Archive of SID

بررسی تغییرات آنیوپلوییدی نیشکر در شرایط کشت بافت

شهاب سادات[۱]، مهدی سلطانی حویزه[۲] و عادل اعطا[۳]

۱و۲) اعضاء هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز
۳) کارشناس ارشد اصلاح نباتات و مدرس دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۵/۱۱ **تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۸/۲۶**

چکیده

به منظور بررسی تغییرات آنیوپلوییدی نیشکر (*Saccharum officinarum L.*)، در شرایط کشت بافت، سترون سازی برگ های اولیه نیشکر واریته CP69-1062، با ۶ تیمار در یک طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تیمار هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه همراه با کلرورجیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه، بهترین نتایج را در سترون سازی برگ های اولیه به همراه داشت. جهت کالوس زایی، ۶ تیمار در یک طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار ارزیابی شد. محیط MS پایه که با 2,4-D به میزان ۲/۵ میلی گرم در لیتر تکمیل شده بود، بهترین نتیجه را در القای کالوس از برگ های اولیه دارا بود. باززایی کالوس ها در پنج تیمار در یک طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار بررسی گردید. محیط MS که با ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA تکمیل شده بود و نیز محیط MS که با ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA تکمیل شده بود، به عنوان بهترین تیمارهای باززایی از کالوس‌های موجود معرفی شدند. ریشه زایی نوشاخه ها، در پنج تیمار در یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد مطالعه قرار گرفت. محیط MS که با ۳/۵ میلی گرم در لیتر NAA تکمیل شده بود، بعنوان بهترین تیمار ریشه زایی پیشنهاد گردید. ۴۵ روز پس از انتقال گیاهک های باززایی شده به خاک (۷۱٪ سازگاری)، مطالعات سیتوژنتیکی انجام شد. ۳۲/۵٪ گیاهک های انتخابی، آنیوپلوییدی را در سلول های مریستمی ریشه نشان دادند.

واژه های کلیدی: نیشکر، کالوس، باززایی، ریشه زایی، سازگاری.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نیشکر(*Saccharum* sp.) محصول اصلی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان است که عمدتاً برای تولید شکر و اتانول کشت و زرع می شود (Lalitha and Premachandran, 2007). کشور ایران نیز با دارا بودن شرایط اقلیمی خاص در بعضی مناطق، مناسب کشت و زرع نیشکر می باشد. نیاز به واریته های جدید که جایگزین ارقام پیشین گردند در مناطق نیشکر خیز ایران به خوبی احساس می گردد. آن چه که نیاز به واریته های جدید را در مناطق نیشکر خیز ایران اجتناب ناپذیر می سازد، جلوگیری از آسیب پذیری ژنتیکی ارقامی است که برای سالیان متمادی کشت و زرع می شوند. از بین رفتن واریته NCo310 در اثر بیماری سیاهک نیشکر که منجر به خساراتی هنگفت به شرکت های کشت و صنعت گردید نمونه ای بارز از روی آوردن به کاشت این رقم برای بیش از ۲۰ سال است. به دلیل پیچیدگی ژنتیکی بیشتر این گیاه در مقایسه با گیاهان با ژنوم کوچک تر، معرفی یک واریته نیشکر به روش های اصلاحی کلاسیک، به زمان نسبتاً طولانی(معادل ۱۰ تا ۱۵ سال) نیاز دارد. (Liu and Chen, 1984; Krishnamurthi, 1986; Siddiqui *et al*., 1994). از طرفی، فراهم نبودن شرایط اقلیمی مناسب جهت گلدهی نیشکر در ایران، نیاز آن را به شرایط کنترل شده گلخانه ای ضروری می سازد که می تواند زمان لازم برای یک برنامه اصلاحی را بیش از پیش افزایش دهد. کشت بافت گیاهی نقش اساسی در بهبود ژنتیکی گیاهانی نظیر نیشکر دارد که به روش غیرجنسی تکثیر می یابند (Liu and Chen, 1984; Krishnamurthi, 1986; Siddiqui *et al*., 1994). گیاهان باززایی شده از کالوس و کشت های سلولی، حساس به تنوعات سوماکلونی هستند (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲؛ Silvarolla, 1992; Damasco *et al.,* 1996). زیرا این تنوعات، مسیر طبیعی را برای رشد، توسط مریستم های بعدی دنبال نمی کنند (Burner and Grisham, 1995). گیاهانی که از کالوس باززایی می شوند، مستعد تولید واریانت های سوماکلونی برای صفات مختلفی نظیر عملکرد بالا، مقاومت به بیماری، بردباری به خشکی، جبران قند از دست رفته پس از خسارت، زودرسی و غیره برای نیشکر هستند (Niaz and Quraishi, 2002). صفات کمی ایجاد شده ناشی از تنوعات سوماکلونی، مکرراً در نتاج حاصل از گیاهان باززایی شده مشاهده شده است (Duncan, 1997; Veilleux and Johnson, 1998; Kaeppler *et al*., 2000). همچنین پایداری صفات کیفی حاصل از کشت بافت به نسل های بعد نیز به کرات گزارش گردیده است (Larkin and Scowcroft, 1981, 1983; Orton, 1984; Ahloowalia, 1986; Larkin, 1987; Sun and Zheng, 1990; Peschke and Phillips, 1992; Kaeppler and Phillips, 1993). ثابت شده است که با افزایش سن کالوس، احتمال تنوعات سوماکلونی که عمدتاً آنیوپلوییدی هستند، در گیاهک های حاصله افزایش می یابد(Taji *et al*., 2001; Kaeppler *et al.,* 2000; Fukui, 1983; Zehr *et al.,* 1987). Jehan Khan و همکاران (۲۰۰۴) کالوس های یک ماهه حاصل از کشت برگ اولیه نیشکر در واریته CP43-33 را باززایی نموده و

www.SID.ir

Archive of SID

صفاتی مانند تعداد پنجه، ارتفاع ساقه، تعداد گره و پهنای باند ریشه را با تنوع ۲۰، ۵۰، ۸/۳۳ و ۱۴/۳ به ترتیب در گیاهک های باززایی شده گزارش نمودند. همچنین میزان بریکس و قطر ساقه به ترتیب ۵ و ۱۲/۵ درصد تنوع را نشان داد. سابقه تحقیقات سیتوژنتیکی انجام گرفته بر روی نیشکر نیز نشان می دهد که اکثر سیتولوژیست هایی که با نیشکر سرو کار داشته اند بر این عقیده اند که کروموزوم های نیشکر کوچک بوده و از نظر اندازه متفاوت هستند(Heinz *et al.,* 1969; Price, 1963؛ داوودی و همکاران، ۱۳۸۶). با این حال تمام گونه های جنس ساکاروم از نظر سیتوژنتیکی شناسایی شده و خصوصیات مورفولوژیکی آنها نیز به خوبی مطالعه شده است (Price, 1960; Bremer, 1961; Daniels and Roach, 1987; Nair, 1975) . بر این اساس، در این تحقیق سعی بر آن است تا پس از سترون سازی برگ های اولیه نیشکر واریته CP69-1062 که یکی از ارقام تجاری ایران است اقدام به تولید کالوس نموده، پس از بازکشت های متوالی، احتمال تنوعات سوماکلونی را در گیاهک های باززایی شده افزایش و در صورت وجود آنیوپلوییدی در گیاهک های باززایی شده، این تنوعات را به اثبات رساند. در صورت موفقیت در اثبات تنوعات سوماکلونی، می توان این پروتوکول را به عنوان پروتوکولی موثر جهت ایجاد تنوعات سوماکلونی در نیشکر CP69-1062 معرفی نمود.

مواد و روش ها

قلمه های نیشکر واریته CP69-1062 از مزرعه تهیه و به آزمایشگاه انتقال یافتند. قطعات ۵ سانتی متری حاوی جوانه انتهایی، جداسازی شده، و برس کشی با مایع صابونی و قرار گرفتن در زیر آب جاری به مدت یک ساعت انجام شد. پس از پیش سترون سازی که شامل غوطه وری قلمه ها در الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه بود، برگه های اولیه در زیر هود جدا سازی شده و ۶ تیمار سترون سازی مورد استفاده قرار گرفت. هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در تمامی تیمارهای سترون سازی بصورت ثابت و کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه، ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه،۳ دقیقه، ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه، ۴ دقیقه، و ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه به ترتیب برای تیمارهای ۱ تا ۶ مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد جهت سترون سازی سطحی اکثر گونه های گیاهی به عنوان یکی از مواد سترون کننده موثر، توسط فارسی و ذوالعلی (۱۳۸۲) پیشنهاد شده است. در استفاده از کلرور جیوه ۰/۱ درصد نیز، احسان پور و امینی (۱۳۸۲) استفاده از این ماده را در غلظت های ۰/۱ درصد تا ۱ درصد به مدت ۲ تا ۱۰ دقیقه با توجه به نوع بافت گیاهی، جهت سترون سازی مفید می دانند. انتخاب مدت زمان پایین، به علت حساسیت بالای ریزنمونه ها (برگ های اولیه)، به ماده سمی کلرور جیوه است. تیمارهای سترون سازی در ۵ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. هر تکرار عبارت از یک پتری محتوی محیط کشتMS پایه (Murashing and Skoog, 1962) بود که در آن ۱۰ عدد ریزنمونه (برگ اولیه) قرار داشت. ۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

روز بعد، تعداد ریزنمونه های سترون شده در هر پتری شمارش و تجزیه واریانس داده ها، جهت بررسی اثرات تیمارهای سترون سازی انجام گرفت. ریز نمونه های سترون شده به محیط های کشت کالوس زایی انتقال یافتند. ۶ تیمار کالوس زایی در یک طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفت: ۱-2,4-D به میزان ۱ میلی گرم در لیتر، ۲- 2,4-D به میزان ۱/۵ میلی گرم در لیتر، ۳- 2,4-D به میزان ۲ میلی گرم در لیتر، ۴- 2,4-D به میزان ۲/۵ میلی گرم در لیتر، ۵- 2,4-D به میزان ۳ میلی گرم در لیتر، و ۶- 2,4-D به میزان ۳/۵ میلی گرم در لیتر، در محیط MS پایه، تیمارهای کالوس زایی را تشکیل دادند. کاربرد اکسین 2,4-D به تنهایی، جهت کالوس زایی برگ های اولیه، پیش تر توسط Karim و همکاران (۲۰۰۲) بر روی دو واریته نیشکر lsd-16 و lsd-28 و Niaz و Quraishi (۲۰۰۲) بر روی دو واریته نیشکرCPF-237 و SPF-213 گزارش شده است. دلیل انتخاب مقادیر استفاده شده در تیمارهای مذکور، پیشنهاد این اکسین توسط Barba و همکاران(۱۹۹۷)، در دامنه ۰/۵ تا ۵ میلی گرم در لیتر برای کالوس زایی واریته های مختلف نیشکراست. هر تکرار شامل یک پتری (محتوی تیمار کالوس زایی) بود که در آن ۱۰ عدد ریزنمونه قرار داشت. پس از انتقال ریزنمونه ها به محیط های کشت کالوس زایی، پتری ها در محدودهٔ دمایی ۲ ± ۲۵ درجهٔ سانتی گراد به تاریکی انتقال یافتند. سه هفته بعد، تعداد کالوس ها در هر پتری شمارش گردیده و داده ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. دستیابی به مقادیر کافی از کالوس، با واکشت کالوس ها به بهترین محیط های کشت کالوس زایی صورت گرفت. جهت باززایی کالوس ها، ۵ تیمار در یک طرح کاملا تصادفی در ۵ تکرار بررسی شد. محیط MS ساده به عنوان محیط پایه انتخاب گردید. این تیمارها به ترتیب عبارت بودند از: ۱ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA برای تیمار اول، ۱ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA برای تیمار دوم، ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA برای تیمار سوم، ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA برای تیمار چهارم، و ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیترNAA و ۰/۵ میلی گرم در لیتر IBA برای تیمار پنجم. دلیل استفاده از تیمارهای مذکور آن است که Islam و همکاران (۱۹۸۲) اثرات مثبت تلفیقBAP و IBA و نیز BAP و NAA را در تشکیل نوشاخه از کالوس های برگ های اولیه در گونه های مختلف نیشکر گزارش نموده اند. دلیل استفاده از دامنه غلظت های موجود آن است که استفاده از BAP به میزان ۱ میلی گرم در لیتر در تلفیق با NAA به میزان ۰/۵ میلی گرم در لیتر و نیز ترکیب BAP و IBA با همان غلظت، منجر به درصد بالای باززایی در کالوس های دو واریته نیشکر lsd16 و lsd28 توسط Karim و همکاران (۲۰۰۲) شده است. لذا با توجه به متفاوت بودن نوع واریته در این تحقیق، تصمیم گرفته شد تا دامنه ای نزدیک به تیمارهای پیشنهادی این محققین برای باززایی استفاده گردد. هر تکرار، شامل یک ردیف ۱۰ تایی از لوله های کشت (۱۰ سانتیمتر طول و ۲ سانتی متر قطر) بوده و در هر کدام یک کالوس قرار گرفت. کالوس های کشت شده به اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

روشنائی و ۸ ساعت تاریکی در محدودهٔ دمایی ۲ ± ۲۵ درجهٔ سانتی گراد انتقال یافتند. واکشت کالوس ها هر ۳ هفته یکبار روی محیط مشابه انجام گرفت. پس از ۵ هفته، اولین نوشاخه ها ظاهر شدند. دو هفته بعد، تعداد کالوس های باززایی شده برای هر تیمار شمارش، و داده های حاصل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نو شاخه‌های به طول تقریبی ۱۰ سانتی‌متر به محیط‌های کشت ریشه‌زایی انتقال یافتند. ۵ تیمار ریشه زایی در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار تهیه گردید. محیط MS به عنوان محیط پایه برای تیمارهای ریشه زایی در نظر گرفته شد. تیمارهای ریشه زایی به ترتیب ذیل بودند: **۱**- محیط MS به همراه ۲/۵ میلی گرم در لیتر NAA **۲** - محیط MS به همراه ۳ میلی گرم در لیتر NAA، **۳** - محیط MS به همراه ۳/۵ میلی گرم در لیتر NAA، **۴**- محیط MS به همراه ۴ میلی گرم در لیتر NAA و **۵**- محیط MS به همراه ۴/۵ میلی گرم در لیتر NAA. دلیل استفاده از اکسین NAA، پیشنهاد این اکسین توسط Nadar و Heinz (۱۹۷۷) و Lal و Sing (۱۹۹۲) بعنوان اکسین قابل ترجیح برای ریشه زایی اکثر گونه های نیشکراست. استفاده از غلظت های موجود نیز به علت گزارشات ارائه شده توسط Shenk و Hildebrandt (۱۹۷۲) مبنی بر نیاز نوشاخه های باززایی شده نیشکر به غلظت بالای اکسین برای ریشه زایی است. Baksha و همکاران (۲۰۰۳) نیز، از ۳ اکسین مختلف در غلظت های ۲/۵ تا ۵ میلی گرم در لیتر برای ریشه زایی دو واریته نیشکر، استفاده نمودند. هر تکرار، شامل یک ردیف ۱۰ تایی از لوله های کشت (۲ ×۱۰ سانتی متر) بود و در هر لوله کشت، یک نو شاخه قرار گرفت. محیط های کشت ریشه زایی به اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محدودهٔ دمایی ۲ ± ۲۵ درجهٔ سانتی گراد انتقال یافتند. پس از سه هفته، تعداد نوشاخه های ریشه دار (ریشه‌های توسعه یافته و دارای تارهای کشندهٔ کافی) برای هر تیمار شمارش و تجزیه واریانس داده ها، جهت بررسی اثرات تیمارها به انجام رسید. گیاهک‌های بدست آمده از لوله های کشت خارج و پس از شستشوی ریشه، در خاک گلدان که دارای نسبت‌های مساوی خاک، ورمیکولایت، فیلترکیک و ماسه بود قرار گرفتند. پس از طی مراحل مختلف سازگاری که شامل استفاده از سرپوش های پلاستیکی برای گلدان ها به مدت یک هفته، و نگهداری در گلخانه به مدت یک ماه بود، گیاهک های سازگار به مزرعه انتقال یافتند. پیش از انجام مطالعات سیتوژنتیکی بر روی گیاهک های باززایی شده، تعداد کروموزوم های مریستم نوک ریشه در گیاهانی که ریزنمونه های اولیه از آنها تهیه می گردید بررسی شد. اینکار با کاشت قلمه هایی که هر کدام حداقل دارای دو جوانه بود، در گلدان حاوی ماسه شسته شده صورت گرفت. پس از ۴۵ روز با خارج نمودن کامل گیاه از خاک که از ساعت ۷/۵ تا ۸ صبح انجام می گرفت و با شستشوی کامل ریشه ها، اقدام به برش و جمع آوری ۱ تا ۲ سانتی متر از انتهای ریشه ها گردید. ریشه های قطع شده بلافاصله در پیش تیمار آلفا برومونفتالن به مدت ۲/۵ ساعت قرار داده شدند. پس از شستشو با آب جاری، ریشه های پیش تیمار شده، با آب مقطر شسته شده و به مدت ۲۴ ساعت در محلول فیکساتیو اسید استیک گلاسیال- اتانول ۹۶٪ (۳:۱) قرار داده شدند. پس از شستشو با آب جاری به مدت ۲ ساعت و سپس شستشو با آب مقطر، آماده

www.SID.ir

Archive of SID

سازی نمونه ها برای مشاهدات میکروسکوپی، با هیدرولیز در اسید هیدروکلریک یک نرمال بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در ۶۰ درجـه سانتی گراد، و رنگ آمیزی آنها در محلول هماتوکسیلین ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انجام شد. ریشه های رنگ آمیزی شده به مدت یک ساعت در آنزیم سیتاز [به جهت ریز بودن کروموزوم ها و همپوشانی آنها که شمارش آنهـا را غیر ممکن می ساخت] و در یخچال قرار داده شدند. در نهایت هر نوک ریشه با استفاده از یـک قطـره اسـید اسـتیک ۴۵٪ اسکواش گردید. جهت شمارش تعداد کروموزوم های متافازی، حدود ۲۰ اسلاید تهیه شد و در صورتی کـه ۵ سـلول یـا بیشـتر تعداد کروموزوم های مشابه نشان می دادند، آن تعداد بعنوان تعداد کروموزوم سـلول هـای سـوماتیکی واریتـه CP69-1062 مورد قبول قرار می گرفت. عکس های میکروسکوپی با استفاده از یـک میکروسـکوپ Micros Austria مجهـز بـه دوربـین فیلمبرداری سرخود تهیه شد. جهت بررسی آنیوپلوییدی ناشی از تنوعات سوماکلونی نیز دو هفتـه پـس از انتقـال گیاهـک هـای باززایی شده به مزرعه، ۴۰ گیاهک به طور تصادفی انتخاب گردید و پس از شستشوی ریشه ها با آب و برش ۱ تا ۲ سـانتی متـر از نوک آنها، پروتوکول استفاده شده جهت آماده سازی ریشه ها برای شمارش کروموزومی در واریته CP69-1062، بـرای گیاهـک های باززایی شده نیز بکار رفت. برای هر گیاهک باززایی شده از کالوس حدود ۲۰ اسلاید تهیه شد و در صورتی که ۵ سلول یـا بیشتر تعداد کروموزوم های مشابه نشان می دادند، آن تعداد برای آن گیاهک مورد قبول بود.

نتایج و بحث

جدول ۱، نتایج تجزیه واریانس داده های تبدیل شده (تبدیل جذری) را برای تیمارهای مختلـف سـترون سـازی، کـالوس زایی، باززایی و ریشه زایی واریته CP69-1062 نشان می دهد. این نتایج برای تیمارهای سترون سازی، نشان دهنده اخـتلاف معنی دار این تیمارها در سطح ۰/۰۱ =α بود. نتایج آزمون دانکن (شکل ۱) نشان داد که تیمار ۴ شامل هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه همراه با کلرور جیوه ۰/۱ درصد به مدت۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه، با میانگین ۸/۶ ریزنمونه سترون، بهترین نتیجه را در سترون سازی برگ های اولیه داراست. نتایج حاصل از تجزیه واریانس تیمارهای مختلف کالوس زایی نیز نشـان داد که اختلاف بین این تیمارها، در سطح ۰/۰۱ =α معنی دار است. آزمون دانکن (شکل ۲) جهت تعیین بهترین مقـادیر اسـتفاده شده در این تلفیق هورمونی، نشان داد که تیمار ۴ شامل محیط MS پایه به همراه 2,4-D به میزان ۲/۵ میلی گرم در لیتر، با میانگین ۸ کالوس از ۱۰ ریزنمونه، بهترین نتیجه را در کالوس زایی برگ های اولیه بـه همـراه داشـته اسـت. تجزیـه واریـانس تیمارهای مختلف باززایی نشان دهنده اختلاف معنی دار تیمارها در سطح ۰/۰۱ =α بود. نتایج آزمون دانکن (شـکل۳) نشـان داد که تیمار۱ شامل محیط MS که با ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیترIBA تکمیل شده بود و نیز تیمـار ۴ شامل محیط MS که با ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA تکمیـل شـده بـود بـه عنـوان

www.SID.ir

Archive of SID

بهترین تیمارهای باززایی از کالوس‌های موجود می باشند. این تیمارها به ترتیب دارای میانگین ۸ و۷/۴ کالوس باززایی شده بودند. نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف ریشه‌زایی، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح ۰/۰۱ =α بود. نتایج آزمون دانکن (شکل ۴) تیمار ۲ را شامل محیط MS با ۳/۵ میلی گرم در لیتر، NAA با میانگین ۹ نوشاخه ریشه‌دار بعنوان بهترین تیمار ریشه‌زایی معرفی نمود. ۷۱ درصد گیاهک های انتقال یافته به خاک، مراحل مختلف سازگاری را با موفقیت پشت سر گذاشتند. نتایج حاصل از مطالعات سیتوژنتیکی بر روی نوک ریشه تعدادی از گیاهان انتخابی از واریته CP69-1062 که در مزرعه بطریق سنتی کشت و زرع می شوند، تعداد کروموزوم های ۱۰۸ تا ۱۱۳ را نشان داد در حالی که نتایج بدست آمده بر روی ۴۰ گیاهک انتخابی از بین گیاهک های باززایی شده، وجود آنیوپلوییدی را خارج از دامنه والدینی در۱۳ گیاهک نشان داد که معادل ۳۲/۵٪ گیاهک های باززایی شده بود. آنیوپلوییدهای تشکیل شده سطوح مختلفی را شامل ۲n=۱۰۳، ۲n=۱۰۵، ۲n=۱۱۴، ۲n=۱۱۷، ۲n=۱۱۸، ۲n=۱۲۰ و۲n=۱۲۱ نشان دادند. اشکال الف تا ح مراحل کالوس زایی، باززایی، ریشه زایی، انتقال گیاهک ها به خاک در مرحله سازگاری تا سازگاری کامل و نیز آنیوپلوییدی (۲n=۱۰۳) در سلول های مریستمی نوک ریشه در یک گیاه باززایی شده را نشان می دهند.

انتخاب برگ های اولیه، بعنوان ریزنمونه جهت تولید کالوس، به دلیل جوانی سلول ها و نهایتاً پتانسیل بالای آنها در تمایزیابی است (فارسی و ذوالعلی، ۱۳۸۲). دستیابی به درصد قابل توجهی ریزنمونه سترون شده (۸۶ درصد) در استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به همراه کلرور جیوه به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه، بیانگر تاثیر بالای تلفیق این دو محلول در سترون سازی ریزنمونه هاست. لکن، افزایش مدت زمان استفاده از کلرور مرکوریک به بالاتر از ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه(تیمار های ۵ و ۶)، علیرغم سترون سازی تمام ریزنمونه ها، منجر به مرگ و میر قابل توجهی (۴۴ درصد برای تیمار ۵ و ۶۶ درصد برای تیمار ۶) از ریزنمونه ها گردید که نشانگر حساسیت بالای برگ های اولیه به ماده سمی کلرور جیوه است. در کالوس زایی ریزنمونه ها، نرم و آبدار بودن کالوس ها ویژگی بسیار محسوسی بود که در تمام تیمارهای کالوس زایی مشاهده گردید. نکته دیگر اینکه، پس از واکشت های دوم، علیرغم انتقال به اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، پیشرفتی در رشد کالوس ها، در مقایسه با کالوس های نگهداری شده در تاریکی مشاهده نگردید و لذا پس از هر واکشت مجدداً نگهداری در تاریکی انجام شد. فارسی و ذولعلی (۱۳۸۲) به این مساله اشاره دارند که اثر نور در شکل گیری کالوس بستگی به گونه گیاه دارد. همچنین آنها بافت های کالوس حاصل از گونه های مختلف گیاهی را از نظر ساختار و عادت رشد متفاوت می دانند. در ارتباط با باززایی کالوس های حاصله، هر چند محیط MS ساده که با ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم در لیترIBA تکمیل شده بود، پیشتر توسط Karim و همکاران (۲۰۰۲) بعنوان محیط باززایی مناسب، پیشنهاد شده است، لکن نتایج این تحقیق استفاده از محیط MS ساده را که با ۲ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA

www.SID.ir

Archive of SID

تکمیل شده بود را نیز به عنوان محیط مناسب دیگر برای باززایی پیشنهاد می کند. اگر چه نتایج آزمون دانکن، هر دو تیمار (۱ و ۴) را به عنوان تیمارهای مناسب باززایی برای واریته CP69-1062 معرفی می کند، لکن باززایی کالوس ها در تیمار چهارم در مدت زمان کوتاه تری (۱۵ روز زودتر) اتفاق افتاد. این مساله نشان داد که تلفیق مناسبی از تنظیم کننده های رشد گیاهی در کنار محیط MS ساده می تواند فرایند باززایی را از کالوس های واریته CP69-1062 تسریع بخشد. در ارتباط با دستیابی به بهترین محیط کشت ریشه زایی، (محیط MS با ۳/۵ میلی گرم در لیترNAA)، نتایج این تحقیق گزارشات شنک و هیلد برانت را مبنی بر استفاده از غلظت های بالای اکسین برای ریشه زایی نیشکر تایید می کند. از طرفی علی رغم مطابقت این نتایج با نتایج Baksha و همکاران (۲۰۰۳) در نوع اکسین استفاده شده (NAA) در ریشه زایی دو واریتهٔ نیشکر، لکن از لحاظ میزان بکار رفته همسویی وجود ندارد. وی میزان ۵ میلی گرم در لیتر را بعنوان غلظت مناسب برای ریشه زایی دو واریته نیشکر مفید می داند. در حالی که نتایج این تحقیق میزان ۳/۵ میلی گرم در لیتر را پیشنهاد می کند. از تفاوت های موجود، چنین نتیجه می‌شود که تیمارهای مجزایی برای هر گونه یا واریته، جهت دستیابی به آغازش سریع شاخه و القای ریشه نیاز است (Cheema and Hussain, 2004). مطالعات سیتوژنتیکی انجام گرفته بر روی مریستم نوک ریشه، در واریته CP69-1062، تعداد کروموزوم های متافازی را در دامنه ۱۰۸ تا ۱۱۳ معرفی نمود که که این تعداد در تطابق کامل با نتایج داوودی و همکاران (۱۳۸۶) در ارتباط با مشخص نمودن تعداد کروموزوم برای سلول های متافازی واریته CP69-1062 می باشد. همچنین تحقیقاتی که پیشتر توسط Heinz و همکاران (۱۹۶۹) جهت تعیین تعداد کروموزوم های پنج گونه هیبرید ساکاروم و کشت های سلولی آنها انجام گرفته بود نشان داد که تعداد کروموزوم در ۴ کلون والدی ثابت (۲n= ۱۲۲،۱۱۴،۱۱۲،۱۱۴)، اما در یکی از آنها متغیر است (۲n=۱۰۸ -۱۲۸). مشکل بودن تفسیر تنوع کروموزومی در یک رقم نیشکر، توسط Price (۱۹۶۳) با بررسی چهار رقم نیشکر از جزایر هاوایی و داوودی و همکاران (۱۳۸۶) با بررسی ۵ رقم تجاری نیشکر ایران گزارش شده است. نکته قابل توجه اینکه، به علت تکثیر نیشکر بطریق غیرجنسی و نبود شرایط مناسب گلدهی در ایران و تشکیل بذر، لذا می توان به پایداری تنوعات پیش آمده امیدوار بود. Kaeppler و همکاران (۲۰۰۰) نیز گزارش دادند که تنوعات آنیوپلوییدی حاصل شده از تنوعات سوماکلونی ممکن است در طی تقسیمات میوزی ناپایدار باشند لکن از طریق تقسیمات میتوزی پایدارند. با توجه به اینکه در کالوس زایی این واریته نیشکر از اکسین 2,4-D استفاده گردیده است و حضور این اکسین پیشتر توسط محققین بعنوان افزایش دهنده متیلاسیون DNA شناخته شده است(Kaeppler *et al.,* 2000) لذا پیشنهاد می گردد که در مطالعات صورت گرفته توسط محققین دیگر، در جهت ایجاد تنوعات سوماکلونی که در پروسه کالوس زایی از هورمون 2,4-D استفاده می گردد، جهت اثبات موتاسیون های نقطه ای حاصل از متیلاسیون DNA، از مارکرهای مولکولی با دقت بالا نظیر AFLP استفاده گردد (Taji *et al.,* 2001).

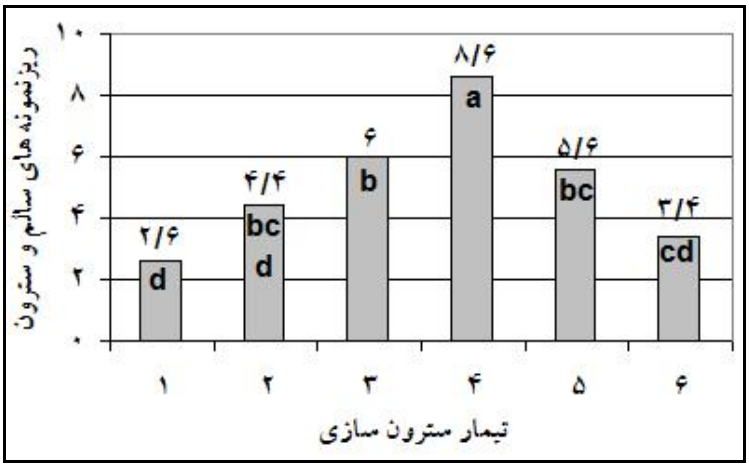
www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱: نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف سترون سازی، کالوس زایی، باززایی و ریشه زایی واریته CP69-1062

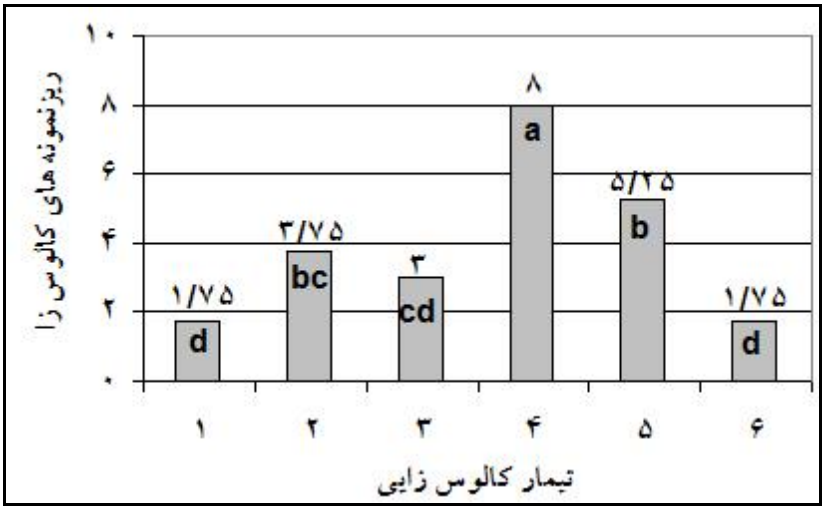
تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
سترون سازی	۵	۱/۱۴	۱۵/۳۹**
کالوس زایی	۵	۱/۴۴	۱۲/۰۸**
شاخه زایی	۴	**۲/۹۳	۲۲
ریشه زایی	۴	**۱/۴۱	۲۲/۰۹

** =معنی دار در سطح ۰/۱



شکل۱: تیمارهای سترون سازی، میانگین تعداد ریزنمونه های سالم و سترون برای هر تیمار، و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۱) در نیشکر واریته CP69-1062

تیمار ۴: هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرور جیوه ۰/۱ درصد (۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه)

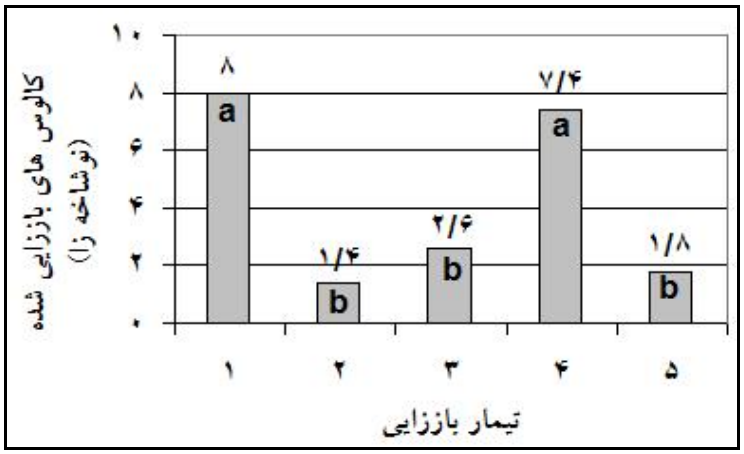


شکل۲: تیمارهای کالوس زایی، میانگین تعداد ریزنمونه های کالوس زا برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن(α=۰/۰۱) در نیشکر واریته

CP69-1062 تیمار۴: محیط MS +۲/۵ =2,4-D

www.SID.ir

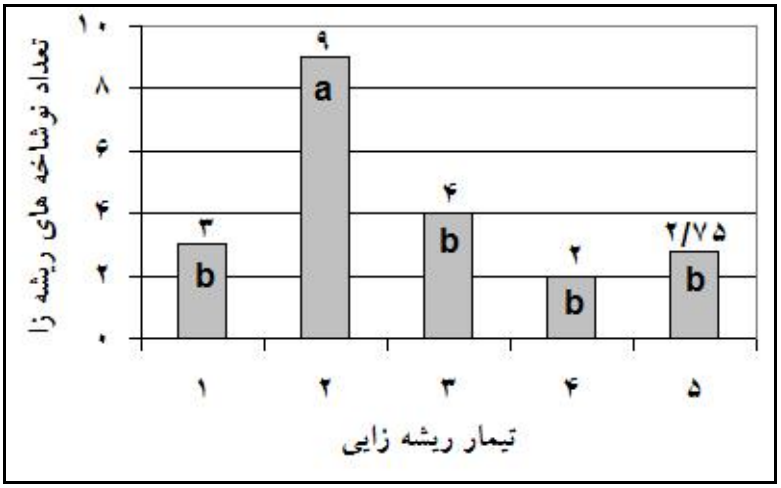
Archive of SID



شکل ۳: تیمارهای باززایی، میانگین تعداد کالوس های باززایی شده (نوشاخه زا) برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۱) در نیشکر واریته CP69-1062

تیمار ۱: محیط MS + BAP=۱ + IBA=۰/۵

تیمار۴: محیط MS + BAP=۲ + NAA=۰/۵



شکل۴: تیمارهای ریشه زایی، میانگین تعداد نوشاخه های ریشه زا برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۱) در نیشکر واریته CP69-1062

تیمار ۲: محیط MS + NAA= ۳/۵

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

- **احسان پور، ا. و امینی، ف.، ۱۳۸۲.** کشت سلول و بافت گیاهی، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، چاپ دوم، ۱۸۲ ص.

- **فارسی، م. و ذولعلی، ج.، ۱۳۸۲.** اصول بیوتکنولوژی گیاهی، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، شماره ۳۹۳، چاپ اول، ۴۹۵ ص.

- **داوودی، د.، احمدیان تهرانی، پ.، امیدی، ا.، موسی آغایف، ی. و بی همتا، م.، ۱۳۸۶.** بررسی کاریولوژیک پنج رقم هیبرید نیشکر، فصلنامه نهال و بذر، سال ۲۳، شماره ۴، صفحات ۶۲۴-۶۱۵.

- **Ahloowalia, B.S., 1986.** Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement. In: J. Semal (Ed.) Somaclonal Variation and Crop Improvement, Martinus Nijhoff, Boston, pp. 14–27.

- **Baksha, R., Alam, R., Karim, M.Z., Mannan, Sk.A., Podder B.P. and Rahman, A.B., 2003.** Effect of Auxin, Sucrose and pH Level on *in vitro* Rooting of Callus Induced Micro Shoots of Sugarcane (*Saccharum officinarum*), J. Biol. Sci. 3 (10): 915-920.

- **Barba, R.C., Zamora, A.B., Mallion, A.K. and Linga, C.K., 1977.** Sugarcane tissue culture research. Proc. Int. Sugar-cane. Technol., 16: 1843-1864.

- **Bremer, G., 1961.** Problems in the breeding and cytology of sugar cane. II. Sugar cane breeding from a cytological view-point. Euphytica 10: 121-133.

- **Burner, D.M. and Grisham, M.P., 1995.** Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane (*Succharum* spp.) as affected by propagation procedure. Crop Sci. 35: 875-880.

- **Cheema, K.L. and Hussain, M., 2004.** Micropropagation of Sugarcane through apical bud and axillary bud. Int. J. Agri. Biol. 6: 257-259.

-**Damasco, O.P., Graham, G.C., Henry, R.J., Adkins, S.W., Smith, M.K. and Godwin I.D., 1996.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (Musa spp. AAA) bananas. Plant Cell Rep. 16: 118-123.

- **Daniels, J. and Roach, B.T., 1987.** Taxonomy and evolution. pp. 7-84. In: Heinz, D.J. (ed.) Sugarcane Improvement through Breeding. Vol. II Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

- **Duncan, R.R., 1997.** Tissue culture-induced variation and crop improvement. Adv. Agron. 58: 201–240.

- **Fukui, K., 1983.** Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. Theor. Appl. Genet 65: 225–230.

www.SID.ir

Archive of SID

- **Heinz, D.J., Mee, G.W.P. and Nickell, L.G., 1969.** Chromosome numbers of some Saccharum species hybrids and their cell suspension cultures, American Journal of Botany, 56: 450-456.

- **Islam, A.S., Begum, H.A. and Haque, M.M., 1982.** Studies on regeneration *of Saccharum officinarum* for disease resistant varieties. Proc. Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, 5:709-710.

- **Jehan Khan, S., Ayyaz Khan, M., Ahmad, H.K., Din Khan R. and Zafar, Y., 2004.** Somaclonal Variation in Sugarcane Through Tissue Culture and Subsequent Screening for Salt Tolerance. Asian Journal of Plant Sciences 3 (3): 330-334,

-**Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. and Rhee, Y., 2000.** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43**:** 179–188.

- **Karim, M.Z., Amin, M.N., Hossain, M.A., Islam, S., Hossin, F. and Alam, R., 2002.** Micropropagation of two Sugarcane (*Saccharum officinarum*) varieties from callus culture. J. Bio. Sci. 2(10): 682-685.

- **Kaeppler, S.M. and Phillips, R.L., 1993.** DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. In Vitro Cell Dev. Biol. 29: 125–130.

- **Krishnamurthi, M., 1986.** Sugarcane improvement through tissue culture process, Am. Soc. Sugarcane Technol. 29: 23-28.

- **Lal, N. and Sing, H.N., 1994.** Rapid clonal multiplication of sugarcane through tissue culture. Plant Tiss. Cult. 4: 1-7.

- **Lalitha, R. and Premachandran, M.N., 2007.** Meiotic abnormalities in intergeneric hybrids between *Saccharum spontaneum* and *Erianthus arundinaceus* (Gramineae). Cytologia 72(3): 337–343.

- **Larkin, P.J., 1987.** Somaclonal variation: history, method, and meaning. Iowa State J. 61: 393–434.

- **Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R., 1981.** Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement.

Theor. Appl. Genet. 60: 197–214.

- **Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R., 1983.** Somaclonal variation and crop improvement. In: T. Kosuge *et al.* (Eds.) Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective, Plenum, New York, pp. 289–314.

www.SID.ir

Archive of SID

- **Liu, M.C. and Chen, W.H., 1984.** Tissue and cell culture, an aid to sugarcane breeding-III.High sucrose and vigorously growing cell clone 71-489. Tiawan Sugar. 31: 77.
- **Murashig, T. and Skoog, F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol.P. L. 15: 473-497.
- **Nadar, H.M. and Heinz, D.J., 1977.** Root and shoot development from sugarcane callus tissue. Crop Sci., 17: 814-816.
- **Nair, M.K., 1975.** Cytogenetics of *Saccharum officinarum* L. and *S. spontaneum* L. IV. Chromosome number and meiosis in *S. officinarum* × *S. spontaneum* hybrids. Cariologia 28:1-14.
- **Niaz, F. and Quraishi, A., 2002.** Effect of growth regulators on the regeneration potential of two sugarcane cultivars SPF-213 and CPF-237. Pakistan journal of Biological Sciences. 5(10): 1081-1083.
- **Orton, T.J., 1984.** Genetic variation in somatic tissues: method or madness? Adv. Plant Path. 2: 153–189.
- **Peschke, V.M. and Phillips, R.L., 1992.** Genetic implications of somaclonal variation in plants. Adv. Genet. 30: 41–75.
- **Price, S., 1963.** Cytogenetics of modern sugarcane. Economic Botany, 17:97-106.
-**Price, S., 1960.** Cytological studies in Saccharum and allied genera. VI. Chromosome numbers in *S. officinarum* and other noble sugarcanes. Hawaii Plant Record 56:183-194.
- **Shenk, R.U. and Hildebrandt, A.C., 1972.** Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50:199-204.
- **Siddiqui, S.H., Khatri, A., Khan, A.I., Javed, M.A., Dhar, N.A. and Nizamani, G.S., 1994.** In vitro culture a source of genetic variability and an aid to sugarcane improvement. Pak. J. Agric. Res. 15: 127-133.
- **Silvarolla, M.B., 1992.** Plant genomic alterations due to tissue culture. J. Brazil. Assoc. Adv. Sci. 44: 329-33.
- **Sun, Z.X. and Zheng, K.L., 1990.** Somaclonal variation in rice. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 3, Springer-Verlag, Berlin, pp. 288–325.
- **Taji, A., Kumar, P. and Lakshmanan, P., 2001.** In Vitro Plant Breeding, Haworth press. 168p.

www.SID.ir

Archive of SID

- **Veilleux, R.E. and Johnson, A.T., 1998.** Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. Plant Breed. Rev. 16: 229–268.
- **Zehr, B.E., Williams, M.E. and Duncan, R.D., 1987.** Somaclonal variation among the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. Can. J. Bot. 61: 491–499.

www.SID.ir