

پاسخ مورفولوژیک برخی از گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای بادام به تنش خشکی در شرایط

درون شیشه‌ای

Morphological Response of Selected Almond Species and Interspecific Hybrids to Drought Stress under *In vitro* Conditions

امیر رضائی، علی قرقانی^{*}، سعید عشقی^۱، منصوره نظری^۲

۱- بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۲- بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (agharghani@shirazu.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۳/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۴

چکیده

خشکسالی به عنوان یکی از مهم‌ترین چالش‌های تغییرات اقلیمی، تأثیرات مخربی بر تولید میوه دارد و استفاده از ارقام و پایه‌های متحمل به تنش خشکی یکی از راه‌های کاهش اثرات این تنش می باشد. این پژوهش به منظور ارزیابی تحمل به خشکی پنج گونه و هیبرید بین گونه‌ای بادام (*Prunus elaeagnifolia*، *P. scoparia*، *P. eburnea*، *P. scoparia* × *P. elaeagnifolia* و پایه تجاری هیبرید گارنم (*Prunus dulcis* × *P. persica*) یا GN) در شرایط کشت بافت در سال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه گروه باغبانی دانشگاه شیراز انجام شد. ریزنمونه‌های نوک شاخه پس از ضدعفونی در محیط کشت MS حاوی GA_3 (4 mg L^{-1})، IBA (0.1 mg L^{-1}) و TDZ (1 mg L^{-1}) کشت شدند. گیاهچه‌های تولیدشده تحت تیمارهای تنش خشکی (۰، ۳/۵ و ۷ درصد پلی اتیلن گلیکول) قرار گرفتند و شاخص‌های رشدی شامل طول ساقه، وزن تر و خشک، و تعداد برگ سالم و بافت‌مرد ارزیابی شدند. نتایج نشان داد *P. eburnea* با بیشترین طول ساقه (۳/۰۳ سانتی‌متر)، وزن تر (۳/۸۷ گرم) و وزن خشک (۰/۴۴ گرم) متحمل‌ترین گونه بود، در حالی که GN حساس‌ترین رفتار را نشان داد. افزایش سطح PEG منجر به کاهش معنی‌دار رشد در تمام گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای شد. گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای وحشی نسبت به پایه تجاری برتری واضحی در تحمل به خشکی داشتند. این یافته‌ها مؤید قابلیت بالای روش‌های درون شیشه‌ای برای غربالگری اولیه گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای متحمل و کاربرد آنها در برنامه‌های به‌نژادی است.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، تنش خشکی، PEG، ریزازدیادی، پایه‌های مقاوم.

مقدمه

تغییرات اقلیمی، خشکسالی را به عنوان چالشی جدی و فزاینده برای بخش کشاورزی مطرح کرده است، به ویژه به دلیل تأثیرات چندجانبه آن بر تولیدات کشاورزی، ثبات اقتصادی و امنیت غذایی (Nagpal et al., 2024; Rinaldo et al., 2024). تنش خشکی با اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، جذب مواد مغذی و متابولیسم گیاهی، رشد گیاه را محدود کرده و در موارد شدید منجر به کاهش عملکرد یا مرگ گیاه می‌شود (Agunbiade & Babalola, 2024; Fatima et al., 2024). پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که تغییرات اقلیمی، فراوانی و شدت خشکسالی را افزایش خواهد داد (Rodziewicz & Dice, 2020). به طوری که طی دهه‌های اخیر، خشکسالی بیشترین خسارت را به بخش کشاورزی وارد خواهد کرد (Rojas, 2021). این موضوع لزوم توسعه راهکارهای مؤثر برای مقابله با تنش خشکی، از جمله شناسایی نژادگان متحمل، را پررنگ می‌سازد (Song et al., 2024; Xiao et al., 2024).

تکثیر گیاهان به روش درون‌شیشه‌ای^۱ یکی از روش‌های بسیار مؤثر برای افزایش سریع مواد گیاهی در تولیدات تجاری است. این روش امکان تولید تعداد زیادی گیاه را در مدت‌زمان نسبتاً کوتاه، مستقل از شرایط آب‌وهوایی و عاری از بیماری فراهم می‌کند (Rezaei *et al.*, 2023). در واقع، مشخص کردن تحمل به تنش در گیاهان کار دشواری است، زیرا بسیاری از عوامل محیطی مثل حاصلخیزی خاک و شرایط فیزیولوژیکی، پراکندگی نمک در پروفیل خاک، روشهای آبیاری و شرایط آب و هوایی و همچنین عوامل گیاهی مثل مرحله رشد گیاه، وارینه و نوع پایه، بر میزان تحمل گیاه تاثیر می‌گذارد (مشایخی و همکاران، ۱۳۹۵). تکنیک کشت درون شیشه ای، به‌ویژه در ارزیابی تحمل به تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی کاربرد دارد، چرا که شرایط کنترل‌شده آزمایشگاه، اثرات متغیرهای محیطی را حذف و امکان غربالگری سریع نژادگان ها را فراهم می‌سازد (Satyavathi *et al.*, 2004).

مطالعات متعددی به بررسی پاسخ ارقام و پایه‌های مختلف بادام به تنش خشکی در شرایط درون شیشه‌ای پرداخته‌اند. تحقیقات نشان داده‌اند که اعمال تنش اسمزی با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول در محیط کشت MS منجر به کاهش معنی‌دار شاخص‌های رشدی از جمله وزن تر، ارتفاع گیاهچه و تعداد برگ‌های توسعه یافته می‌شود (Akbarpour *et al.*, 2017). همچنین تنش خشکی باعث کاهش محتوای نسبی آب برگ^۲ و پایداری غشای سلولی شده و از طرف دیگر تجمع پرولین را به همراه دارد (Karimi *et al.*, 2012). بررسی پنج نژادگان بادام تحت سطوح مختلف PEG^۳ (۰، ۲، ۴ و ۶ درصد) نشان داد که نژادگان مختلف واکنش‌های متفاوتی به تنش نشان می‌دهند. به طوری که رقم‌های 'Supernova' و 'Tuono' کمترین آسیب‌پذیری را در مقایسه با ارقام 'Shahroud 12' و 'Shahroud 21' نشان دادند (Akbarpour *et al.*, 2017). بررسی هشت گونه بومی ایرانی بادام نشان داد که برخی از گونه‌های بادام مقاومت قابل‌توجهی به تنش خشکی از خود نشان می‌دهند. مطالعات تأیید کرده‌اند که در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی، برخی نژادگان ها تحت تنش اسمزی ناشی از مواد مختلف، رشد ریشه و زیست‌توده بهتری حفظ می‌کنند. نتایج این تحقیقات حاکی از آن است که تفاوت در پاسخ به انواع مختلف عوامل اسمزی نشان‌دهنده وجود مکانیسم‌های مقاومتی متفاوت در نژادگان مختلف است (Sorkheh *et al.*, 2011). گزارش شده است که، ارقام مقاوم بادام در مقایسه با ارقام حساس، کاهش کمتری در شاخص‌های رشد از خود نشان می‌دهند (Torrecillas *et al.*, 1996). مطالعات بر روی نهال‌های بادام نشان داد که با افزایش تنش خشکی، شاخص‌های رویشی مانند ارتفاع گیاه، قطر شاخه، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابند (Mousavi *et al.*, 2009). در شرایط درون شیشه‌ای، کاهش تعداد برگ‌های توسعه یافته می‌تواند به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر تنش خشکی در نظر گرفته شود، چرا که باعث کاهش سطح تعرق و جذب نور می‌گردد (Sivritepe *et al.*, 2008). این پاسخ مورفولوژیک به گیاه کمک می‌کند تا با شرایط تنش خشکی سازگار شود. بررسی پاسخ‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک ارقام بادام به تنش خشکی نشان می‌دهد که این گیاه از طریق مکانیسم‌های اجتنابی و تحملی به شرایط نامساعد آبی واکنش نشان می‌دهد، به طوری که ارقام مختلف سطوح متفاوتی از تحمل را از خود بروز می‌دهند (Gohari *et al.*, 2023).

غربالگری درون شیشه‌ای می‌تواند به عنوان روشی مؤثر برای شناسایی اولیه منابع ژنتیکی متحمل به خشکی در برنامه‌های اصلاحی بادام مورد استفاده قرار گیرد. ذخایر ژنتیکی وحشی و بومی بادام یک منبع ژنتیکی با ارزش برای ویژگی‌های فیزیولوژیکی مهم مانند تحمل به خشکی است که می‌تواند شناسایی و برای برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد (Sorkheh *et al.*, 2011). اکثر گیاهان دارای مکانیسم‌های خاصی برای تحمل به خشکی و افزایش راندمان مصرف آب هستند. مکانیسم‌های تحمل به خشکی به‌طور گسترده در محصولات کشاورزی شناخته شده است، اما مطالعات کمتری در درختان میوه انجام شده است (Rieger & Duemmel, 1992). با توجه به نقش حیاتی پایه‌های مقاوم در تولید پایدار بادام و نیز اهمیت روزافزون استفاده از روش‌های نوین تکثیر برای شناسایی و انتخاب ارقام و پایه‌های متحمل به تنش‌های غیرزیستی، هدف این تحقیق بررسی پاسخ‌های مورفولوژیکی چند گونه و هیبرید بین گونه‌ای بومی بادام ایران (شامل *Prunus elaeagnifolia*، *P. eburnea scoparia*، دورگه طبیعی *P. elaeagnifolia* × *P. scoparia*، و پایه تجاری GN) که یک هیبرید بین گونه ای از

بادام رقم گارفی و پایه هلوی نامرد (*Prunus dulcis* × *P. persica*) است، در شرایط درون‌شیشه‌ای و تحت تنش خشکی شبیه‌سازی‌شده با استفاده از PEG بود. این پژوهش با هدف ارزیابی تحمل به خشکی در شرایط کنترل‌شده و مقایسه‌ای توان سازگاری آنها با هدف شناسایی منابع ژنتیکی مقاوم برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی و تکثیر تجاری پایه‌های بادام انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

شاخه‌های جوان در اردیبهشت ماه از درختان هفت ساله ارژن^۱، بادام کوهی^۲، بادام خاکستری^۳، یک هیبرید طبیعی^۴ (*P. scoparia* × *P. elaeagnifolia*) و پایه تجاری گارنم (GN) که یک هیبرید بین گونه‌ای از بادام رقم گارفی و پایه هلوی نامرد (*Prunus dulcis* × *P. persica*) است، موجود در کلکسیون بادام دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، فارس در سال ۱۴۰۱ برداشت شد. طول شاخه‌های جمع‌آوری شده ۱۰-۱۵ سانتی متر بود. ریزنمونه‌های برداشت شده در همان روز که از درخت جدا شدند، بلافاصله برگ‌های آنها حذف شد و تحت تیمار ضد عفونی قرار گرفتند. بدین منظور، شاخه‌های جوان، به مدت ۳۰ دقیقه با آب لوله کشی شسته شدند و سپس در قارچ کش بنومیل پنج درصد به مدت ۹۰ دقیقه ضد عفونی شدند. سپس ریزنمونه‌ها زیر هود لامینار به مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند، و در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد (w/v) به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند و سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند (Rezaei et al., 2023). به منظور استقرار شاخه‌ها روی محیط کشت و القاء شاخه زایی، شاخه‌های ضد عفونی شده سطحی نژادگان مختلف بادام (به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی متر) روی محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی غلظت‌های مشخصی از هورمون‌های GA₃ (۴ میلی گرم بر لیتر)، TDZ (۱ میلی گرم بر لیتر) و IBA (۰/۱ میلی گرم بر لیتر) قرار گرفتند (Rezaei et al., 2023). محیط‌های کشت مورد استفاده برای رشد درون‌شیشه‌ای پیش از اتوکلاو، در pH ۵/۵ تا ۵/۷ تنظیم و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۵ بار به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. پس از اتوکلاو، محیط‌ها در شرایط استریل و در زیر هود لامینار درون شیشه‌ها ریخته شدند. ریزنمونه‌های ضد عفونی شده بر روی این محیط‌ها کشت شده و شیشه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۶ ساعته و شدت نور ۴۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه نگهداری شدند. ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت چهار هفته در این محیط‌ها رشد داده شدند و سپس به محیط‌های تازه با ترکیب مشابه منتقل شدند و به مدت چهار هفته دیگر در همان شرایط نگهداری شدند. پس از استقرار و القاء، در مرحله بعد، گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط کشت بافت از نژادگان‌های مختلف انتخاب شدند. شاخه‌هایی به طول ۳-۴ سانتی متر با شرایط رشدی مشابه انتخاب شد و روی محیط کشت MS حاوی ۳ سطح خشکی (۰، ۳/۵ و ۷ درصد PEG 6000) و سه تکرار و هر تکرار ۲ شاخه قرار گرفتند. پس از دو هفته صفات تعداد برگ سالم، تعداد برگ نکرده شده، طول ساقه (سانتی متر)، وزن خشک (گرم)، وزن تر (گرم) ثبت شد.

واکاوی آماری

آزمایش مربوط به تنش خشکی بصورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با دو عامل (ژنوتیپ در ۵ سطح و تنش در سه سطح) در شرایط کشت بافت اجرا شد. داده‌ها بر اساس تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و تحلیل شدند. سپس از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) با احتمال ۹۵ درصد برای نشان دادن تفاوت در مقادیر میانگین داده‌ها در بین گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مختلف و غلظت‌های هورمون استفاده شد.

نتایج و بحث

گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مورد مطالعه، در شرایط تنش خشکی ناشی از PEG قرار گرفتند و نتایج مربوط به صفات مختلف اندازه گیری شده، در زیر ارائه می گردد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده ژنوتیپ و تنش بر تمام صفات

مورد مطالعه در سطح ۱ درصد معنی دار بود، در حالیکه اثر متقابل ژنوتیپ*تنش بر هیچ یک از صفات مورد مطالعه معنی دار نبود (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مربوط به آزمایش ارزیابی تحمل به خشکی در شرایط درون شیشه.

Table 1. Analysis of variance of traits related to drought tolerance evaluation under *in vitro* conditions.

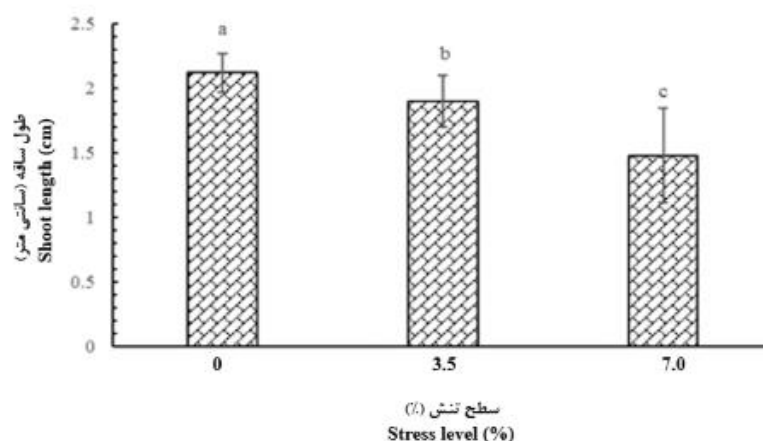
میانگین مربعات Average square					درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Source of variation
تعداد برگ بافت مرده No. necrotic leaf	تعداد برگ سالم No. healthy leaf	وزن تر (گرم) Fresh weight (g)	وزن خشک (گرم) Dry weight (g)	طول ساقه (سانتی متر) Shoot length (cm)		
4.63**	205.20**	4.45**	0.051**	5.19**	4	ژنوتیپ (Genotype)
86.15**	46.96**	1.69**	0.041**	1.58**	2	تنش (Stress)
1.43 ns	3.02 ns	0.019 ns	0.0002 ns	0.021 ns	8	ژنوتیپ × تنش (Genotype × Stress)
1.12	5.80	0.061	0.0007	0.066	30	خطای آزمایشی (Error)
45.6	15.30	8.84	8.04	14.02	-	ضریب تغییرات (CV)

*و** معنی دار به ترتیب در سطح ۵ و ۱ درصد، ns عدم معنی داری.

*, **, significant at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively. ns; non-significant.

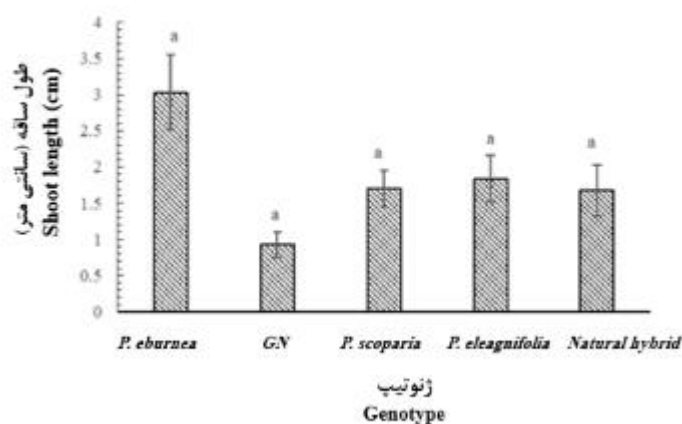
طول ساقه

نتایج مربوط به صفت طول ساقه نشان داد که با افزایش میزان تنش، طول ساقه در گیاهان تحت تنش کاهش می یابد. به طوریکه، بیشترین طول ساقه (۲/۱۲ سانتی متر) مربوط به تیمار شاهد و کمترین طول ساقه (۱/۴۸ سانتی متر) در تیمار ۷ درصد تنش ثبت شد (شکل ۱). بادام کوهی، ارژن و هیبرید طبیعی با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند. بادام خاکستری بیشترین طول ساقه (۳/۰۳ سانتی متر) و GN کمترین طول ساقه (۰/۹۲ سانتی متر) را نشان داد (شکل ۲).



شکل ۱- اثر سطوح مختلف تنش بر طول ساقه ژنوتیپ‌های مختلف بادام. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).

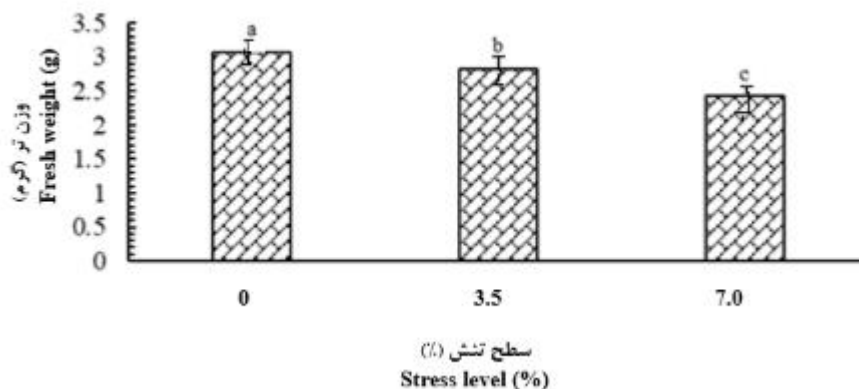
Fig. 1. Effect of different stress levels on shoot length of various almond genotypes. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).



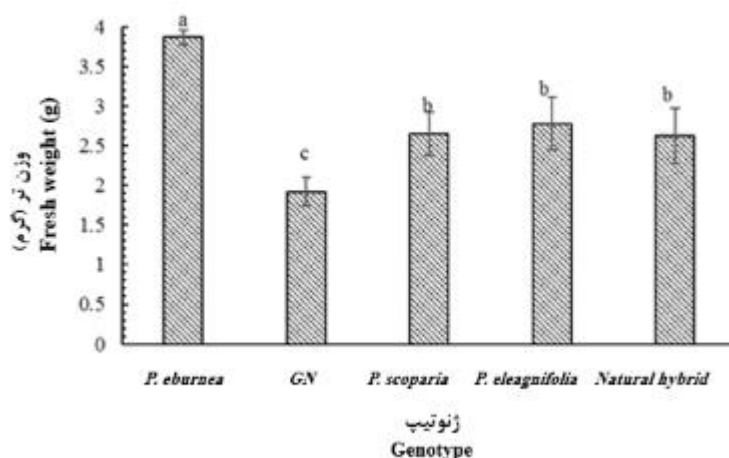
شکل ۲- اثر ژنوتیپ‌های مختلف بر صفت طول ساقه. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).
Fig. 2. Effect of different genotypes on shoot length trait. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

وزن تر اندام هوایی

نتایج نشان داد که با افزایش میزان تنش، وزن تر اندام‌های گیاهی کاهش معنی داری نشان داد، به طوریکه بیشترین وزن تر (۳/۰۷ گرم) مربوط به تیمار بدون تنش بود و کمترین وزن تر (۲/۴۲ گرم) در تیمار ۷ درصد PEG ثبت شد (شکل ۳). نتایج مربوط به وزن تر نشان داد که نژادگانه‌های مختلف مورد مطالعه از نظر وزن تر تفاوت معنی داری با یکدیگر داشتند. بیشترین وزن تر (۳/۸۷ گرم) مربوط به بادام خاکستری و کمترین وزن تر (۱/۹۲ گرم) مربوط به GN بود (شکل ۴).



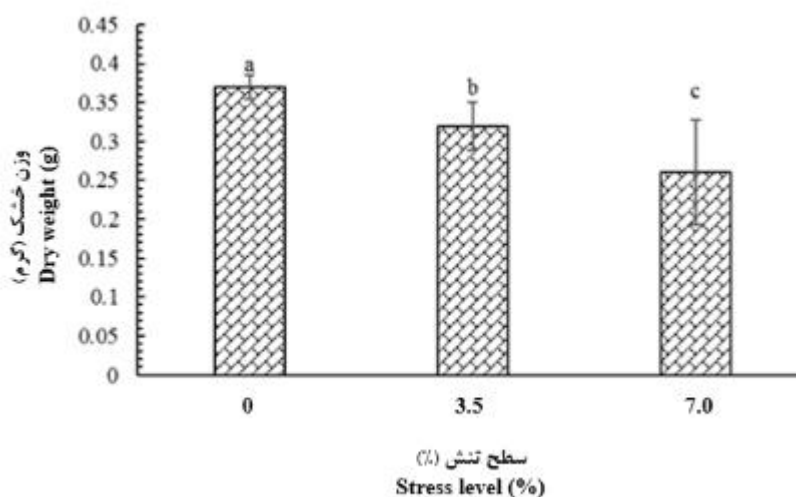
شکل ۳- اثر سطوح مختلف تنش بر وزن خشک ژنوتیپ‌های مختلف بادام. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).
Fig. 3. Effect of different stress levels on dry weight of various almond genotypes. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).



شکل ۴- اثر ژنوتیپ‌های مختلف بر صفت وزن تر. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).
 Fig. 4. Effect of different genotypes on fresh weight trait. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

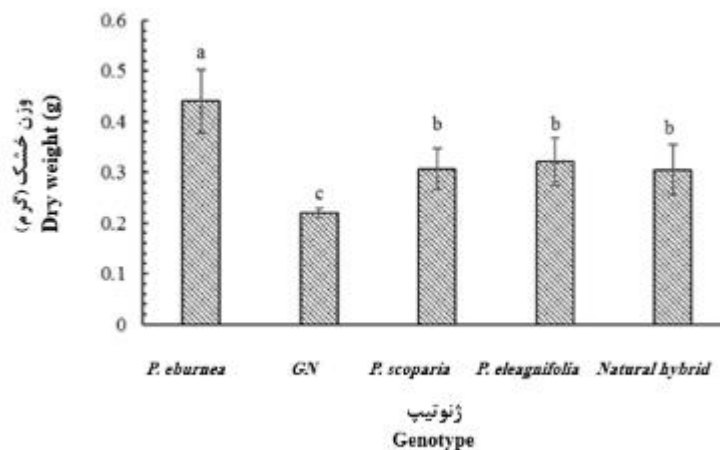
وزن خشک اندام هوایی

نتایج نشان داد که وزن خشک اندام هوایی با افزایش سطح تنش کاهش یافت. بیشترین وزن خشک (۰/۳۷ گرم) مربوط به تیمار شاهد بود و کمترین وزن خشک (۰/۲ گرم) مربوط به تیمار ۷ درصد PEG بود (شکل ۵). همچنین، نژادگانه‌های مختلف از نظر وزن خشک اندام هوایی با یکدیگر تفاوت معنی داری داشتند. بادام خاکستری با ۰/۴۴ گرم وزن خشک، بیشترین وزن خشک را داشت، در حالی که GN با ۰/۲۲ گرم وزن خشک، کمترین وزن خشک را داشت (شکل ۶).



شکل ۵- اثر سطوح مختلف تنش بر صفت وزن خشک ژنوتیپ‌های مختلف بادام. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).

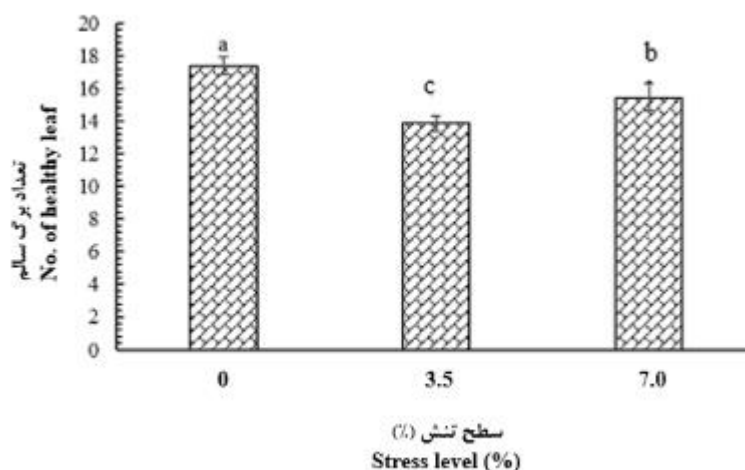
Fig. 5. Effect of different stress levels on dry weight of various almond genotypes. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).



شکل ۶- اثر ژنوتیپ‌های مختلف بر صفت وزن خشک. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).
Fig. 6. Effect of different genotypes on dry weight trait. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

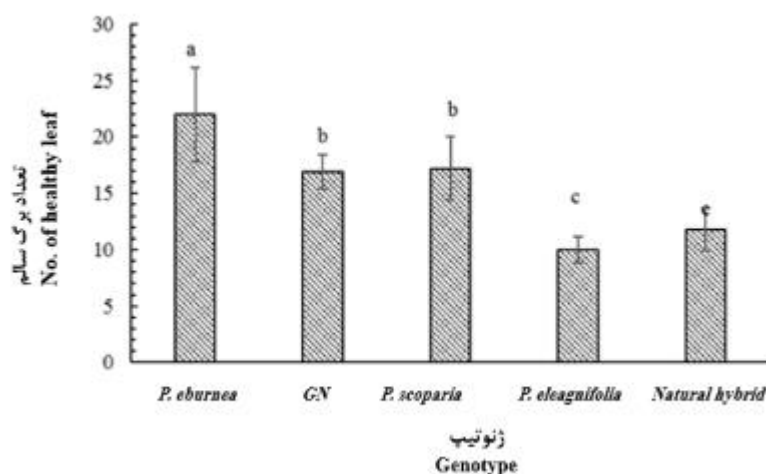
تعداد برگ سالم

تنش باعث کاهش تعداد برگ سالم در نژادگانه‌های مختلف شد. بیشترین تعداد برگ سالم (۱۷/۴) مربوط به تیمار بدون تنش بود و کمترین تعداد برگ سالم (۱۳/۸۶) در تیمار ۳/۵ درصد PEG ثبت شد (شکل ۷).
همچنین، از نظر تعداد برگ سالم بین نژادگانه‌های مختلف، تفاوت معنی داری مشاهده شد. بیشترین تعداد برگ سالم (۲۲) مربوط به بادام خاکستری بود درحالی‌که ارژن کمترین تعداد برگ سالم (۱۰) را داشت. ارژن و هیبرید طبیعی از نظر تعداد برگ سالم با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند. همچنین، GN و بادام کوهی نیز از نظر تعداد برگ سالم تفاوت معنی داری نشان ندادند (شکل ۸).



شکل ۷- اثر سطوح مختلف تنش بر صفت تعداد برگ سالم ژنوتیپ‌های مختلف بادام. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).

Fig. 7. Effect of different stress levels on the number of healthy leaves in various almond genotypes. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

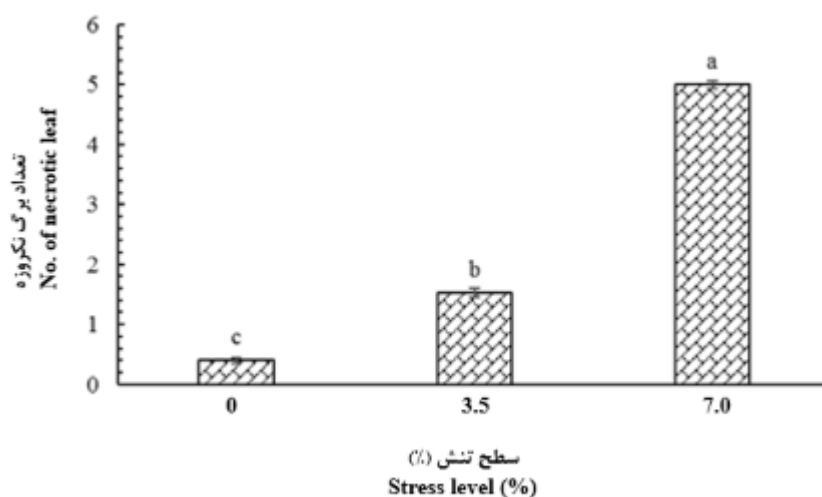


شکل ۸- اثر ژنوتیپ‌های مختلف بر صفت تعداد برگ سالم. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).
 Fig. 8. Effect of different genotypes on the number of healthy leaves. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

تعداد برگ بافت‌مرده

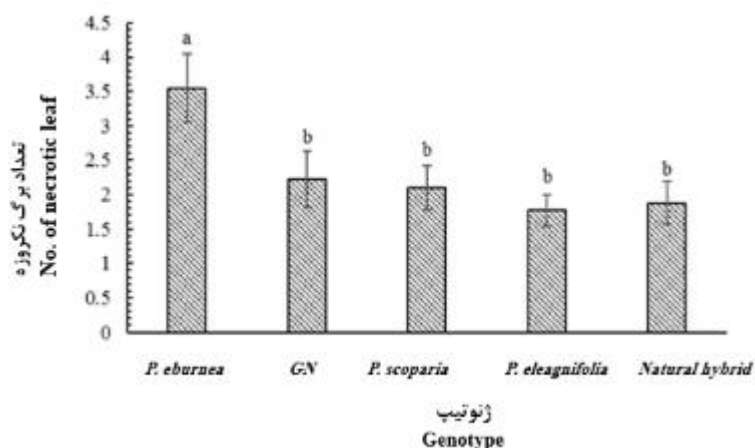
نتایج نشان داد که افزایش تنش باعث افزایش تعداد برگ نکروز شده در نژادگانه‌های مورد مطالعه شد. به طوریکه، بیشترین تعداد برگ نکروز شده (۵) مربوط به تیمار ۷ درصد PEG و کمترین تعداد برگ نکروزه (۰/۴) در تیمار شاهد ثبت شد (شکل ۹).

GN، بادام کوهی، ارژن و هیبرید طبیعی، از نظر تعداد برگ نکروزه با یکدیگر نداشتند اما بادام خاکستری بیشترین تعداد برگ نکروزه (۳/۵۵) را نشان داد (شکل ۱۰ و ۱۱).



شکل ۹- اثر سطوح مختلف تنش بر تعداد برگ نکروزه ژنوتیپ‌های مختلف بادام. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).

Fig. 9. Effect of different stress levels on the number of necrotic leaves in various almond genotypes. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).



شکل ۱۰- اثر ژنوتیپ‌های مختلف بر صفت تعداد برگ نکروزه شده. میانگین‌های با حرف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P \leq 0.05$).

Fig. 10. Effect of different genotypes on number of necrotized leaves. Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).



شکل ۱۱- پاسخ‌های مورفولوژیک دو ژنوتیپ مختلف در شرایط کشت بافت.

Fig. 11. Morphological responses of different almond genotypes under *in vitro* culture conditions.

بحث

تغییرات اقلیمی جهانی به طور قطع بر فراوانی و مدت زمان خشکسالی‌ها تأثیر گذاشته و می‌تواند منجر به نابودی اکوسیستم‌ها در آینده شود (Salahvarzi *et al.*, 2021). در این راستا، درک مکانیسم‌های تحمل به خشکی گیاهان به ویژه در گونه‌های درختی از اهمیت اساسی برخوردار است. مطالعات متعددی در مورد تحمل گونه‌های مختلف به تنش‌های محیطی از جمله خشکی انجام شده است (Yang *et al.*, 2016). PEG عنوان یک روش مناسب برای شبیه‌سازی شرایط تنش خشکی و ارزیابی اثرات آن بر رشد و نمو گیاهان در شرایط کنترل‌شده درون شیشه‌ای شناخته می‌شود (Yildirim *et al.*, 2021).

کشت درون‌شیشه‌ای، روشی مؤثر برای تکثیر تجاری گیاهان عاری از بیماری و یکنواخت از نظر ژنتیکی محسوب می‌شود (Gantait *et al.*, 2011; Rokosa & Mikiciuk, 2017; Valliath & Mondal, 2023). برخلاف روش‌های سنتی که تحت تأثیر تغییرات فصلی قرار دارند، این تکنیک امکان تولید مداوم و کنترل‌شده در طول سال را فراهم می‌آورد (Chaudhari, 2023) و می‌تواند یک روش مناسب برای ارزیابی به تنش‌های مختلف باشد. در این مطالعه، گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مختلف بادام در شرایط کشت درون شیشه مستقر شدند و تحت تنش خشکی ناشی از غلظت‌های مختلف PEG قرار گرفتند.

طبق نتایج این پژوهش، با وجود معنی‌داری اثرات اصلی نژادگان و تنش خشکی بر تمامی صفات مورد ارزیابی، اثر متقابل نژادگان × تنش در هیچ‌یک از صفات مورد مطالعه معنی‌دار نشد. این امر نشان می‌دهد که واکنش گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مورد بررسی به سطوح مختلف تنش خشکی از الگوی نسبتاً مشابهی تبعیت کرده و تفاوت معناداری در ترتیب واکنش آن‌ها مشاهده نشده است. به بیان دیگر، کاهش یا افزایش هر یک از صفات، فارغ از نوع گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای، در تمامی سطوح تنش به شکل یکنواختی اتفاق افتاده است. چنین الگویی می‌تواند حاکی از وجود سازوکارهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی عمومی و مشابه در گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای در برابر تنش خشکی باشد، یا اینکه شدت تنش اعمال شده به اندازه‌ای نبوده است که تفاوت‌های ژنتیکی موجود در واکنش به تنش را آشکار کند (Farooq *et al.*, 2009; Seleiman *et al.*, 2021).

نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های بالای PEG منجر به کاهش معنی‌دار صفات مرفولوژیک در گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مورد مطالعه شد. این یافته با نتایج سایر پژوهش‌ها که کاهش وزن تر و خشک بادام تحت تأثیر PEG گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد (Karimi *et al.*, 2012; Sorkheh *et al.*, 2011). افزودن PEG به محیط کشت با کاهش پتانسیل آبی، شرایط تنش خشکی را شبیه‌سازی می‌کند که این امر منجر به اختلال در جذب آب و در نتیجه کاهش رشد کالوس و باززایی درون‌شیشه‌ای در گیاه می‌شود. اگرچه مکانیسم اصلی این اثر، افزایش غلظت محلول در محیط کشت و در نتیجه کاهش دسترسی به آب است (Aazami *et al.*, 2010). بادام یک محصول خشکبار است که به دلیل تحمل به خشکی و شرایط کم آب در مناطق خشک و نیمه خشک کاشته می‌شود. با این حال، برای تولید اقتصادی، نیاز به آبیاری در فصل دیم دارد، اگرچه بادام برای بقای خود سازگاری فیزیولوژیکی در کمبود آب نشان می‌دهد، اما تحمل به خشکی در ارقام مختلف متفاوت است (Karimi *et al.*, 2012).

برای جلوگیری از کاهش عملکرد محصولات کشاورزی در دوره‌های خشکسالی، توسعه گیاهانی که شرایط نامطلوب را تحمل کنند ضروری است (Ashrafi *et al.*, 2018). بنابراین یکی از رویکردهای مدیریت تنش خشکی، کشت پایه و ارقام متحمل به خشکی است. تحمل به تنش خشکی نتیجه اثر متقابل صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است (Lotfi *et al.*, 2019). بنابراین، ارزیابی و شناسایی ارقام متحمل درختان میوه برای تنش خشکی و توانایی رشد آنها در این شرایط بسیار مهم است (Ranjbar *et al.*, 2019). همچنین اشاره شده است که پاسخ به تنش آبی به پایه بستگی دارد (Isaakidis *et al.*, 2004) و پاسخ به خشکی بین گونه‌های بادام متفاوت است (Zokaee-Khosroshahi *et al.*, 2014). برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که برگ‌های گونه *P. scoparia* تحت تنش قرار گرفته اند اما در گونه *P. lycioides* برخی از برگ‌ها زنده می‌مانند و قادر به انجام فتوسنتز هستند که نشان دهنده تأثیر مستقیم تنش خشکی بر فتوسنتز در برخی از ارقام گیاهان است (Barzegar *et al.*, 2012). نتایج آزمایش نشان داد که افزایش سطح تنش باعث کاهش صفات رشدی گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای بادام در شرایط تنش شد. افزایش سطوح PEG از طریق ایجاد فشار اسمزی منفی و ایجاد تنش اسمزی در گیاه باعث کاهش آب در دسترس گیاه می‌شود (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2004). وقتی که تنش خشکی در محیط رشد گیاه ایجاد می‌شود، پتانسیل آب محیط گیاه نسبت به شرایط طبیعی، منفی تر می‌شود و در نتیجه جذب آب گیاه با مشکل مواجه می‌شود. در تحقیق حاضر نیز کمبود رشد گیاه و آسیب پارامترهای رشدی گیاه را می‌توان به کاهش جذب آب ناشی از تنش خشکی ایجاد شده بوسیله PEG نسبت داد که با نتایج تحقیقات دیگر در شرایط درون شیشه روی خرما^۱ (Al-Khayri & Al-Bahrany, 2004)، تمشک^۲ (Georgieva *et al.*, 2004)، دو نژادگان موز^۳ (Chai *et al.*, 2005) و پایه گیلان گزیلا^۴ (Sivritepe *et al.*, 2008)، گردو^۵ (Nazari *et al.*, 2022)، زیتون^۶ (Silvestri *et al.*, 2017)، سپیدار^۷ (Vuksanović *et al.*, 2019) و چند نژادگان بادام^۸ (Karimi *et al.*, 2012) مطابقت دارد.

۳- 'Musa AA 'Mas and Musa AAA 'Berangan' -
۷- *Populus alba* L.

۶- *Olea europaea*

۲- *Rubus idaeus*

۵- *Juglans regia*

۱- *Phoenix dactylifera*

۴- *Prunus cerasus* × *P. canescens*

۸- *Prunus dulcis* (Mill.)

فرآیندهایی همچون جریان توده‌ای، انتشار و یا جذب و انتقال بوسیله ی اسمز که جزء مکانیزم های جذب و انتقال عناصر معدنی در گیاه هستند، همه تا حدودی تابعی از مقدار رطوبت در دسترس گیاه هستند و در صورت عدم دسترسی رطوبت، شدت و مقدار جذب عناصر معدنی دچار اشکال می شود (Lazar, 2003). بنابراین می توان کاهش صفات رشدی در گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای بادام را ناشی از کاهش جذب عناصر معدنی مورد نیاز گیاه نیز نسبت داد. کاهش رشد سطح برگ در شرایط خشکی سطح جذب نور را کاهش می دهد که فتوسنتز و رشد گیاه را محدود می کند (Hsiao, 1973). با این حال، همانطور که در تحقیقات قبلی ذکر شده است، کاهش محتوای آب احتمالاً دلیل اصلی کاهش رشد ریزنمونه‌های بادام است. از دست دادن برگ‌ها در شرایط تنش خشکی یکی از دلایل اصلی کاهش وزن خشک ریزنمونه است (Karimi et al., 2012). کاهش تعداد برگ های توسعه یافته را می توان به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر تحمل به خشکی در نظر گرفت که به گیاهان کمک می کند نور کمتری جذب کنند و بنابراین سطح تعرق کمتری دارند. این می تواند به دلیل تقاضای آب کمتر برای تقسیم سلولی در مقایسه با روند افزایش طول سلول باشد. همچنین نتایج آزمایشی که بر روی نهال بادام انجام شد نشان داد که با افزایش زمان بین آبیاری‌ها، شاخص‌های رویشی مانند ارتفاع بوته، قطر ساقه، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی به طور معنی‌داری کاهش یافت (Mousavi et al., 2009).

پاسخ به خشکی بین گونه های بادام متفاوت است (Rezaei et al., 2023). کاهش تعداد برگ‌ها، افزایش تولید اتیلن به دلیل تنش و ریزش برگ گزارش شد (McMichael et al., 1973). از سوی دیگر، در طول دوره تنش، گیاهان تمایل به کاهش تعرق با کاهش تعداد برگ داشتند که در مطالعه ی ما هم مشهود بود (Jones & Corlett, 1992). نتایج مشابه نیز گزارش شده است که تحت شرایط تنش اسمزی خاص، برخی از گونه‌های بادام وحشی در شرایط آزمایشگاهی تغییرات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی را نشان می‌دهند (Rajabpoor et al., 2014).

مطالعه حاضر نشان داد که افزایش غلظت پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) در محیط کشت موجب کاهش معنی‌دار در تعداد برگ‌ها شد، که این کاهش با شدت تنش خشکی القاشده ارتباط مستقیم داشت. این یافته‌ها با مطالعات قبلی هم‌راستا هستند؛ برای مثال، سایر محققان گزارش کردند که در گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مختلف بادام افزایش درصد PEG در محیط کشت، تعداد برگ به‌طور معناداری کاهش یافت (Karimi et al., 2012). همچنین، در پژوهش دیگری مشخص شد که در انگور، با افزایش غلظت PEG تا ۶ درصد، تعداد برگ حدود ۶۸ درصد کاهش داشت (Mohsen et al., 2020). این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از PEG به‌عنوان عامل القاکننده تنش خشکی در شرایط کنترل‌شده، ابزاری کارآمد برای بررسی تحمل نژادگان مختلف به خشکی می‌باشد و می‌تواند به شناسایی هم گروه های مقاوم‌تر کمک کند.

پاسخ گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مختلف بادام نسبت به شرایط تنش متفاوت بود، اما به طور کلی ن گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای وحشی و هیبرید طبیعی نسبت به GN تحمل بیشتری به تنش نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غربالگری گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای بادام متحمل به خشکی از طریق روش‌های آزمایشگاهی امکان‌پذیر است. گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای بادام متحمل به خشکی کاهش کمتری در پارامترهای رشد نشان دادند و پایداری بهتر تحت تنش خشکی داشتند. گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای متحمل به خشکی توانایی تحمل کم‌آبی ناشی از تنش اسمزی ایجاد شده بوسیله PEG را با آسیب کمتر نشان دادند که با نتایج کریمی و همکاران (۲۰۱۲) در بادام همخوانی دارد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر به وضوح نشان داد که تنش خشکی القا شده توسط PEG تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشدی برخی از گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مورد مطالعه بادام دارد. با افزایش غلظت PEG، کاهش قابل توجهی در وزن تر و خشک، طول ساقه و تعداد برگ سالم در تمام نژادگان‌ها مشاهده شد. در بین گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مورد بررسی، *P. eburnea* به‌عنوان متحمل‌ترین گونه شناسایی شد که بالاترین مقادیر شاخص‌های رشدی را حتی در شرایط تنش حفظ کرد، در حالی که پایه تجاری GN حساس‌ترین رفتار را نشان داد. نتایج این پژوهش مؤید این نکته است که روش کشت بافت ابزاری کارآمد و قابل اعتماد برای ارزیابی اولیه تحمل به خشکی در ن گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای مختلف محسوب می‌شود. این یافته‌ها می‌تواند مبنای ارزشمندی برای برنامه‌های اصلاحی آینده جهت توسعه ارقام متحمل به خشکی باشد. همچنین،

شناسایی انواع متحمل مانند *P. eburnea* می‌تواند در مدیریت پایدار باغات بادام در مناطق خشک و نیمه‌خشک مورد استفاده قرار گیرد. برای مطالعات آینده، بررسی مکانیسم‌های مختلف دخیل در تحمل به خشکی این گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای و همچنین آزمون این نتایج در شرایط مزرعه‌ای پیشنهاد می‌شود.

References

منابع

- Aazami, M., Torabi, M., & Jalili, E. (2010). In vitro response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress. *African Journal of Biotechnology*, 9(26), 4014-4017 .
- Agunbiade, V. F., & Babalola, O. O. (2024). Drought stress amelioration attributes of Plant-Associated Microbiome on Agricultural plants. *Bioinformatics and Biology Insights*, 18, 11779322241233442 .
- Akbarpour, E., Imani, A., & Ferdowskhah Yeganeh, S. (2017). Physiological and morphological responses of almond cultivars under in vitro drought stress. *Journal of Nuts*, 8(1), 61-72 .
- Al-Khayri, J., & Al-Bahrany, A. (2004). Growth, water content, and proline accumulation in drought-stressed callus of date palm. *Biologia Plantarum*, 48(1), 105-108 .
- Ashrafi, M., Azimi-Moqadam, M.-R., Moradi, P., MohseniFard, E., Shekari, F., & Kompany-Zareh, M. (2018). Effect of drought stress on metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive thyme. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 391-399 .
- Barzegar, K., Yadollahi, A., Imani, A., & Ahmadi, N. (2012). Responses to drought stress of almond cultivars and genotypes grown under field conditions. *International Journal of Agriculture*, 2(3), 205 .
- Chai, T.-T., Fadzillah, N., Kusnan, M., & Mahmood, M. (2005). Water stress-induced oxidative damage and antioxidant responses in micropropagated banana plantlets. *Biologia Plantarum*, 49, 153-156 .
- Chaudhari, V. (2023). Tissue Culture: Aeon of Micro Propagation in Vegetable Crops. *International Journal of Environment and Climate Change*, 13, 1989-1999 .
- Fatima, S., Aslam, R., Shahzadi, K., Awan, H., Nadeem, M., Shabir, M., Shafiq, Y., & Hamid, M. (2024). Effect of drought stress at growth and development of pea (*Pisum sativum* L.). *Asian Journal of Research in Crop Science*, 9, 76-80 .
- Gantait, S., Mandal, N., & Nandy, S. (2011). Advances in micropropagation of selected aromatic plants: a review on vanilla and strawberry. *American Journal of Molecular Biology*, 1(1), 1-19 .
- Georgieva, M., Djilianov, D., Konstantinova, T., & Parvanova, D. (2004). Screening of Bulgarian raspberry cultivars and elites for osmotic tolerance in vitro. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 18(2), 95-98 .
- Gohari, S., Imani, A., Talaei, A., Abdossi, V., & Asghari, M. (2023). Physiological responses of almond genotypes to drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(6), 141 .
- Hsiao, T. C. (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 519-570 .
- Isaakidis, A., Sotiropoulos, T., Almaliotis, D., Therios, I., & Stylianidis, D. (2004). Response to severe water stress of the almond (*Prunus amygdalus*) 'Ferragnès' grafted on eight rootstocks. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32(4), 355-362 .
- Karimi, S., Yadollahi, A., Moghadam, R. N., Imani, A., & Arzani, K. (2012). In vitro screening of almond (*Prunus dulcis* (Mill.)) genotypes for drought tolerance. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 6(18), 263-270
- Lazar, T. (2003). Taiz, L. and Zeiger, E. Plant physiology. 3rd edn. In: *Oxford University Press*
- Mashaikhi, M., Habibi, A., Amiri, E., & Ismail, M. (2016). The mechanism of drought stress tolerance in GF677 rootstock (peach and almond hybrid) under in vitro conditions. *Agricultural Improvement Journal*, 16(3), 701-707. (In Persian)

- Mohsen, A., Stino, R., Abd Allatif, A., & Zaid, N. (2020). In vitro evaluation of some grapevine rootstocks grown under drought stress. *Plant Archives*, 20(1), 1029-1034 .
- Mousavi, A., Madani, B., Rahemi, M., & Martinez-Gomez, P. (2009). Morphological characteristics and graft-take of Iranian wild almond rootstocks. V International Symposium on Pistachios and Almonds 912 ,
- Nagpal, M., Heilemann, J., Klauer, B., Gawel, E., & Klassert, C. (2024). Hydro-economic assessment of biophysical drought impacts on agriculture. EGU General Assembly Conference Abstracts. DOI: 10.5194/egusphere-egu24-17486
- Nazari, M., Tohidfar, M., Ramshini, H., & Vahdati, K. (2022). Molecular and morphological evaluation of transgenic Persian walnut plants harboring Fld gene under osmotic stress condition. *Molecular Biology Reports*, 49(1), 433-441.
- Ranjbar, A., Imani, A., Piri, S., & Abdoosi, V. (2019). Effects of drought stress on almond cultivars responses grafted on different rootstocks. *Journal of Nuts*, 10(1), 9-24 .
- Rezaei, A., Gharaghani, A., Shekafandeh, A., & Eshghi, S. (2023). Developing a promising micropropagation method for several drought tolerant and hard-to-root wild and domesticated almond genotypes by shoot tips culture. *Erwerbs-Obstbau*, 65(5), 1463-1477 .
- Rieger, M., & Duemmel, M. J. (1992). Comparison of drought resistance among Prunus species from divergent habitats. *Tree Physiology*, 11(4), 369-380 .
- Rinaldo, T., Ridolfi, E., Moccia, B., Marconi, F., D'Odorico, P., Russo, F., & Napolitano, F. (2024). The impact of drought on the water-food nexus at the global scale. EGU General Assembly Conference Abstracts. DOI: 10.5194/egusphere-egu24-13506
- Rodziewicz, D., & Dice, J. (2020). Drought Risk to the Agriculture Sector. *Economic Review (01612387)*, 105.
- Rojas, O. (2021). Next generation agricultural stress index system (ASIS) for agricultural drought monitoring. *Remote Sensing*, 13(5), 959 .
- Rokosa, M., & Mikiciuk, M. (2017). In vitro regeneration of Fragraria plants. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16(5), 145–158-145–158 .
- Satyavathi, V., Jauhar, P., Elias, E., & Rao, M. (2004). Effects of growth regulators on in vitro plant regeneration in durum wheat. *Crop Science*, 44(5) 1846-1839.
- Silvestri, C., Celletti, S., Cristofori, V., Astolfi, S., Ruggiero, B., & Rugini, E. (2017). Olive (*Olea europaea* L.) plants transgenic for tobacco osmotin gene are less sensitive to in vitro-induced drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 1-9 .
- Sivritepe, N., Erturk, U., Yerlikaya, C., Turkan, I., Bor, M., & Ozdemir, F. (2008). Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro. *Biologia Plantarum*, 52, 573-576 .
- Song, Y., Joo, J., Kim, H., & Park, M. (2024). Development and applicability evaluation of damage scale analysis techniques for agricultural drought. *Water*, 16(10), 1342 .
- Sorkheh, K., Shiran, B., Khodambshi, M., Rouhi, V., & Ercisli, S. (2011). In vitro assay of native Iranian almond species (*Prunus* L. spp.) for drought tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105, 395-404 .
- Valliath, A. S., & Mondal, R. (2023). Micropropagation of strawberry crop (*Fragaria ananassa*): A review. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*, 38(1), 41-44 .
- Vuksanović, V., Kovačević, B., Orlović, S., Kebert, M., & Kovač, M. (2019). The influence of drought on growth and development of white poplar shoots in vitro. *Topola*, (203), 13-18 .
- Xiao, F., Liu, Q., Qin, Y., Huang, D., & Liao, Y. (2024). Agricultural drought research knowledge graph reasoning by using VOSviewer. *Heliyon*, 10(6) .

- Yildirim, A. N., Şan, B., Yildirim, F., Celik, C., Bayar, B., & Karakurt, Y. (2021). Physiological and biochemical responses of almond rootstocks to drought stress. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 45(4), 522-532 .
- Zokaee-Khosroshahi, M., Esna-Ashari, M., Ershadi, A., & Imani, A. (2014). Morphological changes in response to drought stress in cultivated and wild almond species. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 1(1), 79-92 .

Morphological Response of Selected Almond Species and Interspecific Hybrids to Drought Stress under *In vitro* Conditions

Amir Rezaei¹, Ali Gharaghani^{1*}, Saeid Eshghi¹, Mansoureh Nazari²

1. Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

2. Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

*Corresponding author, Email: (agharghani@shirazu.ac.ir)

Drought, as one of the most significant challenges of climate change, has devastating effects on fruit crops' production. Using drought-tolerant scion and rootstock cultivars is one of the strategies to reduce the impact of this stress. This study was conducted to evaluate drought tolerance in five almond genotypes (*Prunus elaeagnifolia*, *P. scoparia*, *P. eburnea*, the natural hybrid *P. scoparia* × *P. elaeagnifolia*, and the commercial rootstock GN) under *in vitro* conditions in 2022 at the Horticulture Department Laboratory, Shiraz University. Shoot tip explants were disinfected and cultured on MS medium containing GA₃ (4 mg L⁻¹), IBA (0.1 mg L⁻¹), and TDZ (1 mg L⁻¹). The regenerated plantlets were exposed to drought stress treatments (0, 3.5, and 7% polyethylene glycol (PEG)), and growth parameters including shoot length, fresh and dry weight, and the number of healthy and necrotic leaves were evaluated. Results showed that *P. eburnea*, with the highest shoot length (3.03 cm), fresh weight (3.87 g), and dry weight (0.44 g), was the most tolerant species, while GN exhibited the highest sensitivity. Increasing PEG concentration led to a significant reduction in growth in all genotypes. Wild species and interspecific hybrids showed a clear advantage over the commercial rootstock in drought tolerance. The findings confirm the efficiency of *in vitro* methods for the preliminary screening of tolerant species and their application in breeding programs.

Keywords: Tissue culture, Drought stress, PEG, Micropropagation, Tolerant rootstock