e
Sunday	۰/۲۰	۴۵/۷۱kl	-۴۴/۴۱vw	۰/۳۳۶a	۴۱/۴۸i
Zarfam	۰/۲۰	۵۶/۸۵d	-۳۲/۷۷p	۰/۳۵۸m	۳۰/۲۳wx
Dante	۰/۲۰	۰/۳۶۳7z	-۰/۲۰۲a	۰/۰۰۳af	۶۰/۷۹g
SLM-046	۰/۲۰	۴۰/۸۹q-s	-۱۹/۵۹j	۰/۵۷۳jk	۵۲/۰۹g-i
Talaye	۰/۲۰	۴۹/۷	-۳۶/۲۸r	۰/۴۸۶q-u	۵۲/۰۹p-r
Talent	۰/۲۰	۶۰/۰۹f	-۵۱/۱y	۰/۴۱۶yz	۳۸/۰۱yz
ARC2	۰/۲۰	۷۳/۰۶d	-۶۴/۷۲a	۰/۳۶۳y	۲۹/۶۸a
Opera	۰/۲۰	۰/۲۰۳i	-۸۱/۶۴v	۰/۰۰۲۱f	۰/۱۶۹g
ARC5	۰/۲۰	۳۹/۰۶z	-۶/۷۳vd	۰/۷۱۹cd	۶۳/۳۲fg
Licord	۰/۲۰	۴۱/۲۸i	-۱۸/۲۸	۰/۶۳gh	۵۸/۸۴-k
Geronimo	۰/۳۰	۳۸/۳۸i	-۸/۶۱۷f	۰/۵۵۴k-m	۷۴/۳۱d
Celecious	۰/۳۰	۴۳/۰۷w-z	-۱۲/۰۶g	۰/۵۲۴m-p	۵۷/۲-m
Milena	۰/۳۰	۵۲/۳n-q	-۱۷/۷۳i	۰/۴۹۵o-t	۵۵/۵۳l-n
Sahra	۰/۳۰	۶۴/۶۵h	-۳۰/۷o	۰/۴۰۳z	۴۹/۴۶r-t
Sunday	۰/۳۰	۸۲/۸۵d	-۴۰/۷tu	۰/۳۵۲i	۴۰/۹۸wx
Zarfam	۰/۳۰	۴۲/۲۲x-z	-۱۵/۰۵h	۰/۶۸ef	۶۲/۷۳g
Dante	۰/۳۰	۴۷/۴۴s-u	-۳۶/۷rs	۰/۵۶kl	4۴۹/۴۶r-t
SLM-046	۰/۳۰	۵۴/۲۸l-o	-۴۴/۶۴w	۰/۴۷۳s-v	۴۱/۱۶wx
Talaye	۰/۳۰	۶۵/۳۲h	-۵۰/۵۵xy	۰/۴۴۳v-y	۱۹/۶۳c
Talent	۰/۳۰	۷۱/۸۵f	-۶۱/۲۷i	۰/۳۸i	۶۱/۱۱d
ARC2	۰/۳۰	۳۸/۲۹i	-۳/۴۴c	۰/۶۵fg	۵۴/۴۷m-p
Opera	۰/۳۰	۴۲/۰۳yz	-۴/۳۶c	۰/۶۰۸h-j	۴۹/۵۴r-t
ARC5	۰/۳۰	۵۱/۸۶o-r	-۲۱/۷۸k	۰/۵۳۶l-n	۴۸/۰۶s-u
Licord	۰/۳۰	۶۲/۸۴hi	-۳۶/۰۹r	۰/۵۱n-r	۴۲/۲۶w
Geronimo	۰/۴۰	۲۸/۵۴a	-۸/۱۵ef	۰/۷۱۶cd	۷۴/۱d
Celecious	۰/۴۰	۳۷/۵۸i	-۳۲/۶۹p	۰/۵۹j-k	۴۶/۵۹uv
Milena	۰/۴۰	۴۸/۹۴q-t	-۶۰/۰۱i	۰/۵۳l-o	۴۰/۱۲w-y
Sahra	۰/۴۰	۶۲/۹۵hi	-۶۵/۱۴ab	۰/۴۹p-v	۳۸/۲۵yz
Sunday	۰/۴۰	۲۳/۷۵b	-۱/۸۳b	۰/۷۰۲de	۶۵/۶۴ef
Zarfam	۰/۴۰	۳۸/۰۲i	-۳۷/۱۵rs	۰/۴۳۶v-z	۶۰/۷۵g-i
Dante	۰/۴۰	۴۲/۴۷w-z	-۵۳/۵۲i	۰/۴۱yz	۵۸/۵۱i-k
SLM-046	۰/۴۰	۴۸/۵۸r-t	-۵۹/۹۱i	۰/۳۸i	۵۰/۵q-s
Talaye	۰/۴۰	۵۵/۸۱k-m	-۷۳/۰۸d	۰/۳۴i	۴۶/۹۹t-v
Talent	۰/۴۰	۴۱/۱۹z	-۱/۱۹b	۰/۹۵b	۴۱/۵۴w
ARC2	۰/۴۰	۴۱/۳۳z	-۴۳/۱۵v	۰/۷۲۶cd	۳۸/۷۱x-z
Opera	۰/۴۰	۴۵/۱u-y	-۵۸/۶۷i	۰/۷۳۳g-i	۳۵/۱۴i
ARC5	۰/۴۰	۵۵/۲۴k-n	-۶۲/۰۵i	۰/۴۶۶t-w	۳۱/۲۲i
Licord	۰/۴۰	۶۰/۵۵ij	-۸۳/۵۳f	۰/۳۹۳i	۲۵/۴b

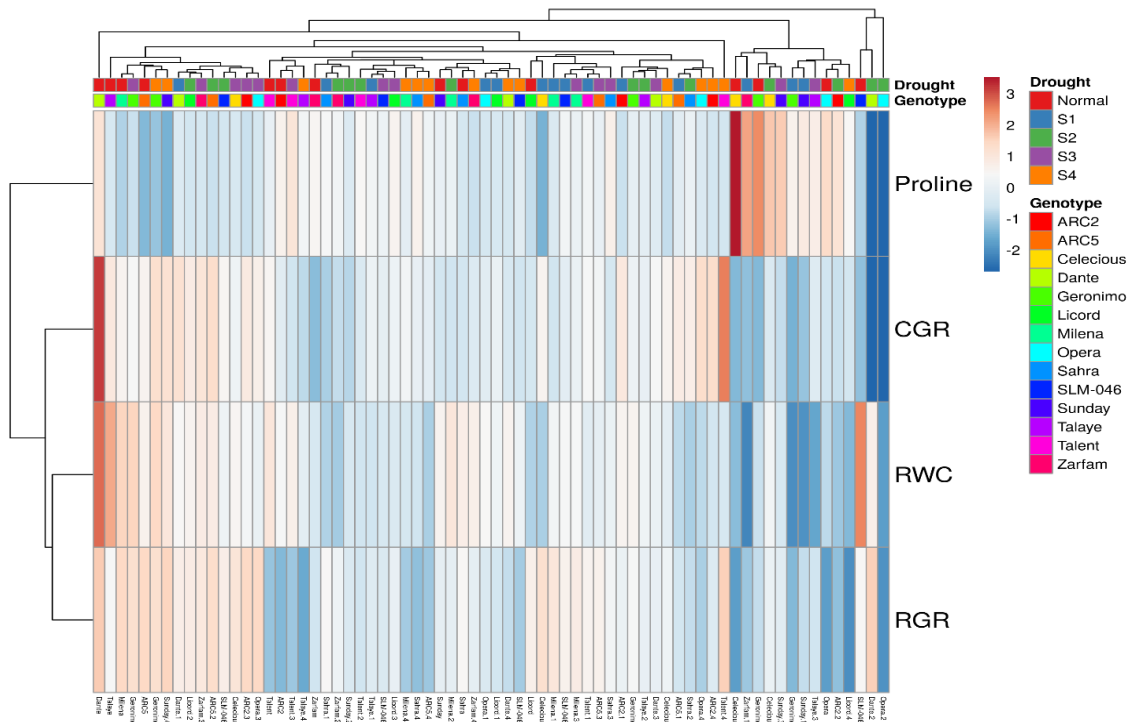
تجزیه خوشه‌ای بر اساس کشت بافت

نتایج آنالیز خوشه‌ای همراه با نقشه حرارتی (شکل ۳) نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس سطوح مختلف تنش در دو گروه مجزا قرار گرفتند. بطوری که ژنوتیپ‌های 'opera' و Dante و

SLM-046 در یک گروه قرار گرفتند و مابقی ژنوتیپ‌ها در گروه دوم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های Dante و SLM-046 بر اساس پارامترهای پایداری (جدول ۳) نیز جزو ژنوتیپ‌های پایدار می‌باشند. محتوای آب نسبی کالوس با افزایش سطح خشکی

دوروم به سطوح مختلف تنش خشکی نتایج نشان داد 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، ۲۰۰۴). در مطالعه کالوس‌های نخل روغنی به سطوح مختلف تنش خشکی 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 (الخیری و البحرانی، ۲۰۰۴). در مطالعه بر روی کالوس‌های به دست آمده از نیشکر در سطوح مختلف تنش خشکی نتایج بدست آمده نشان داد که محتوای آب نسبی و رشد نسبی کالوس در سطوح بالای تنش خشکی کاهش می‌یابد ولی محتوای پرولین کالوس با افزایش تنش افزایش می‌یابد (ارابی و همکاران، ۲۰۰۶).

کاهش یافت و ژنوتیپ شماره ۷ از محتوای آب نسبی کالوس بالاتری (۳۰/۹۶ درصد) در سطح شاهد برخوردار بود. سرعت رشد کالوس با افزایش سطح خشکی کاهش یافت و ژنوتیپ شماره ۷ بیشترین سرعت رشد کالوس (۱/۰۵۹) را در سطوح مختلف خشکی نشان داد. رشد نسبی کالوس با افزایش سطح خشکی کاهش یافت و ژنوتیپ شماره ۷ رشد نسبی کالوس بالاتری (۰/۱۱۳۹) را نشان داد. در مورد صفت پرولین کالوس، با افزایش سطوح خشکی روند صعودی مشاهده شد. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است افزایش محتوای پرولین کالوس با افزایش سطح تنش بر اساس شدت رنگ مشخص است (شکل ۴) و ژنوتیپ شماره ۴ دارای بالاترین (۱۱۸/۷) میزان پرولین کالوس در بالاترین سطح خشکی (۴۰٪) بود. در مطالعه کالوس‌های گندم



شکل ۳. آنالیز خوشه‌ای همراه با نقشه حرارتی ژنوتیپ‌های کلزا بر اساس صفات اندازه‌گیری شده کالوس: Normal: سطح بدون تنش، S1: سطح تنش ۱۰٪، S2: سطح تنش ۲۰٪، S3: سطح تنش ۳۰٪ و S4: سطح تنش ۴۰٪.



شکل ۴. افزایش محتوای پرولین بر اساس شدت رنگ

نشان دهنده اثر متقابل معنی‌دار برای ژنوتیپ‌ها در مکان‌های مختلف محیطی بود. وجود تنوع بالا در بین ژنوتیپ‌ها و محیط‌های مختلف امکان ارزیابی پایداری ژنوتیپ‌ها یا ژنوتیپ‌های برتر را فراهم می‌کند. تنوع بالا در برنامه‌های اصلاحی لازم و انتخاب ژنوتیپ‌های پایدار امکان‌پذیر است. نتایج اثرات افزایشی تجمی (تجزیه واریانس) و اثرات متقابل ضربی (تجزیه به اجزای اصلی) نشان داد که دو مولفه اول $53/02$ و $33/65$ درصد از واریانس اثر متقابل را برای روغن عملکرد تبیین کردند. بر اساس مطالعات انجام شده، دو جزء اثر متقابل ژنوتیپ \times محیط باید حداقل 60 درصد از تغییرات اثر متقابل را توجیه کند تا بتوان بر اساس آن ژنوتیپ‌های پایدار را شناسایی کرد (یانگ و همکاران، 2009). بر اساس شکل ۵، دو پلات میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها در برابر مقادیر IPCA1، ژنوتیپ‌های Dante و SLM-046 دارای مقادیر IPCA1 نزدیک به صفر بوده و از ثبات عملکردی و سازگاری عمومی خوبی برخوردار بودند، در حالی که ژنوتیپ‌های ARC5 دارای بالاترین مقادیر منفی IPCA1 و به عنوان ژنوتیپ ناپایدار شناسایی شد. بای پلات میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها در برابر مقادیر IPCA2 (شکل ۶) نشان داد که ژنوتیپ‌های Talent و SLM-046 دارای مقادیر IPCA2 نزدیک به صفر بودند، ژنوتیپ‌هایی که عملکرد کمتری دارند اما دارای مقادیر مثبت برای مولفه‌های اصلی اثر متقابل هستند، در محیط‌های فقیر مناسب هستند، به عبارت دیگر، اثر متقابل مثبتی با مناطق فقیر دارند (چقاكبودی و همکاران، 2021).

جدول ۵. تجزیه واریانس مرکب برای عملکرد روغن در شرایط دیم و آبی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
مکان	۳	0.641717^{**}
خطای اول	۱۳	0.87377^{**}
ژنوتیپ	۱۳	$28724/6^{**}$
ژنوتیپ \times مکان	۳۹	$29493/7^{**}$
خطای دوم	۲۶	$552/08^{ns}$
کل	۵۵	

ns، * و ** به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد.

شکل ۵ یک بای پلات از میانگین عملکرد روغن ژنوتیپ‌ها در مقابل IPCA1 را نشان می‌دهد و همچنین شکل ۶ را نشان می‌دهد که یک بای پلات از دو جزء IPCA1 و IPCA2 است. به گفته ابره‌ه‌ارت و راسل (1966)، ژنوتیپی دارای یک شیب واحد، مقدار کمی در انحراف از رگرسیون (S2di) و مقادیر عملکرد بالا در مکان‌های مختلف به عنوان پایدار شناخته می‌شود. نتایج

تجزیه همبستگی صفات اندازه‌گیری شده در کشت بافت

نتایج تجزیه همبستگی صفات مورد مطالعه در آزمون کشت کالوس بر اساس ضرایب پیرسون در جدول ۳ ارائه شده است. بین صفات محتوای آب نسبی کالوس و رشد نسبی کالوس (0.70^{**}) همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد. همچنین بین صفات سرعت رشد کالوس و رشد نسبی کالوس (0.85^{**}) همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد. هر چه رشد نسبی کالوس بیشتر باشد سرعت رشد هم بیشتر می‌شود. نتایج به دست آمده با نتایج سهیلی (1387) و قاسم‌پور و همکاران (2008) مطابق بود.

جدول ۴. همبستگی صفات مورد مطالعه در کشت بافت

	(۱)	(۲)	(۳)	(۴)
محتوای آب نسبی کالوس (۱)	۱			
سرعت رشد کالوس (۲)	0.401	۱		
رشد نسبی کالوس (۳)	0.70^{**}	0.85^{**}	۱	
محتوای پروتئین کالوس (۴)	0.15	-0.344	-0.167	۱

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

نتایج آزمایش مزرعه

نتایج تجزیه واریانس مرکب (جدول ۵) حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار برای ژنوتیپ، محیط و اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط برای عملکرد روغن بود. از آنجایی که کلزا محصولی است که سازگاری محیطی وسیعی دارد، نتایج کنونی ممکن است به برنامه‌های اصلاحی آبی برای استقرار ارقام با قدرت عملکرد بالاتر، محتوای روغن دانه بیشتر و سازگاری بهتر با شرایط مختلف محیطی کمک کند. تحقیقات مشابهی در مورد سازگاری و پایداری عملکرد دانه با استفاده از روش‌های مختلف پایداری در کلزا انجام شده است. در مطالعه 19 ژنوتیپ کلزا در مدت 7 سال با کمک مدل AMMI، ژنوتیپ‌های با پتانسیل ژنتیکی پرمحصول با فصول دارای شرایط رشد ایده آل همبستگی مثبت داشتند، در حالی که ژنوتیپ‌های با مقادیر کم با سال‌هایی که شرایط نامطلوب داشتند مرتبط بودند (جروملا و همکاران، 2011). آنها همچنین گفتند که عملکرد دانه در بوته به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی است که نشان دهنده سازگاری ژنوتیپ‌های خاص با فصول خاص است. در مطالعه ما، عملکرد روغن در شرایط تنش خشکی کاهش یافت.

نتایج تجزیه واریانس AMMI (جدول ۵) نیز وجود تنوع بالایی را در از لحاظ عملکرد روغن بین ژنوتیپ‌ها نشان داد که

جدول ۷. پارامترهای پایداری برای عملکرد روغن در ژنوتیپ‌های کلزا

شماره	ژنوتیپ	عملکرد روغن (kg/ha)	CVi	bi	S2di	Wi
۱	Geronimo	۱۳۹/۳۸	۱۵/۵۸	-۰/۶۹	۱۴۶/۶۳	۸۷/۷۹
۲	Celecious	۱۴۰/۵۸	۳۰/۲۹	۱/۴۲	۳۵۳/۰۰	۷۹/۴۰
۳	Milena	۱۱۲/۵۳	۱۷/۱۱	-۰/۶۱	۱۰۹/۸۲	۷۰/۶۲
۴	Sahra	۱۴۲/۳۷	۱۱/۸۴	-۰/۵۲	۹۷/۴۳	۸۶/۵۸
۵	Sunday	۱۲۱/۵۵	۲۹/۰۱	۱/۲۳	۸۷/۱۷	۷۳/۸۱
۶	Zarfam	۱۳۵/۵۸	۱۳/۲۸	-۰/۵۴	۱۳۲/۴۸	۸۲/۷۳
۷	Dnate	۱۴۵/۷۷	۲۱/۸۱	۱/۱۳	۳/۶۸	۱۰۳/۴۶
۸	SLM-046	۱۵۸/۲۱	۱۵/۳۶	-۰/۸۶	۱۱/۵۷	۱۰۶/۷۴
۹	Talaye	۱۲۹/۰۱۴	۳۰/۲۳	۱/۳۹	۱۶/۶۹	۷۷/۷۵
۱۰	Talent	۱۳۵/۴۲	۳۵/۰۱	۱/۷	۸/۶۹	۷۳/۲۵
۱۱	ARC2	۱۲۱/۷۱	۲۹/۵۵	۱/۲۳	۱۵۶/۲۵	۶۹/۹۱
۱۲	Oprea	۱۴۱/۵۸	۲۴/۵۰	۱/۱۳	۳۰۹/۸۱	۸۸/۱۳
۱۳	ARC5	۱۴۰/۵۳	۶/۶۴	-۰/۲۵	۴۸/۹۹	۷۸/۱۸
۱۴	Licord	۱۲۷/۹۳	۲۸/۴۵	۱/۲۶	۱۳۴/۳۴	۷۸/۱۲

CVi: ضریب تغییرات محیطی، bi: ضریب رگرسیون، S2di: انحراف از رگرسیون، Wi: اکووالانس ری

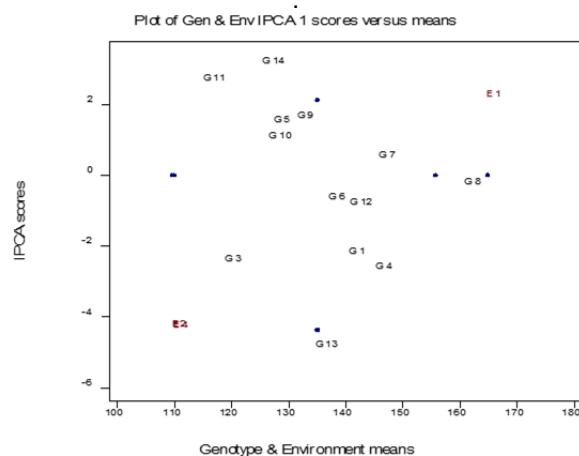
نمایش چند ضلعی حاصل از تجزیه و تحلیل GGE ژنوتیپ‌های *Brassica napus* در چهار محیط در شکل ۶ نشان داده شده است. در این نمودار، ژنوتیپ‌ها و محیط‌ها بر اساس مقادیر مؤلفه‌های اصلی اول و دوم مشخص شده‌اند. آنهایی که به مبدأ مختصات نزدیک هستند (نزدیک به صفر) از نظر مقادیر اولین و دومین مؤلفه اصلی کمترین اثر متقابل را دارند. این نمودار (مؤلفه‌های اصلی اول و دوم اثر متقابل) ۸۶/۶۷ درصد از واریانس اثر متقابل ژنوتیپ و محیط را توجیه می‌کند. در این نمودار ژنوتیپ‌هایی که در مجاورت یک مکان قرار دارند با آن محیط سازگاری خصوصی دارند و ژنوتیپ‌هایی که در نزدیکی مبدأ مختصات قرار دارند سازگاری عمومی دارند. در این تحقیق ژنوتیپ شماره ۶ (زرغام) نزدیکترین ژنوتیپ به مبدأ مختصات بود و به عنوان پایدارترین ژنوتیپ شناسایی شد (استواناتو و همکاران، ۲۰۱۵).

خط موربی که از مرکز دو پلات و نقطه ایده‌آل (که نماینده متوسط ضرایب دو مؤلفه اول اثر متقابل در مدل GGE بای‌پلات است) می‌گذرد، خط هماهنگی محیط متوسط نامیده می‌شود. ژنوتیپ‌هایی که در این خط به مرکز دایره نزدیکتر هستند عملکرد بیشتری دارند. خطی که بر خط متوسط تابع محیطی عمود است و از مرکز دو پلات می‌گذرد، معیار سنجش پایداری ژنوتیپ‌ها است. هر چه ژنوتیپ‌ها بیشتر از این خط فاصله داشته باشند، نقش بیشتری در برهمکنش خواهند داشت و پایداری کمتری خواهند داشت. در این مطالعه دو ژنوتیپ SLM-046 و ARC5 دارای میانگین عملکرد روغن بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بودند، اما به دلیل فاصله از خط ACE به عنوان یکی از ژنوتیپ‌های با پایداری پایین شناخته شدند (شکل ۷).

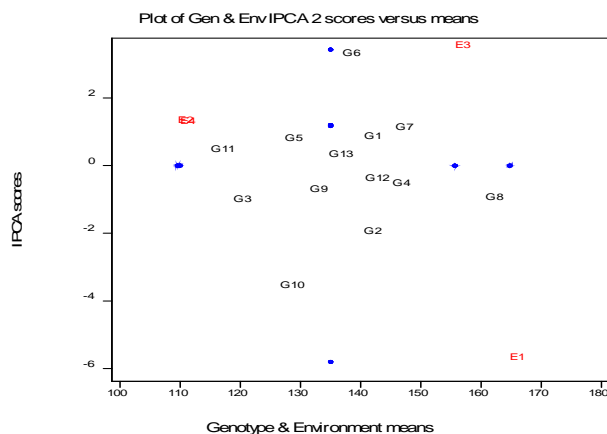
پارامترهای پایداری (جدول ۷) نشان داد که ضرایب رگرسیون برای صفت عملکرد روغن از ۰/۲۵ تا ۱/۷ متغیر بود. ژنوتیپ Dante و SLM046 با S2di پایین و ضریب رگرسیون ($bi > 1$) پایین دارای عملکرد روغن مطلوب و ژنوتیپ Talye با ضریب S2di پایین و ضریب رگرسیون ($bi > 1$) کمترین میانگین عملکرد را داشتند. ژنوتیپ‌های Geronimo و Zarfam با S2di پایین، ضریب رگرسیون ($bi \sim 1$) و میانگین عملکرد، با سازگاری عمومی نسبتاً ضعیف برای شرایط آبی و دیم پایدار بودند (چقاکودی و همکاران، ۲۰۲۱).

جدول ۸. تجزیه AMMI بر اساس عملکرد روغن کلزا

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
ژنوتیپ	۱۳	۱۱۶/۸۷	۸/۹۹**
محیط	۳	۷۹۴/۷	۲۶۴/۹**
ژنوتیپ × مکان	۳۹	۱۱۵۰۲۵۴/۳	۲۹۴۹۳/۷**
IPCA1	۱۵	۱۶۲/۷۵	۱۰/۸۵**
IPCA2	۱۳	۸۸/۴	۶/۸۰**
IPCA3	۱۱	۱۶/۶۱	۱/۵۱ ^{ns}



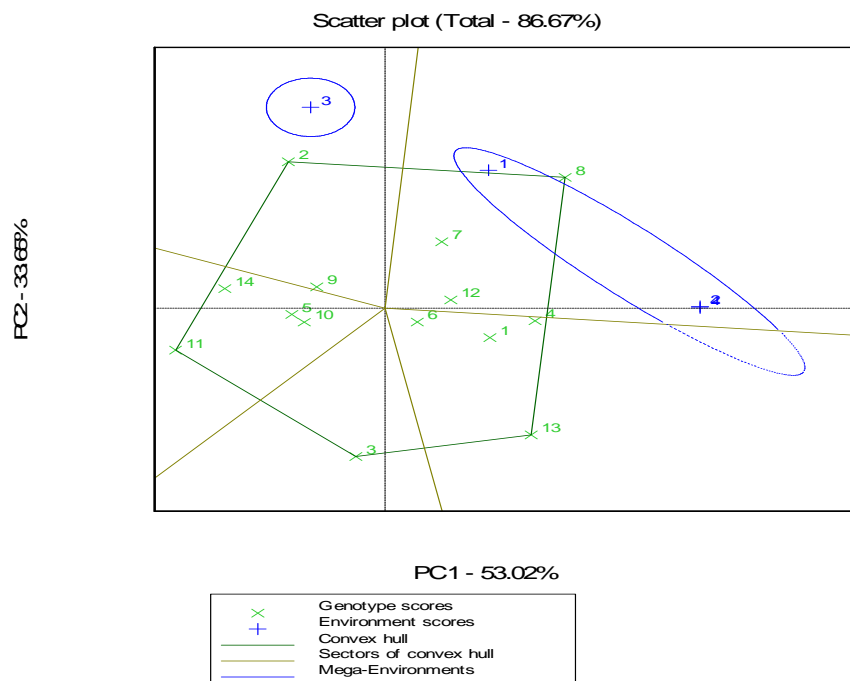
شکل ۵. بای‌پلات متوسط عملکرد روغن ژنوتیپ‌ها در مقابل مقادیر IPCA1



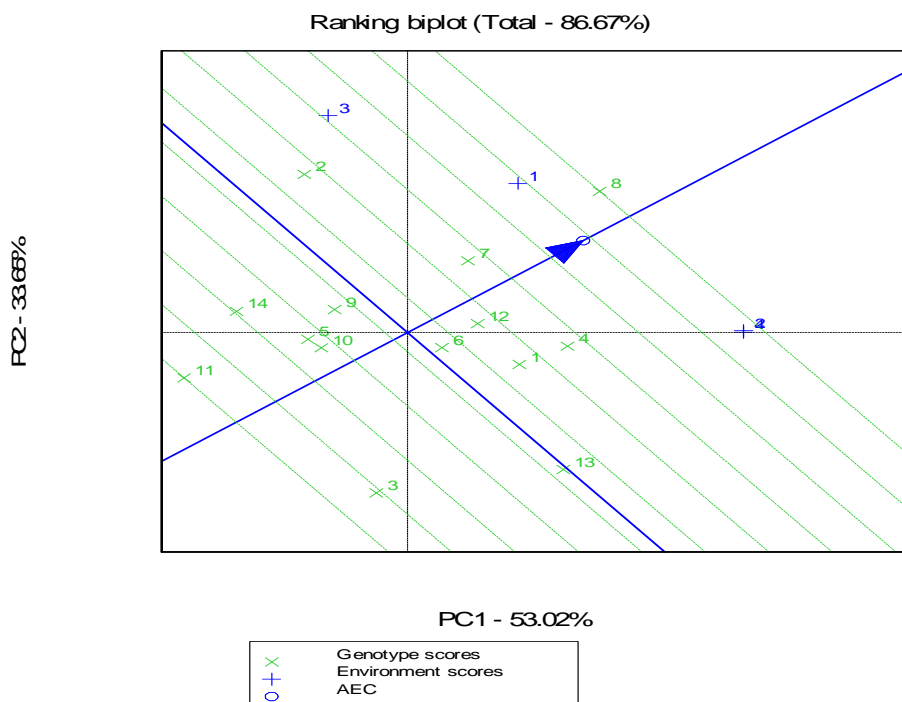
شکل ۶. بای‌پلات متوسط عملکرد روغن ژنوتیپ‌ها در مقابل مقادیر IPCA2

این تحقیق، ژنوتیپ‌های SLM-046 به دلیل مجاورت با لاین ACE، ژنوتیپ‌های پایدار بودند. برای استفاده از ژنوتیپ ایده‌آل به عنوان مرجع ارزیابی، دایره‌های متحدالمرکزی در دو پلات ایجاد شده‌اند تا به صورت گرافیکی فاصله بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و ژنوتیپ ایده‌آل مشخص شود (شکل ۸).

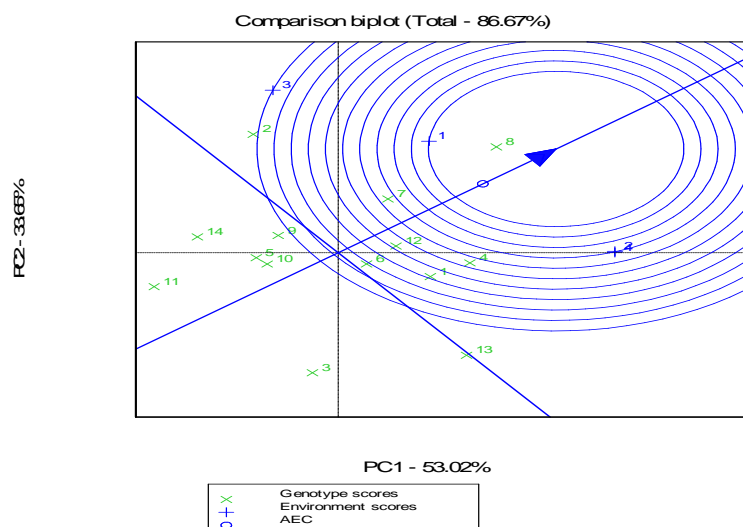
دایره کوچک در شکل ۸ که در محور افقی ACE قرار دارد و با فلش نشان داده شده است نشان دهنده شکل ایده‌آل است که با دو معیار تعریف می‌شود: (۱) داشتن بالاترین عملکرد در محیط‌ها بررسی شده است و (۲) آن نسبت به شرایط محیطی کاملاً پایدار است زیرا روی محور افقی ACE قرار می‌گیرند.



شکل ۶. نمایش گرافیکی GGE بای پلات جهت تعیین برتری کدام ژنوتیپ(ها) در کدام محیط(ها) برای ژنوتیپ‌های کلزا



شکل ۷. خط متوسط عملکرد محیطی در مقایسه ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس عملکرد روغن و پایداری در چهار محیط آزمایشی



شکل ۸. ارزیابی ژنوتیپ مورد بررسی نسبت به ژنوتیپ ایده‌آل در چهار محیط مورد آزمایش بر اساس عملکرد روغن

نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های Dante و SLM-046 در یک گروه و بقیه ژنوتیپ‌ها در گروه دوم قرار گرفتند. صفات اندازه‌گیری شده در کشت کالوس نشان داد که ژنوتیپ Dante در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس AMMI نیز وجود تنوع بالایی را برای صفت عملکرد روغن در بین ژنوتیپ‌ها نشان داد که نشان‌دهنده اثر متقابل معنی‌دار برای ژنوتیپ‌ها در مکان‌های مختلف محیطی بود. نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد که دو مولفه اول ۵۳/۰۲ و ۳۳/۶۵ درصد از واریانس اثر متقابل را برای روغن عملکرد تبیین کردند. بر اساس بای‌پلات میانگین عملکرد ژنوتیپ‌ها در برابر مقادیر IPCA1، ژنوتیپ‌های Dante و SLM-046 دارای مقادیر IPCA1 نزدیک به صفر بوده و از ثبات عملکردی و سازگاری عمومی خوبی برخوردار بودند، در حالی که ژنوتیپ‌های ARC5 دارای بالاترین مقادیر منفی IPCA1 و به عنوان ژنوتیپ ناپایدار شناسایی شد. همچنین پیشنهاد می‌شود که ژنوتیپ‌های دارای رشد نسبی پایین و حساس به خشکی در مطالعات فیزیولوژیک و ژنتیکی تحمل خشکی به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گیرند. مطالعات فیزیولوژیک و ژنتیکی بیشتری در رابطه با ژنوتیپ‌های متحمل توصیه می‌گردد. ژنوتیپ‌های معرفی شده در برنامه‌های به‌نژادی آینده کلزا، در شرایط مزرعه یا آزمایشگاه برای بررسی تحمل خشکی به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همه‌ی عزیزانی که در اتمام این گزارش همکاری نمودند و به ویژه دانشگاه رازی کرمانشاه بخاطر فراهم نمودن امکانات انجام این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

دایره‌های متحدالمرکز، با ژنوتیپ ایده‌آل در مرکز، به تجسم فاصله بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و رقم ایده‌آل کمک می‌کند. بر این اساس، ژنوتیپ‌های شماره صحرا، دانته و اوپرا نزدیک‌ترین ژنوتیپ به ژنوتیپ ایده‌آل بودند و از همه ژنوتیپ‌ها مطلوب‌تر بودند. از طرفی ژنوتیپ‌های ARC2 و Licord (شاهد حساس) به‌عنوان نامطلوب‌ترین ژنوتیپ‌ها تعیین شدند، زیرا بیشترین فاصله را از رقم ایده‌آل داشتند (SLM-046).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در مطالعه حاضر ارقامی که دارای پایین‌ترین رشد نسبی کالوس در محیط کشت تنش خشکی بودند را می‌توان به عنوان کم تحمل‌ترین ارقام نسبت به خشکی در سطح سلولی دسته‌بندی نمود. از معیار سرعت رشد کالوس و رشد نسبی کالوس برای ارزیابی واکنش کالوس نسبت به خشکی در محیط درون شیشه‌ای استفاده شد و چنین نتیجه‌گیری شد که معیار سرعت رشد کالوس و رشد نسبی کالوس چون بر اساس وزن تر کالوس محاسبه می‌گردند صفت کمی محسوب می‌شوند و نتایج حاصل از آنها به واقعیت نزدیک‌تر است. در کل، تنوع زیادی که بین ژنوتیپ‌های کلزا از لحاظ سرعت رشد و رشد نسبی کالوس در سطوح مختلف خشکی 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. بر اساس نتایج آنالیز خوشه‌ای همراه با نقشه حرارتی بر اساس صفات اندازه‌گیری شده در آزمون کشت کالوس در سطوح مختلف تنش

References

- Al-Khayri, J. M., & Al-Bahrany, A. M. (2004). Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. *Biologia Plantarum*, 48(1), 105-108.
- Agahi, K., Ahmadi, J., Oghan, H. A., Fotokian, M. H., & Orang, S. F. (2020). Analysis of genotype× environment interaction for seed yield in spring oilseed rape using the AMMI model. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 20, e26502012.
- Annicchiarico P. (1997). Joint regression vs AMMI analysis of genotype-environment interactions for cereals in Italy. *Euphytica*, 94: 53-62.
- Araus, J. L., Slafer, G. A., Reynolds, M. P., & Royo, C. (2002). Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for?. *Annals of botany*, 89(7), 925-940.
- Chaghakaboodi, Z., Kakaei, M., Zebarjadi, A., Kahrizi, D., & Karatas, A. (2021). Biplot Analysis of Genotype-Environment Interaction in Rapeseed (*Brassica napus* L.) in Two Normal and Stress Condition Using the AMMI Model. *Desert*, 26(2), 279-285.
- Clarke, J. M., DePauw, R. M., & Townley-Smith, T. F. (1992). Evaluation of methods for quantification of drought tolerance in wheat. *Crop Science*, 32(3), 723-728.
- Crossa, J. (1990). Statistical analyses of multilocation trials. *Advances in agronomy*, 44, 55-85.
- Eberhart, S. T., & Russell, W. A. (1966). Stability parameters for comparing varieties 1. *Crop science*, 6(1), 36-40.
- Gauch, H. G., & Kang, M. S. (1996). *Genotype by environment interaction*. CRC Press.
- Ghasemi, S. H., Mostafavi, K., Khosroshahi, M., & Ramshini, H. (2021). Investigation of Grain yield Stability in Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars using GGE-biplot Method. *Journal of Crop Breeding*, 13(40), 11-20.
- Ghasempour, H. R., Zebarjadi, A.R., & Borjjan, L. (2008). Molecular aspects of drought tolerance in five genotypes of *Brassica napus*, evaluated with callus cultures under stress. In XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (pp. 105-108).
- Haj Sghaier, A., Tarnawa, A., Khaeim, H., Kovács, G. P., Gyuricza, C., & Kende, Z. (2022). The Effects of Temperature and Water on the Seed Germination and Seedling Development of Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plants*, 11(21), 2819.
- Kahrizi, D.A., Arminians. and Masoumiasl. A. (2007). plant breeding in laboratory conditions. Razi University Press. (In-persian)
- Kakaei, M., Zebarjadi, A., Mostafaie, A., & Rezaeizad, A. (2013). Genetic variation and traits interrelationship in some rapeseed genotypes using multivariate techniques under two moisture conditions. *Journal of Applied Crop Breeding*, 2 (1), 31-45. (In-persian)
- Kakaei, M., Zebarjadi, A., Mostafaie, A., & Rezaeizad, A. (2014). Genetic variation and traits interrelationship in some rapeseed genotypes using multivariate techniques under two moisture conditions. *Applied Crop Breeding*, 2(1), 31-45.
- Kakaei, M., Hajmoradi, F., Mansouri, M., & ebrahimi, M.A. (2023). The Role of Growth Regulators in Optimization of Callus Production in Medicinal Plant of Red Rubin Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Applied Biology*, 36 (2), 75.
- Kaya, Y., Akçura, M., & Taner, S. (2006). GGE-biplot analysis of multi-environment yield trials in bread wheat. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 30(5), 325-337.
- Kuzmanović, B., Petrović, S., Nagl, N., Mladenov, V., Grahovac, N., Zanetti, F., & Jeromela, A. M. (2021). Yield-related traits of 20 spring camelina genotypes grown in a multi-environment study in Serbia. *Agronomy*, 11(5), 858.
- Marjanović-Jeromela, A., Nagl, N., Gvozdanović-Varga, J., Hristov, N., Kondić-Špika, A., & Marinković, M. V. R. (2011). Genotype by environment interaction for seed yield per plant in rapeseed using AMMI model. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 174-181.
- Olivoto, T., Lúcio, A. D., da Silva, J. A., Marchioro, V. S., de Souza, V. Q., & Jost, E. (2019). Mean performance and stability in multi-environment trials I: combining features of AMMI and BLUP techniques. *Agronomy Journal*, 111(6), 2949-2960.
- Pullman, M. and D. sleeper (1378). Cultivation of crop plants translated by Ahmad Arzani. Publishing Center of Isfahan University of Technology (In-persian).
- Pour-Aboughadareh, A., Khalili, M., Poczai, P., & Olivoto, T. (2022). Stability indices to deciphering the genotype-by-environment interaction (GEI) effect: An applicable review for use in plant breeding programs. *Plants*, 11(3), 414.
- Sengbuch, V.P. (1998). Cultures of meristems and calli. Springer-verlag. 251-255.

- Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraith, J. M., Al-Niemi, T., Dyer, W. E., Ho, T. H. D., & Qu, R. (2000). Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant science*, 155(1), 1-9.
- Seyni, B., Abdoua, Y., & Sitou, L. (2017). Seed yield stability and analysis of genotype x environment interaction of sesame genotypes in central south of Niger. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 34(3), 5535-5547.
- Stevanato, P., De Biaggi, M., Broccanello, C., Biancardi, E., & Saccomani, M. (2015). Molecular genotyping of "Rizor" and "Holly" rhizomania resistances in sugar beet. *Euphytica*, 206, 427-431.
- Vaezi, B., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Mehraban, A., Hossein-Pour, T., Koohkan, E., & Siddique, K. H. (2019). Integrating different stability models to investigate genotype× environment interactions and identify stable and high-yielding barley genotypes. *Euphytica*, 215, 1-18.
- Yang, R. C., Crossa, J., Cornelius, P. L., & Burgueño, J. (2009). Biplot analysis of genotype× environment interaction: Proceed with caution. *Crop Science*, 49(5), 1564-1576.
- Zobel R.W., Wright M.G., Gauch H.G. (1988). Statistical analysis of yield trial. *Agronomy Journal*, 80: 388-393.
- Zebarjadi A., Kakaei, M., & Mostafaie, A. (2011). Genetic variability of some traits in Rapeseed (*Brassica napus* L.) under drought stress and non-stress conditions. *Biharean Biologist*, 5 (2), 127-131.

ORIGINAL ARTICLE

Comparative Profiles of Primary Metabolites of *Suaeda salsa* under Different Salt Stress Conditions

Shima Jamalirad¹, Mohammad Reza Azimi^{2*}, Nayer Azam KhoshKholgh Sima³, Mohammad Reza Ghaffari^{4*}

¹Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.

²Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.

³Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

⁴Department of System Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Correspondence

Mohammad Reza Azimi
Mohammad Reza Ghaffari
Email: azimi@znu.ac.ir
mrghaffari52@gmail.com

How to cite

Jamalirad, Sh., Azimi, M.R., KhoshKholgh Sima, N.A., & Ghaffari, M. R. (2023). Comparative Profiles of Primary Metabolites of *Suaeda salsa* under Different Salt Stress Conditions. *Crop Biotechnology*, 12(42), 79-89.

ABSTRACT

Suaeda salsa is an annual halophyte with nutritional value and high salt tolerance, making it crucial as an oil, medicinal, and edible plant. Currently, there is limited research in the field investigating metabolic diversity in *S. salsa*. In this study, our aim was to understand the salinity tolerance mechanism by examining metabolic diversity, specifically the amino acids profile, in *S. salsa* exposed to 0 mM, 200 mM, and 800 mM NaCl. The results of the physiological study indicated that salinity significantly affected the sodium (Na⁺) content in the aerial parts of the plant, with a significant increase compared to the control. Principal component analysis (PCA) revealed that differences in metabolic diversity can explain 96% of the phenotypic variation in *S. salsa* under salinity stress. Comparison of amino acids profiles at different salinity levels showed the highest accumulation of proline, methionine, citrulline, and lysine under 800 mM salt stress. Given the crucial role of these amino acids in *S. Salsa*, further studies are necessary to uncover the mechanisms behind the adaptation response.

KEY WORDS

Amino acids profile, Salinity stress, *Suaeda salsa*.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

مقایسه پروفایل متابولیت‌های اولیه گیاه *Suaeda salsa* تحت شرایط مختلف تنش شوری

شیرا جمالی‌راد^۱، محمدرضا عظیمی^{۲*}، نیراعظم خوش‌خلق سیما^۳، محمدرضا غفاری^{۴*}

چکیده

Suaeda salsa یک شبه هالوفیت یکساله با ارزش غذایی و تحمل شوری بالا بوده که به عنوان یک گیاه روغنی، دارویی و خوراکی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در حال حاضر مطالعات محدودی در زمینه بررسی تنوع متابولیکی در گیاه *S. salsa* وجود دارد. در این مطالعه برای درک شاخص تحمل به شوری با استفاده از بررسی تنوع متابولیکی پروفایل اسیدهای آمینه در گیاه *S. salsa* در غلظت‌های ۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی مولار NaCl مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی فیزیولوژیک نشان داد، شوری به صورت معنی‌داری، محتوای سدیم (Na^+) را در اندام‌های هوایی گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهد، به طوری که میزان آن در اندام‌های هوایی گیاه *S. salsa* در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. علاوه بر این تجزیه به مولفه‌های اصلی نتایج نشان داد که تفاوت در تنوع متابولیکی قادر است ۹۶ درصد از تغییرات فنوتیپی در گیاه *S. salsa* را تحت شوری توجیه نماید. مقایسه پروفایل اسیدهای آمینه در سطوح مختلف شوری نشان داد پرولین، متیونین، سترولین و لیزین بیشترین تجمع را تحت تنش ۸۰۰ میلی مولار دارا می‌باشند. با توجه به نقش مهم این اسیدهای آمینه در کنترل تنش شوری مطالعات بیشتر برای کشف مکانیزم‌های سازگاری تحمل به شوری در گیاه *S. salsa* ضروری است.

واژه‌های کلیدی

پروفایل اسیدهای آمینه، تنش شوری، *Suaeda salsa*.

^۱ گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
^۲ گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
^۳ بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
^۴ بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:

محمدرضا عظیمی و محمدرضا غفاری

رایانامه: azimi@znu.ac.ir

Mrghaffari52@gmail.com

استناد به این مقاله:

جمالی‌راد، شیرا، عظیمی، محمدرضا، خوش‌خلق سیما، نیراعظم و غفاری، محمدرضا (۱۴۰۲). مقایسه پروفایل متابولیت‌های اولیه گیاه *Suaeda salsa* تحت شرایط مختلف تنش شوری. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۲)، ۷۹-۸۹.

مقدمه

(*al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019).

تحت تنش‌های غیرزیستی متابولیسم گیاه مختل شده و گیاهان برای حفظ متابولیسم پایه و رسیدن به هموستازی جدید، نیاز به تنظیم سطوح متابولیسمی خود دارند (Li and Song, 2019). از آنجایی که تنوع متابولیسمی به طور مستقیم با فنوتیپ موجود زنده ارتباط دارد، تغییر در نوع و مقدار متابولیت‌ها می‌تواند نحوه سازگاری ارگانیزم را با تغییرات محیطی نشان دهد (Shulaev *et al.*, 2008; Fukusaki and Kobayashi., 2005). تغییر در میزان متابولیت‌های اولیه که شامل تجمع الکل‌ها، قندها و اسیدهای آمینه برای سازگاری با استرس اسمزی می‌باشد بعنوان بارزترین واکنش گیاهان به تنش است (Li and Song., 2019; Obata and Fenie., 2012). اسیدهای آمینه نقش‌های مختلفی را در گیاهان تحت تنش از جمله تاخیر در پرمردگی، مهار رادیکال‌های آزاد، محدودیت در جذب یون سدیم و افزایش نسبت K^+/Na^+ و ممانعت از بازشدن روزه‌ها ایفا می‌کنند. همچنین اسیدهای آمینه می‌توانند به عنوان پیش‌ساز در مسیرهای متابولیسمی دیگر مانند سنتز آسکوربیت اسید و پلی آمین‌ها نیز مورد استفاده قرار گیرند (Cuin and Shabala., 2007; El-Samad *et al.*, 2011; Kusano *et al.*, 2008; Nasir *et al.*, 2010). بنابراین، میزان و اثرات متقابل اسیدهای آمینه می‌تواند منجر به حفظ تعادل گیاه در شرایط تنش شود (Nasir *et al.*, 2010, Parida *et al.*, 2016). هالوفیت‌ها، از نظر ترکیب اسیدهای آمینه تنوع گسترده‌ای را در بین گونه‌های مختلف تحت شرایط شوری دارا می‌باشند. برخی از هالوفیت‌ها سطح بالایی از آمینواسیدهای آزاد را در پاسخ به شوری نشان می‌دهند و برخی دیگر، قادر به جمع‌آوری ترکیبات آلی برای تنظیم اسمزی هستند (Di Martino *et al.*, 2003; Ramanjulu *et al.*, 2000). دیده شده که متابولیت‌های *S. salsa* با افزایش سطح شوری افزایش می‌یابد. اما برخلاف سایر متابولیت‌ها، اغلب اسیدهای آمینه (بدون در نظر گرفتن مشتقات آن‌ها)، در شرایط تنش کاهش یافتند (Li and Song., 2019). از آنجایی که اطلاعات محدودی در مورد اثرات تنش شوری بر روی محتوای آمینوسیدی *S. salsa* در مرحله گیاهچه‌ای وجود دارد، در این مطالعه، میزان اسیدهای آمینه در شوری‌های مختلف در گیاه *S. salsa* در مرحله گیاهچه‌ای اندازه‌گیری شد. سپس مقایسه پروفایل اسیدهای آمینه در شوری‌های مختلف در گیاه *S. salsa* در مرحله گیاهچه‌ای برای درک مکانیزم تحمل به شوری در گیاه *S. salsa* بررسی شد.

چهارصد میلیون هکتار از اراضی کشاورزی دنیا که ۷ درصد از کل اراضی را شامل می‌شود با مشکل شوری مواجه است. این میزان سالانه چیزی حدود ۱۲ میلیارد دلار خسارت را به محصولات کشاورزی وارد می‌آورد (Diray-Arca *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020). کشور ایران به علت متوسط بارندگی پایین، جزو مناطق خشک و نیمه‌خشک به حساب می‌آید که از جمله تنش‌های معمول غیرزیستی در این مناطق، تنش شوری است (Nerd and Pasternak, 1992). تنش شوری اثرات منفی بر رشد و نمو گیاهان دارد و به تدریج باعث کاهش بهره‌وری محصول می‌شود. شوری بیش از حد خاک می‌تواند باعث سمیت یونی و کمبود مواد مغذی شده و تغییرات متابولیسمی را ایجاد کند که بر رشد کلی گیاهان حساس به شوری تأثیر می‌گذارد. بنابراین، استفاده از استراتژی‌های هالوفیت‌های سازگار با محیط‌های خاص برای بهبود زمین‌های شور-قلیا، احیای مراتع و ایجاد گیاهان متحمل به شوری از اهمیت حیاتی برخوردار است (Lu *et al.*, 2022; panta *et al.*, 2014; Zao *et al.*, 2017). هالوفیت‌ها به علت تحمل بالای شوری، قادر به رشد در زمین‌هایی می‌باشند که میزان شوری خاک در آنها بیش از ۲۰۰ میلی‌مولار است. برخی از جنس‌های هالوفیت به علت داشتن مواد معدنی مفید، ویتامین‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به عنوان یک منبع غذایی در کشاورزی شورورزی محسوب می‌شوند (Flowers *et al.*, 2010; Song and Wong., 2015; Meng *et al.*, 2018). در بین هالوفیت‌ها، جنس *Suaeda* به علت داشتن گونه‌های مفید از نظر ارزش غذایی و دارویی بسیار حائز اهمیت است. گیاهان این جنس متعلق به خانواده *Amaranthaceae* بوده و جزو هالوفیت‌های اجباری (برای رشد خود نیاز به نمک دارند) محسوب می‌شوند (Cheng *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2017). *S. salsa* به علت تحمل بالای شوری در طول مراحل جوانه زنی، رشد رویشی و زایشی، گیاهی شاخص برای زمین‌های شور-قلیایی در نظر گرفته می‌شود و بهترین گیاه برای اصلاح این زمین‌ها است. مطالعات نشان داده‌اند که *S. salsa* دارای توانایی پایداری برای انتقال نمک در شرایط کاشت مصنوعی است و کاشت مداوم آن می‌تواند به طور موثر خاک شور را در مناطق خشک بهبود بخشد. همچنین استفاده از این گیاه بصورت دارویی، خوراکی و دانه روغنی موجب می‌شود که کشت آن در زمین‌های لم یزرع، صرفه اقتصادی را به همراه داشته باشد (lu *et al.*, 2022; Meng *et al.*, 2018; li and song 2019; Zhao *et*

ناین هیدرین در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک خالص و ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار، بر روی همزن آماده شد (معرف حاصل باید در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شود). ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ (وزنی/حجمی) همگن و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی با حجم مساوی اسید استیک خالص و معرف ناین هیدرین (۱:۱:۱) مخلوط شده و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم و در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. واکنش با استفاده از حمام یخ متوقف و رنگ حاصل (حاوی تولوئن) با اضافه کردن دو میلی لیتر تولوئن و پس از یک دقیقه ورتکس ظاهر و از فاز آبی جدا شد. در انتها، خوانش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر BioMate (Thermospectronic USA) در طول موج ۵۲۰ نانومتر صورت گرفت.

آنالیز داده‌ها

تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار R، نسخه ۴.۳.۱ و پکیج agricolae صورت گرفت. برای تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز (PCA) از محیط نرم افزاری R و پکیج factoextra استفاده شد. همبستگی اسیدهای آمینه و معنی‌داری آن‌ها در غالب پکیج corplot (بر مبنای ضریب پیرسون) انجام شد. به منظور بررسی روابط اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی و میزان هریک در سطوح مختلف شوری از نرم‌افزار VANTED نسخه ۲.۶.۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی میزان رشد *Suaeda salsa* در سطوح شوری مختلف نشان داد که با افزایش سطح شوری به میزان ۸۰۰ میلی مولار سرعت رشد به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. با اینحال با توجه به این که زیستگاه این گیاه مناطق شور بخصوص مناطق ساحلی است در سطوح شوری ۲۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد گیاه رشد بهتری را نشان داد. کاهش رشد در سطح شوری ۸۰۰ میلی مولار اگرچه کاملاً معنی‌دار بود ولی بازم گیاه توانایی رشد و جوانه‌زنی را در این میزان شوری نشان داد که حاکی از تحمل به شوری بالا می‌باشد.

علاوه‌براین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که شوری به صورت معنی‌داری، محتوای Na^+ را در اندام‌های هوایی گیاه تحت

مواد و روش‌ها

بذرهای *S. salsa* در سطوح مختلف شوری ۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی‌مولار و در غالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار کشت شدند. پس از ۳۴ روز کشت و نگهداری در سطوح مختلف شوری و محلول هوگلند، نمونه‌برداری در مرحله گیاهچه‌ای از اندام هوایی انجام و نمونه‌ها در فریزر -۸۰ نگهداری شدند.

اندازه‌گیری محتوای Na^+ و K^+

برای اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم، ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پودر شده به منظور تولید خاکستر، در داخل کوره الکتریکی با دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۴ ساعت) قرار گرفت. سپس به هر یک از نمونه‌ها ۱۰ میلی لیتر اسیداستیک ۱۰ درصد اضافه و به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شدند. بعد از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم (با دمای ۱۰۰ درجه) و فیلتر کردن هریک از آن‌ها، به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر دیونیزه رقیق شدند. خوانش نمونه‌ها توسط دستگاه فیلم فتومتری (مدل Genway ساخت کشور انگلستان) صورت گرفت (Kord et al., 2019).

اندازه‌گیری اسیدهای آمینه

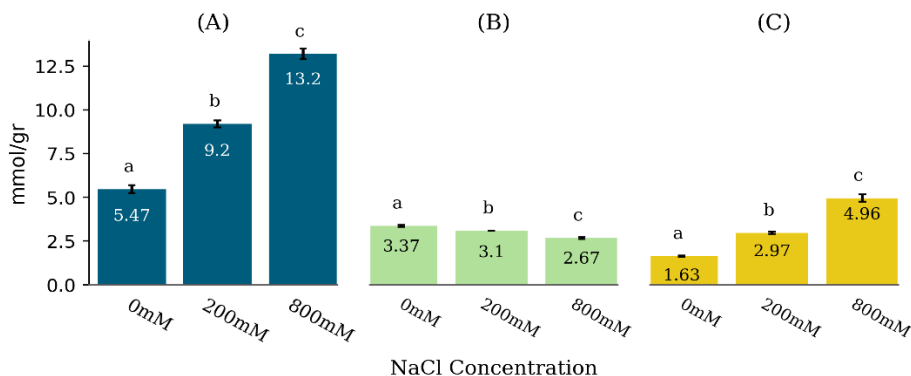
برای استخراج اسیدهای آمینه به ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پودر شده ۱ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه شد. سپس نمونه‌ها برای مدت یک ساعت در دستگاه Thermomixer و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها در دور ۱۴۰۰۰ pm، محلول رویی به تیوپ‌های جداگانه منتقل و در دستگاه Concentrator خشک شدند. با اضافه کردن یک میلی لیتر آب دیونیزه به هر نمونه و فیلتر کردن هریک از آن‌ها، مقادیر اسیدهای آمینه با استفاده از دستگاه HPLC (Knower)، فاز A: شامل استات سدیم و متانول به نسبت ۸ به ۲، فاز B: شامل استات سدیم و متانول به نسبت ۲ به ۸، فاز C: شامل استونیتریل و ردیاب UV (طول موج ورودی ۳۵۰ و خروجی ۴۵۰) اندازه‌گیری شد (Yazdanpanah et al., 2020).

اندازه‌گیری پرولین

محتوای پرولین با استفاده از روش مبتنی بر ناین هیدرین در A520 نانومتر (روش Bates و همکاران (۱۹۷۳)) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، ابتدا اسید ناین هیدرین با گرم کردن ۱.۲۵ گرم

و در نتیجه تحمل گیاه تحت تنش شوری افزایش یابد. افزایش میزان سدیم در سطح ۸۰۰ میلی مولار نسبت به حالت نرمال تقریباً سه برابر بود. نکته قابل توجه این بود که افزایش نسبت سدیم به پتاسیم در حالت ۸۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد نیز معادل همین میزان بوده که نشان دهنده کاهش ناچیز پتاسیم و تحمل گیاه در سطح ۸۰۰ میلی مولار است.

تأثیر قرار می‌دهد، به طوریکه میزان Na^+ در اندام‌های هوایی گیاه *S. salsa* در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. علاوه بر این میزان پتاسیم با افزایش شوری بسیار کم بود که این گویای متحمل بودن این گیاه به سطوح شوری بالا بود (Guo et al., 2019). همانطور که قبلاً گزارش شده‌است وجود پمپ‌های یونی با تمایل بالا نسبت به پتاسیم مانند HKT1 باعث می‌شود که این گیاه در غلظت‌های بالای نمک قادر به جذب پتاسیم بوده

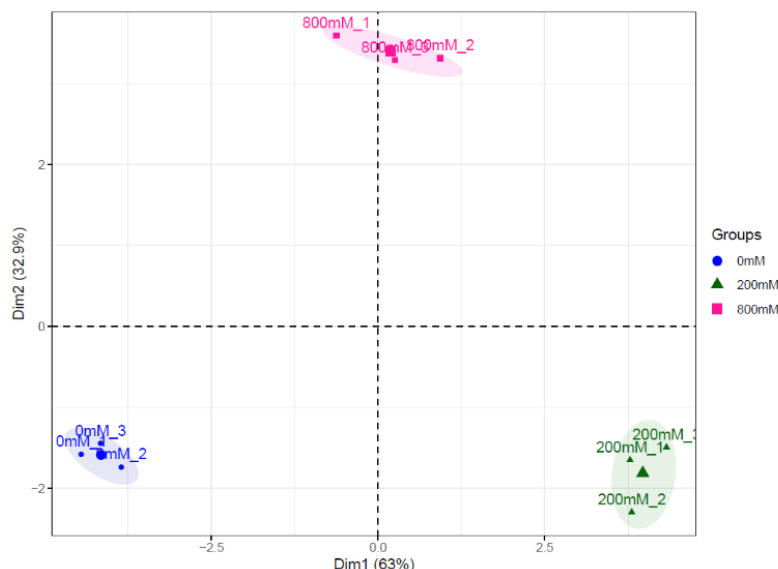


شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف شوری روی محتوای یون سدیم (A)، محتوای یون پتاسیم (B) و نسبت سدیم به پتاسیم (C) در گیاهچه‌های ۳۰ روزه *S. salsa*. حروف کوچک متفاوت روی هر نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

در سه گروه کاملاً مجزا دسته‌بندی شدند (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهد شوری اثر معنی‌داری در میزان اسیدهای آمینه مختلف تحت تنش مختلف شوری ایجاد نماید.

شکل ۲ همبستگی بین اسیدهای آمینه مختلف در سه سطح شوری را نشان می‌دهد. در شکل دو رنگ قرمز همبستگی مثبت بالا، رنگ آبی همبستگی منفی و رنگ سفید عدم همبستگی را نشان می‌دهد. پرولین، متیونین، سیترولین و لیزین کمترین همبستگی را با سایر اسیدهای آمینه دارا بودند. تریپتوفان، فنیل آلانین، والین، گلوتامات، تیروزین، سرین و هیستیدین همبستگی-های مثبت و معنی‌داری را نشان دادند. یک همبستگی مثبت و معنی‌دار بین گلیسین، ایزولوسین، گلوتامین، آلانین و لوسین نیز مشاهده شد. پرولین، متیونین، سیترولین و لیزین هم دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری بودند. آسپاراتات، آسپارژین، ترئونین و آرژنین نیز به صورت مثبتی همبسته شد. همبستگی مثبت و معنی بین بیشتر اسیدهای آمینه را نشان می‌دهد که یک هم تنظیمی (co-regulation) برای مقابله با شوری در گیاه *S. salsa* همانطور که قبلاً در *Phragmites australis* نیز دیده شده وجود دارد (Xie et al., 2020).

متابولیت‌های گیاهان، تحت تنش‌های غیرزیستی دچار اختلال شده و گیاهان برای حفظ متابولیت‌های پایه و رسیدن به هموستازی جدید نیاز به تنظیم سطح متابولیت‌های خود دارند (Arbona et al., 2013; Arbelet-Bonnin et al., 2020). این رو، متابولومیکس مستقیم‌ترین ابزار برای مطالعه تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری می‌باشد (Hong et al., 2016). از آنجایی که، تغییر در تنوع متابولیت‌های اولیه از جمله اسیدهای آمینه، بارزترین واکنش گیاهان به تنش شوری برای مقابله با استرس اسمزی است، بررسی میزان هر یک از اسیدهای آمینه و تعیین ارتباط آن‌ها با تنش شوری می‌تواند به شناسایی اسید آمینه‌های شاخص و مرتبط با تنش شوری و آستانه تحمل گیاه منجر شود (Fukusaki and Kobayashi., 2005; Li and song., 2019). بر این اساس، در مطالعه حاضر، ۱۹ اسید آمینه به همراه سیترولین در اندام‌های هوایی *S. salsa* در پاسخ به سه سطح شوری ۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی مولار اندازه‌گیری و به منظور تعیین روابط بین اسیدآمینه‌ها و سطوح شوری به مولفه‌های اصلی تجزیه شد. نتایج نشان داد که دو مولفه اول قادر بودند حدود ۹۶ درصد تغییرات را توجیه و سطوح شوری را به خوبی تفکیک نمایند. به طوری که در نمایش دوبردی سطوح شوری، شوری‌های مختلف



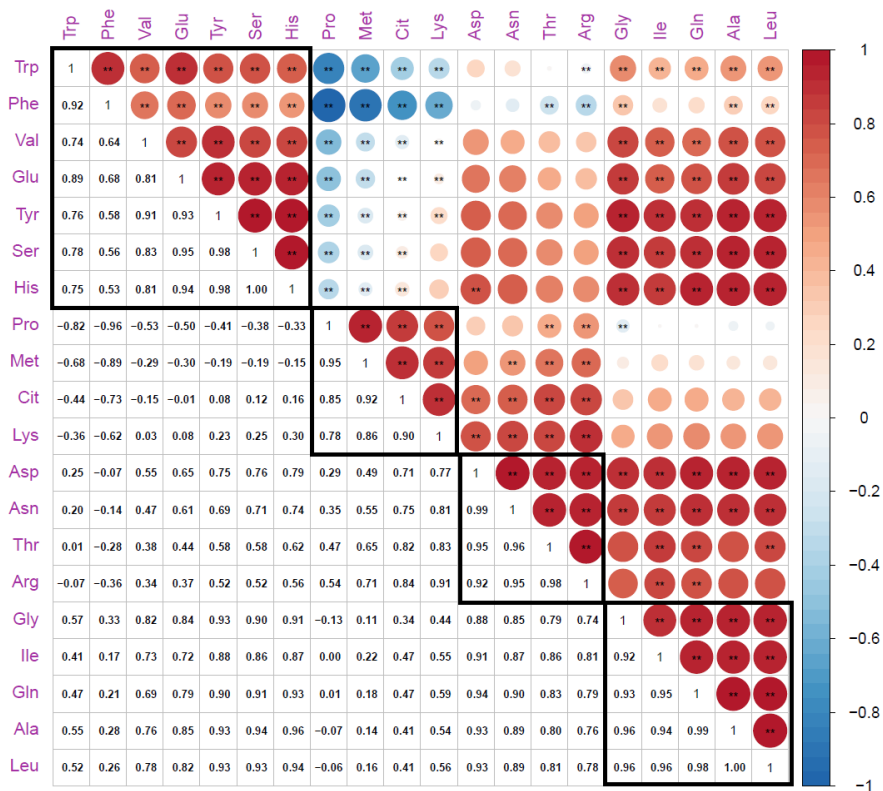
شکل ۲. گروه‌بندی سطوح شوری براساس تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA). در گروه‌بندی حاصل سطوح شوری بکار رفته به خوبی از یکدیگر تفکیک شدند و در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند.

معنی‌داری افزایش یافته و در غلظت ۸۰۰ میلی‌مولار ترتیب به ۴.۵، ۲، ۱.۵ و ۱.۵ برابر شاهد را نشان داد. این تغییرات برای دیگر اسیدهای آمینه معنی‌دار نبودند.

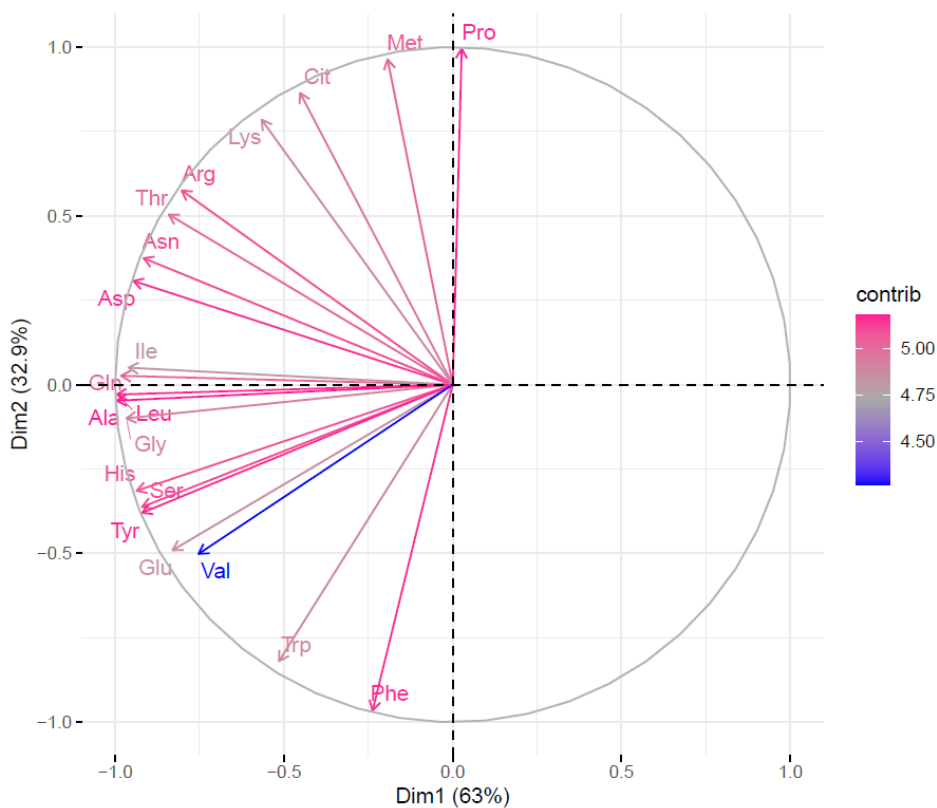
مطالعات انجام شده در دیگر هالوفیت نشان می‌دهد یک همبستگی مثبت بین تجمع پرولین و میزان تحمل به شوری وجود دارد (Hartzendorf and Rolletschek., 2001; Thomas *et al.*, 1992). پرولین در مقادیر بالاتری نسبت به سایر اسیدهای آمینه در پاسخ به شوری تجمع می‌یابد (Abraham *et al.*, 2003)، در گیاهان هالوفیت نیز تجمع پرولین در پاسخ به استرس‌های شوری بسیار گسترده بوده و می‌تواند شاخص مفیدی برای استرس شوری در این گیاهان نیز به حساب آید (Xie *et al.*, 2020). این عمل بیشتر در سیتوزول برای تنظیمات اسمزی که پرولین در آن نقش دارد اتفاق می‌افتد و از اثرات تخریبی NaCl بر روی غشاء سلول جلوگیری می‌کند (Ahmad and Satyawati., 2008; Mansour 1998). در این مطالعه افزایش معنی‌دار ۴.۵ برابر پرولین در غلظت ۸۰۰ میلی‌مولار NaCl نسبت به شاهد مشاهده شد.

به منظور درک بهتر همبستگی بین اسیدهای آمینه نیز، از نمودار تجزیه به مولفه‌های اصلی متغیرها (اسیدآمینه) استفاده شد. این نمودار، رابطه بین اسیدهای آمینه را در بین سطوح شوری مختلف نشان می‌دهد. به طوری که زوایای تند و منفرجه به ترتیب همبستگی مثبت و منفی را نشان می‌دهند. بر این اساس، پرولین با اسید آمینه‌هایی مانند، متیونین، سیترولین، لیزین، آرژنین، ترئونین همبستگی مثبت و با اسیدآمینه‌هایی مانند فنیل آلانین و تریپتوفان همبستگی منفی داشت. بزرگی هر فلش بزرگی اثر هر یک از اسیدهای آمینه را در تفکیک سطوح شوری نیز نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، بجز اسیدآمینه والین تمامی اسیدهای آمینه در محدوده طیف صورتی که نشان دهنده بزرگی اثر فاکتور مربوطه برای جداسازی سطوح شوری می‌باشد، قرار گرفتند.

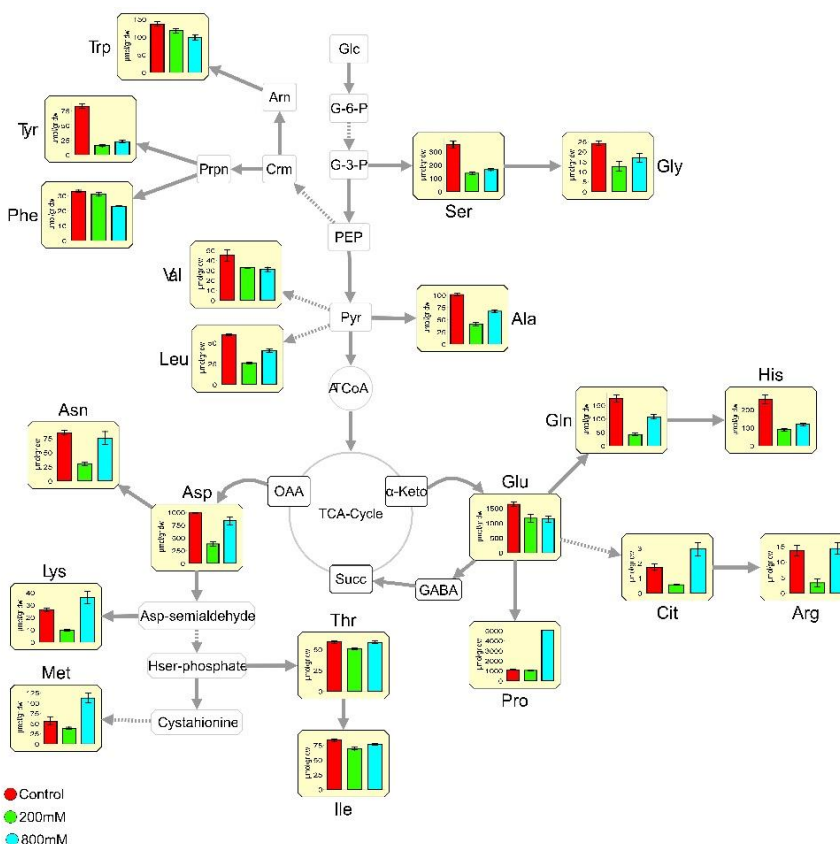
شکل ۵ نقشه‌یابی اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد میزان اسیدهای آمینه در تنش 200 mM به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. سپس با افزایش میزان شوری تا ۸۰۰ میلی‌مولار یک افزایش معنی‌داری در میزان اسیدهای آمینه مشاهده شد (شکل ۴). با افزایش شوری میزان غلظت پرولین، متیونین، سیترولین و لیزین به صورت



شکل ۳. همبستگی اسیدهای آمینه در سطوح شوری مختلف. رنگ قرمز همبستگی مثبت بالا، رنگ آبی همبستگی منفی و رنگ سفید عدم همبستگی را نشان می‌دهد. اکثر اسیدهای آمینه همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان دادند به جز پرولین که روند کاملاً متفاوتی را با اکثر اسیدهای آمینه دارا بود. تنها ۴ اسید آمینه (سیترویلین، آرژنین، متیونین و آسپارژین) روند نسبتاً مشابهی را با پرولین نشان دادند.



شکل ۴. تجزیه به مولفه‌های اصلی برای اسید آمینه‌ها



شکل ۵. نقشه‌یابی اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی در سطوح مختلف شوری.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که در برخی از هالوفیت‌ها، پرولین با محافظت از پروتئین‌ها باعث کاهش اثرات نامطلوب یون‌های غیرآلی شده که این عمل را از طریق محافظت از پروتئین‌های ساختاری در برابر آسیب‌های ناشی از استرس و تنظیم مجدد آن‌ها انجام می‌دهد و در نهایت باعث تحمل هر چه بیشتر گیاه به غلظت‌های بالاتر شوری می‌شود (Khedr *et al.*, 2003). در مقادیر بهینه، پرولین فعالیت آنزیم‌ها را سرکوب نمی‌کند و به عنوان یک مولکول سیگنالینگ/تنظیم کننده نیز عمل کرده و چندین پاسخ که جز فرآیندهای سازگاری هستند را فعال می‌نماید (Maggio *et al.*, 2002). علاوه بر این، پرولین از طریق واسطه‌گری تنظیمات اسمزی و محافظت از ساختارهای سلولی در گیاهان تحت تنش، نقش مهمی را در سازگاری با تنش شوری ایفا می‌نماید (Ashraf and Harris., 2004). بنابراین با تعیین مقادیر این اسیدآمینه در سطوح مختلف شوری و افزایش معنی‌دار غلظت آن می‌توان آستانه خطر را برای گیاه نیز تخمین زد. در مطالعه‌ای که روی گیاه هالوفیت *Plantago crassifolia* صورت گرفته بود، افزایش سطح پرولین در غلظت ۵۰۰ میلی مولار نمک ۲۰ برابر شاهد گزارش شد (Vicente *et al.*,

2004). نتایج نشان داد که احتمالاً پرولین یک اسیدآمینه غالب و یک اسمولیت کننده قوی در این گیاه محسوب می‌شود. Yang و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که پرولین در *Phragmites australis* به طور قابل توجهی تحت تنش شوری افزایش یافته و یک همبستگی مثبت قوی با افزایش غلظت NaCl نشان می‌دهد. متیونین یک اسیدآمینه ضروری حاوی گوگرد است و در مسیرهای متابولیکی مختلفی نقش دارد. متیونین به عنوان یک اهداکننده سولفید برای تولید کوفاکتورهای آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها و پلی‌آمین‌ها نیز کمک می‌نماید. مطالعات اخیر نشان دادند، متیونین نقش کلیدی را در سنتز سیتوکینین‌ها و اکسین دارد، بنابراین کاربرد آن باعث بهبود رشد و عملکرد در گیاهان تحت تنش شوری می‌شود (Shahid *et al.*, 2023). پلی‌آمین‌ها، عملکردهای زیادی مانند حفظ تعادل یونی، محافظت از کروماتین و کاهش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) دارند که در غیر این صورت منجر به آسیب سلولی و در نهایت مرگ سلولی در هنگام تنش می‌شود. Bohnert and Jensen نشان دادند که چرخه متیل تحت تنش‌های آبی برای تولید پلی‌آمین‌ها مهم می‌باشد

کردند که در گونه‌هایی مانند *S. salsa* افزایش سطح شوری با افزایش نسبی تعداد محدودی اسیدآمین و افزایش معنی‌دار ترکیبات پلی آمینی همراه است. این در حالی است که در تعدادی از گونه‌های دیگر از جمله *Salicornia europaea* حفظ فشار اسمزی تنها با افزایش اسیدآمین‌های آزاد امکان پذیر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

هالوفیت‌ها با افزایش و یا کاهش غلظت اسیدهای آمینه، الگوی قابل‌تغییری را در ترکیب اسید آمینه آزاد خود ایجاد می‌کنند. در این مطالعه، نشان داده شد که تنش شوری به طور قابل‌توجهی گیاه *S. salsa* را تحت تاثیر قرار داده و اثرات شوری بر روی اسیدهای آمینه نقش مهمی در سازگاری گیاه با تنش نمکی دارد. تجزیه به مولفه‌های اصلی مشخص نشان داد اسیدهای آمینه همبستگی مثبت و معنی‌داری را با افزایش سطح شوری داشته و می‌تواند شاخص مفیدی برای تنش شوری به حساب آیند. بررسی اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی نشان داد که بیشتر اسیدهای آمینه تحت شوری کاهش معنی‌داری نشان دادند. پرولین با دارا بودن روندی همگام با افزایش شوری، بیشترین همبستگی را با میزان شوری دارا بود. در شوری ۸۰۰ میلی مولار که حد‌آستانه گیاه به تنش شوری است، پرولین بصورت معنی-داری تجمع را نشان داد که این تغییرات می‌تواند موجب حفاظت از پروتئین‌ها در شرایط شوری شود. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی برای تحمل به شوری مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها و بخش فیزیولوژی مولکولی جهت فراهم آوردن امکانات لازم این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

(Bohnert and Jensen., 1996). بنابراین، این احتمال وجود دارد که افزایش فعالیت متیونین سنتاز در هنگام القای شوری می‌تواند نقش مهمی را به عنوان عضوی از این چرخه برای تحمل نمک در گیاهان ایفا نماید (Narita et al., 2004). در مطالعه حاضر، افزایش معنی‌دار متیونین در شوری ۸۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد نشان داد که در گیاه *S. salsa* متیونین نقش مهمی را در افزایش تحمل به شوری ایفا می‌کند و همچنین می‌تواند شاخص نسبتاً خوبی برای تخمین شوری و آستانه تحمل گیاه باشد.

با افزایش غلظت سیترولین و لیزین در شوری ۸۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد و همبستگی نسبتاً خوب آن‌ها با پرولین این انتظار می‌رود که آن‌ها نیز بتوانند به عنوان شاخصی برای سطوح شوری بکار روند. اما با توجه به افزایش ۱.۵ برابری سیترولین و لیزین در غلظت ۸۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد، این امکان وجود دارد که این دو متابولیت توانایی بالایی در تفکیک سطوح شوری و توجیه آستانه خطر گیاه را نداشته باشند، بنابراین، گزینه مناسبی برای شاخص شوری و سلامتی گیاه بشمار نمی‌روند.

در برخی از هالوفیت‌ها، تجمع ترکیبات آلی موجب حفظ تعادل اسمزی در شرایط تنش می‌شود (Di Martino et al., 2003). بنابراین، این احتمال وجود دارد که علاوه بر اسید آمینه‌های آزاد، اسمولیت‌کننده‌های دیگری از جمله ترکیبات پلی آمینی نیز در حفظ فشار اسمزی گیاه موثر باشند (Bueno and Cordovilla., 2019, Koyro et al., 2013). در مطالعه حاضر، کاهش گلوتامین در سطوح بالاتر شوری، این احتمال را می‌رساند که در شوری‌های بالا این اسید آمینه به عنوان یک دهنده نیتروژن باعث بیوستتر ترکیبات آلی از جمله پلی آمین‌ها شود. پلی آمین‌ها با تنظیم هموستازی یونی، پایداری غشاء بیولوژیکی، محافظت از بافت‌های فتوسنتزی و شرکت در فرآیندهای سیگنالینگ نقش مهمی را در سازگاری با تنش شوری در گیاهان هالوفیت ایفا می‌نمایند (Bueno and Cordovilla., 2019). Koyro و همکاران (۲۰۱۳) با مطالعه روی الگوی پروتئینی چند گیاه مختلف گزارش

References

- Abrahám, E. Rigó, G. Székely, G. Nagy, R. Koncz, C. et al. (2003). Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 51 (3), 363-372.
- Ahmad, P. Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants - A review. *Plant, Soil and Environment*, 54(3), 89-99.
- Arbelet-Bonin, D. Blasselle, C. Rose Palm, E. Redwan, M., Ponnaia H. M., et al. (2020). Metabolism regulation during salt exposure in the halophyte *Cakile maritima*. *Environmental and Experimental Botany*, 177, 104075.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C. D., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 4885-4911.

- Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166, 3-16.
- Bates, L. S., Waldren, R. Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Bohnert, H. J., & Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol*, 14, 89-97.
- Bueno, M., & Cordovilla, M. P. (2019). Polyamines in Halophytes. *Front. Plant Sci*, 9(10), 439.
- Cheng, Y., Yang, P., Zhao, L., Priyadarshani, S., Zhou, Q., *et al.* (2019). Studies on genome size estimation, chromosome number, gametophyte development and plant morphology of salt-tolerant halophyte *Suaeda salsa*. *BMC Plant Biol*, 19(1), 473.
- Cuin, T. A., & Shabala, S. (2007). Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. *Planta*, 225(3), 753-761.
- Di Martino, C., Delfine, S., Pizzuto, R., Loreto, F., & Fuggi, A. (2003). Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New Phytologist*, 158(3), 455-463.
- Diray-Arce, J., Clement, M., Gul, B., Khan, M. A., & Nielsen, B. L. (2015). Transcriptome assembly, profiling and differential gene expression analysis of the halophyte *Suaeda fruticosa* provides insights into salt tolerance. *BMC Genomics*, 16(1), 353.
- El Moukhtari, A., Cabassa-Hourton, C., Farissi, M., & Savoré, A. (2020). How Does Proline Treatment Promote Salt Stress Tolerance During Crop Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 23(11), 1127.
- El-Samad, H. M. A., Shadad, M. A. K., & Barak, N. (2011). Improvement of plants salt tolerance by exogenous application of amino acids. *Journal of Medicinal Plants*, 5, 5692-5699.
- Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, 37, 604-612.
- Fukusaki, E., & Kobayashi, A. (2005). Plant metabolomics: potential for practical operation. *J. Biosci Bioeng*, 100(4), 347-354.
- Guo, S. M., Tan, Y., Chu, H. J., Sun, M. X., & Xing J. C. (2019). Transcriptome sequencing revealed molecular mechanisms underlying tolerance of *Suaeda salsa* to saline stress. *PLOS ONE*, 14(7), e219979.
- Hartzendorf, T., & Rolletschek, H. (2001). Effects of NaCl-salinity on amino acid and carbohydrate contents of *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*, 69, 195-208.
- Hong, J., Yang, L., Zhang, D., & Shi, J. (2016). Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. *Int J Mol Sci*, 17(6), 767.
- Huang, Z., Zhao, L., Chen, D., Liang, M., Liu, Z., *et al.* (2013). Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem artichoke plantlets. *PLoS One*, 8(4), e62085.
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Wahid, A. A. A., Quick, W. P., & Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2553-2562.
- Kord, H., Fakheri, B., Ghabooli, M., Solouki, M., Emamjomeh, A., Khatabi, B., Sepehri, M., Salekdeh, G. H., & Ghaffari, M. R. (2019). Salinity-associated microRNAs and their potential roles in mediating salt tolerance in rice colonized by the endophytic root fungus *Piriformospora indica*. *Funct Integr Genomics*, 19(4), 659-672.
- Koyro, H. W., Zörb, C., Debez, A., & Huchzermeyer, B. (2013). The effect of hyper-osmotic salinity on protein pattern and enzyme activities of halophytes. *Functional Plant Biology*, 40(9), 787-804.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.
- Li, Q., & Song, J. (2019). Analysis of widely targeted metabolites of the euhalophyte *Suaeda salsa* under saline conditions provides new insights into salt tolerance and nutritional value in halophytic species. *BMC plant biology*, 19, 388-388.
- Lu, X., Liu, J., Liu, Y., Zhang, Z., & Tang, Z. (2022). *Suaeda glauca* and *Suaeda salsa* Employ Different Adaptive Strategies to Cope with Saline-Alkali Environments. *Agronomy*, 12(10), 2496.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J. I., *et al.* (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction. *Plant J*, 31(6), 699-712.
- Mansour, M. M. F. (1998). Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 767-772.

- Meng, X., Zhou, J., & Sui, N. (2018). Mechanisms of salt tolerance in halophytes: Current understanding and recent advances. *Open Life Sciences*, 13, 149-154.
- Nasir, F. A., Batarseh, M., Abdel-Ghani, A. H., & Jiries, A. (2010). Free Amino Acids Content in Some Halophytes under Salinity Stress in Arid Environment, Jordan. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 38, 592-600.
- Nerd, A., & Pasternak, D. (1992). Growth, ion accumulation, and nitrogen fractioning in *Atriplex barclayana* grown at various salinities. *Society for Range Management*, pp. 164-166.
- Obata, T., & Fernie, A. R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci*, 69(19), 3225-3243.
- Panta, S., Flowers, T., Lane, P., Doyle, R., Haros, G., & Shabala, S. (2014). Halophyte agriculture: success stories. *Exp. Bot*, 107, 71-83.
- Parida, A. K., Veerabathini, S. K., Kumari, A., & Agarwal, P. K. (2016). Physiological, Anatomical and Metabolic Implications of Salt Tolerance in the Halophyte *Salvadora persica* under Hydroponic Culture Condition. *Front. Plant Sci*, 22(7), 351.
- Ramanjulu, S., & Sudhakar, C. (2000). Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *Plant Physiology*, 157, 81-85.
- Ray, S., Dansana, P. K., Giri, J., Deveshwar, P., Arora, R., et al. (2011). Modulation of transcription factor and metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice. *Funct Integr Genomics*, 11(1), 157-178.
- Shahid, S., Kausar, A., Zahra, N., et al. (2023). Methionine-Induced Regulation of Secondary Metabolites and Antioxidants in Maize (*Zea mays* L.) Subjected to Salinity Stress. *Gesunde Pflanzen*, 75, 1143-1155.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., & Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiol Plant*, 132(2), 199-208.
- Song, J., & Wang, B. (2015). Using euhalophytes to understand salt tolerance and to develop saline agriculture: *Suaeda salsa* as a promising model. *Ann Bot*, 115(3), 541-553.
- Thomas, J. C., De Armond, R. L., & Bohnert, H. J. (1992). Influence of NaCl on Growth, Proline, and Phosphoenolpyruvate Carboxylase Levels in *Mesembryanthemum crystallinum* Suspension Cultures. *Plant Physiology*, 98(2), 626-631.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M. Á., Estrelles, E., Bellés, J. M. A., et al. (2004). Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Environments*, 58, 463-481.
- Xie, E., Wei, X., Ding, A., Zheng, L., Wu, X., et al. (2020). Short-Term Effects of Salt Stress on the Amino Acids of *Phragmites australis* Root Exudates in Constructed Wetlands. *Water*, 12, 569.
- Xu, Y., Zhao, Y., Duan, H., Sui, N., Yuan, F., et al. (2017). Transcriptomic profiling of genes in matured dimorphic seeds of euhalophyte *Suaeda salsa*. *BMC Genomics*, 18, 727.
- Yang, Z., Xie, T., & Liu Q. (2014). Physiological responses of *Phragmites australis* to the combined effects of water and salinity stress. *Ecophysiology*, 7, 420-426.
- Yazdanpanah, P., Jonoubi, P., Zeinalabedini, M., Rajaei, H., Ghaffari, M. R., Vazifeshenas, M. R., & Abdirad, S. (2021). Seasonal Metabolic Investigation in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Highlights the Role of Amino Acids in Genotype- and Organ-Specific Adaptive Responses to Freezing Stress. *Front Plant Sci*, 12(12), 699139.
- Narita, Y., Taguchi, H., Nakamura, T., Ueda, A., Shi, W., & Takabe, T. (2004). Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Science*, 167, 1009-1016.
- Zhang, X., Yao, Y., Li, X., Zhang, L., & Fan, S. (2020). Transcriptomic analysis identifies novel genes and pathways for salt stress responses in *Suaeda salsa* leaves. *Sci Rep*, 10(1), 4236.
- Zhao, L., Yang, Z., Guo, Q., Mao, S., Li, S., et al. (2017). Transcriptomic Profiling and Physiological Responses of Halophyte *Kochia sieversiana* Provide Insights into Salt Tolerance. *Front. Plant Sci*, 24(8), 1985.
- Zhao, Y., Ma, Y., Li, Q., Yang, Y., Guo, J., et al. (2018). Utilisation of stored lipids during germination in dimorphic seeds of euhalophyte *Suaeda salsa*. *Functional Plant Biology*, 45(10), 1009-1016.
- Zhao, Y. Q., Ma, Y. C., Duan, H. M., Liu, R. R., & Song, J. (2019). Traits of fatty acid accumulation in dimorphic seeds of the euhalophyte *Suaeda salsa* in saline conditions. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153, 514-520.