Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

باززایی دو رقم تجاری نیشکر CP48-103 و CP69-1062 از ریزنمونه‌های برگ انتهایی

صادق کلانترهرمزی[1]، محمدرضا سیاهپوش*[2]، حمید رجبی معماری[2]، حسن حمدی[3]، محمود شمیلی[3]، جمیل حمودی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز.

[2]عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز.

[3]عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۲۰

چکیده

نیشکر یکی از مهم‌ترین گیاهان صنعتی کشور است. با توجه به عدم گلدهی این گیاه در شرایط مزرعه‌ای در مناطق نیشکرخیز ایران، مهندسی ژنتیک و استفاده از روش‌های انتقال ژن از جمله راهکارهای مهم جهت بهبود صفات زراعی این گیاه است. استفاده از این تکنیک‌ها در اصلاح نیشکر نیازمند بهینه‌سازی باززایی این گیاه از بافتهای مختلف گیاهی از جمله برگ است. در این تحقیق تلاش شد تا کلیه مراحل کشت بافت دو رقم تجاری نیشکر CP48-10 و CP69-1062 از برگ‌های پیچیده انتهایی ساقه بهینه‌سازی شود. برای تهیه نمونه‌های مناسب کشت، دو روش برش مورد بررسی قرار گرفت که روش برش استوانه از وسط، در مورد برگ‌های پیچیده انتهایی نسبت به تهیه رینگ از نتایج بهتری برخوردار بود. استفاده از محیط کشت MS جامد با ۳ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D بهترین نتایج را برای تولید کالوس درپی داشت. به منظور تولید شاخساره از کالوس‌ها، ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بهترین پاسخ‌دهی را داشت. گیاهچه‌های تولید شده، در محیط MS حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و همین‌طور تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۳ گرم در لیتر زغال فعال، بهترین شرایط برای ریشه‌دهی را داشتند. در تیمارهایی که از زغال فعال استفاده شده بود، گیاهچه‌های حاصل از نظر صفات اندازه‌گیری شده شامل: زمان ریشه زایی، طول ریشه و تعداد گیاهان به ریشه رفته نتایج بهتری را نسبت به عدم استفاده از آن نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: *باززایی، سترون‌سازی، کالوس، کشت بافت، کینتین، نیشکر.*

* نویسنده مسئول: محمدرضا سیاهپوش تلفن: ۰۶۱۳۳۳۳۶۴۰۵۶ Email: siahpoosh@scu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه نیشکر (*Saccharum spp.*) در بیش از ۱۲۰ کشور جهان کشت می‌شود و نقش مهمی را در اقتصاد کشاورزی ایفا می‌کند. نیشکر نزدیک به ۷۰ درصد شکر جهان را تأمین می‌کند (Gallo-Meagher *et al.*, 2000). به منظور انتقال ژن و تولید گیاهان زراعی با ویژگی‌های جدید ژنتیکی، به تولید این گیاهان در شرایط درون شیشه ای نیاز است. تولید گیاهان کامل به تعداد زیادتر و در مدت زمان کوتاه‌تر نسبت به شرایط طبیعی، از مزایای عمده کشت بافت گیاهی و لازمه فناوری مهندسی ژنتیک می‌باشد (Cheng *et al.*, 2001). این موضوع در بهبود ژنتیکی گیاه نیشکر که به روش غیرجنسی تکثیر می‌یابد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Liu and Chen, 1984; Krishnamurthi, 1986). در کشت بافت یک ریزنمونه در یک محیط غذایی مصنوعی و با غلظت‌ها و ترکیبات مناسب هورمونی در شرایط استریل کشت می گردد. موفقیت در کشت بافت گیاهی وابسته به عوامل متعددی است که از جمله آنها می‌توان به ژنوتیپ گیاه، نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و شرایط محیطی اشاره نمود (Ono *et al.*, 1994). تحقیقات مختلفی با هدف تکثیر ژنوتیپ‌های مختلف نیشکر از جوانه‌های جانبی و یا باززایی از بافت کالوس مریستم انتهایی اجرا شده‌اند (Sarvari and Hoseinzade, 2000؛ Daneshvar, 2007؛ Ramin, 2003؛ Karim *et al*, 2002). در پژوهشی نشان داده شد که معمولاً قطعات کوچک بافت پینه (با وزن حدود 200 میلی‌گرم) جهت انتقال به محیط باززایی مناسب‌تر هستند، زیرا فقط سلول‌های سطحی و زیرین بافت پینه که در تماس با محلول غذایی است باززایی می‌شوند (Khalil, 2002). در مطالعه ای دیگر، تیمارهای مطلوب کالوس‌زایی و باززایی در واریته نیشکر Nayan معرفی شدند (Behera and Sahoo, 2009). بالاترین درصد کالوس تولیدی در محیط MS حاوی ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بدست آمد. بهترین پاسخ به باززایی با ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA مشاهده شد.

محققین نشان دادند که افزودن ۳ میلی‌گرم در لیتر2,4-D به محیط کشت MS بهترین نتیجه را در تولید کالوس رقم تجاری CP73-21 می‌تواند داشته باشد (Ali *et al.*, 2008). پژوهشگرانی نیز موفق به تولید کالوس از هشت واریته مختلف نیشکر در محیط حاوی ۳ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D گردیده و سپس اقدام به باززایی کالوس‌های حاصله بر روی محیط MS تغییر یافته به همراه ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر هیدورلیزات کازئین نمودند (Gandonou *et al.*, 2005). در تحقیقی پاسخ به کشت بافت در دو رقم Co 86032 و CoJ 64 مطالعه شد. از بین نمونه‌های مناسب تولید کالوس، بهترین نتایج از محیط کشتی شامل: ۳ میلی‌گرم در لیتر2,4-D، ۱۰٪ آب نارگیل فیلترشده، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول و

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰ گرم در لیتر ساکارز بدست آمد (Arvinth *et al.*, 2010). پژوهش‌های انجام شده به منظور بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه نیشکر در ایران اندک بوده و آزمایش‌های انجام گرفته در کشورهای دیگر بیشتر بر روی ارقامی است که اکثراً در ایران کشت نمی‌شوند (Ramin, 2005). هدف از این پژوهش بهینه‌سازی مراحل کشت بافت از برگ‌های پیچیده انتهایی ساقه و بدست آوردن ترکیبات هورمونی و غذایی مناسب برای دو رقم تجاری CP48-103 و CP69-1062 است که در سطح وسیع در ایران کشت می‌شوند.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

در این پژوهش از قلمه‌های دو رقم تجاری CP48-103 و CP69-1062 نیشکر استفاده شد. قلمه‌ها از مزارع حاوی گیاهانی با طول عمر ٦ تا ٨ ماه برش داده شده و به آزمایشگاه انتقال یافتند. برگ‌های اضافی چیده شده و بخشی از سر نی که حاوی مریستم انتهایی و برگ‌های اطراف آن بود مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- بهینه‌سازی شستشو و سترون‌سازی نمونه‌ها و میزان آنتی‌بیوتیک

به منظور بهینه‌سازی روش شستشو و سترون‌سازی، سر نی حاوی مریستم انتهایی به همراه برگ‌های پیچیده انتهایی[1] با روش‌های مختلف شستشو و با مواد سترون‌ساز تیمار شدند و در محیط‌های کشت حاوی آنتی‌بیوتیک و بدون آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. این بخش در طی یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار و با ٤ فاکتور به شرحی که در ادامه آمده است به اجرا در آمد: **C**) فاکتور ژنوتیپ شامل دو رقم ۱-CP48-103 و ۲- CP69-1062، **W**) فاکتور شستشو با آب شامل دو روش ۱- شستشوی اولیه و سپس قراردادن زیر آب روان به مدت دو ساعت ۲- شستشوی اولیه و سپس سه بار شستشو هربار دو تا سه دقیقه، **S**) فاکتور مواد سترون‌ساز شامل سه ترکیب ۱- کلرور جیوه با غلظت ۷۰۰ میلی‌گرم در لیتر، به مدت ۱۲ دقیقه ۲- هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و سپس الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه ۳- هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه، کلرورجیوه به مدت ۱۲ دقیقه و سپس الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و **A**) فاکتور آنتی‌بیوتیک شامل صفر و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم در محیط کشت بودند.

لازم به ذکر است که بعد از هر مرحله اعمال تیمار، نمونه‌ها سه بار با آب دوبار تقطیر استریل شستشو شدند و در تمام تیمارها آخرین مرحله شستشو در زیر هود انجام شد. سپس به منظور اطمینان از حذف اثرات مواد مورد استفاده در شستشو دو لایه برگی بطور مجزا جدا و شستشو شد و به محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۳۰٪ ساکارز منتقل شدند. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت کالوس‌زایی، پتری‌ها در محدوده دمایی ۱ ± ۲٦

1- Roll leaf

www.SID.ir

Archive of SID

درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

بهینه‌سازی نوع برش ریزنمونه‌ها

به منظور بررسی تأثیر نوع برش نمونه‌ها بر میزان کالوس‌زایی، تحقیقی در طی آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۲ فاکتور و ۸ تکرار (پتری) طراحی و اجرا گردید. فاکتورها شامل فاکتور ژنوتیپ با دو سطح و فاکتور برش شامل: ۱- برش رینگی به ضخامت ۳ تا ۵ میلی‌متر ۲- برش نیم استوانه‌ای به ضخامت ۲ تا ۱/۵ سانتی‌متر بود. در هر پتری ۱۰ عدد نمونه قرار گرفت و صفات درصد تولید کالوس، تعداد روز تا تولید کالوس و تعداد نمونه‌های نکروزه شده شمارش و اندازه‌گیری شدند.

بهینه‌سازی ترکیب هورمونی برای تولید کالوس

۲-٤-۱- غلظت بهینه 2,4-D

پنج غلظت متفاوت 2,4-D شامل ۱، ۲، ۲/۵، ۳ و ۳/۵ میلی‌گرم درلیتر محیط کشت در طی آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی بر روی ۲ ژنوتیپ نیشکر با ۸ تکرار (پتری) مورد بررسی قرار گرفتند. برای محیط کشت پایه، محیط کشتی که حاوی محیط MS، ۳۰ گرم ساکاروز، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین بود که جهت جامدسازی از ۰/۷ درصد آگار استفاده شد (Sadat *et al.*, 2008). هر تکرار شامل ۱۰ نمونه از برگ‌های پیچیده انتهایی بود که پس از سترون‌سازی، برش و قرارگیری روی محیط، در دمای ۱ ± ۲٦ درجه سانتی‌گراد و درشرایط تاریکی قرار داده شدند. صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش شامل تعداد روز تا ظهور کالوس و درصد تولید کالوس بود.

غلظت بهینه NAA+IBA

در آزمایشی دیگر هشت غلظت ۱، ۲، ۳، ٤، ۵، ٦، ۷ و ۸ میلی‌گرم در لیتر از ترکیب هورمون‌های NAA و IBA به نسبت ۱:۱ استفاده شد. محیط کشت پایه در این آزمایش نیز محیط کشتی حاوی محیط MS، ۳۰ گرم ساکاروز، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر کازئین بود که جهت جامد سازی از ۰/۷ درصد آگار استفاده شد (Sadat *et al.*, 2008). این آزمایش نیز بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ٦ تکرار (پتری) اجرا گردید. به‌طوری که اثر غلظت‌های مختلف هورمونی بر روی ۲ ژنوتیپ CP48-103 و CP69-1062 مورد بررسی قرار گرفت. در هر پتری از ۱۰ ریزنمونه استفاده شد و صفات تعداد روز تا ظهور کالوس، تعداد کالوس‌ها و همچنین درصد نکروزه شدن اندازه‌گیری شد.

بهینه‌سازی محیط القاء ساقه از بافت کالوس

جهت باززایی گیاهچه از کالوس‌های بدست آمده، محیط MS با ۷ گرم آگار به همراه ۳۰ گرم ساکاروز با یکی از ٦ تیمار متفاوت هورمونی ارائه شده در جدول ۱ استفاده شد. این آزمایش نیز بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ٤ تکرار (گلدان شیشه‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

کوچک) اجرا گردید. به‌طوری‌که اثر تیمارهای مختلف هورمونی بر روی ۲ ژنوتیپ نیشکر بررسی شد. به منظور انجام این آزمایش، نمونه کالوس‌های جنین‌زایی که ۲۵ روز از عمر آنها گذشته بود به محیط‌های مورد آزمایش منتقل شده و در شرایط دمایی ۱ ± ۲٦ درجه سانتی‌گراد و در مقابل نور قرار گرفتند. در طی انجام این آزمایش صفت تعداد روز تا ظهورساقه یادداشت برداری شد و پس از ۷ هفته تعداد ساقه‌های باززایی شده شمارش شدند.

بهینه‌سازی محیط کشت برای تولید ریشه

گیاهچه‌های حاصل از آزمایش قبل که دارای طولی حدود ۳ تا ۵ سانتی‌متر بودند برای ریشه‌زایی به محیط کشت MS حاوی یکی از سطوح تیماری جدول ۲ منتقل شدند. این بررسی طی آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ٤ تکرار (گلدان شیشه‌ای کوچک) اجرا شد و اثر ترکیبات مختلف محیط کشت بر ریشه‌دهی ۲ رقم CP48-103 و CP69-1062 مطالعه شد. هر تکرار شامل ٤ گیاهچه بود. بعد از گذشت ۵ هفته تعداد گیاهان به ریشه رفته و طول ریشه‌ها اندازه‌گیری شد. در طی این مدت نیز تعداد روز تا ظهور ریشه‌چه در هر گیاه یادداشت گردید.

جدول ۱- ترکیب محیط‌های کشت تولید گیاهچه از کالوس‌های دو رقم تجاری نیشکر.

Table 1- Media Composition of seedling production from callus in two commercial sugarcane cultivars.

تیمار Treatment	ترکیب محیط کشت Media culture composition	منبع Reference
1	MS + 30 g شکر + 7 g آگار +1 mg/l IBA	Ramin, 2003
2	MS + 30 g شکر + 7 g آگار +1 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA	Sadat *et al*, 2008; Ather *et al*, 2009
3	MS + 30 g شکر + 7 g آگار +1 mg/l BAP +0.5 mg/l NAA	Ramanand *et al*, 2006
4	MS + 30 g شکر + 7 g آگار +1 mg/l BAP + 2 mg/l Kinetin	Ramin, 2003
5	MS + 30 g شکر + 7 g آگار +2 mg/l BAP	Hamudi *et al*, 2005; Biradar *et al*, 2009
6	MS + 30 g شکر + 7 g آگار +2 mg/l BAP + 2 mg/l Kinetin	تحقیق حاضر present study

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- ترکیب محیط‌های کشت برای تولید ریشه از گیاهچه‌های باززایی شده دو رقم تجاری نیشکر.

Table 2 - Media Composition for root production in regenerated seedlings of two commercial sugarcane cultivars.

تیمار Treatment	ترکیب محیط کشت Media culture composition	منبع Reference
1	MS + 30 g شکر + 6.5 g آگار + 2 mg/l IBA+3 g/l زغال فعال	Hamudi *et al*, 2005
2	MS + 30 g شکر + 6.5 g آگار + 5 mg/l IBA + 1 mg/l Kinetin + 3g/l زغال فعال	Ramin, 2003
3	MS + 30 g شکر + 6.5 g آگار + 2 mg/l NAA + 3g/l زغال فعال	Ramin, 2003
4	MS + 30 g شکر + 6.5 g آگار + 3 mg/l NAA	Behera and Saho, 2009
5	MS + 30 g شکر + 6.5 g آگار +3 mg/l NAA + 3g/l زغال فعال	تحقیق حاضر present study
6	MS + 30 g شکر + 6.5 g آگار + 3 mg/l GA3	Athers *et al*, 2009
7	MS + 30 g شکر + 6.5 g آگار +3 mg/l GA3 + 3 g/l زغال فعال	تحقیق حاضر present study

آنالیزهای آماری

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام شد. پیش از انجام آنالیز واریانس دو فرض اصلی تجزیه واریانس شامل نرمال بودن توزیع داده‌ها با کمک آزمون‌های شاپیرو-ویلک و کلموگروف-سمیرنوف و یکنواخت بودن واریانس خطاهای آزمایشی با کمک آزمون بارتلت بررسی شد. با توجه به شمارشی بودن داده‌های بدست آمده، بر روی تمامی داده‌ها تبدیل جذری انجام شد.

نتایج و بحث

شستشوی نمونه‌ها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) حاکی از تفاوت معنی‌دار بین ارقام، روش‌های سترون‌سازی و سطوح آنتی‌بیوتیک بود. تفاوت معنی‌داری بین روش‌های شستشو حاصل نشد. نتایج مقایسات میانگین بین توده‌ها نشان داد که رقم CP48 با میانگین ۵۹٪ دارای درصد آلودگی بالاتری نسبت به رقم CP96، با میانگین ۲۸٪ درصد بود. در روش‌های ضدعفونی، اولین روش دارای بالاترین میزان آلودگی (۵۸٪) بود. روش دوم و سوم ضدعفونی، به ترتیب با میانگین‌های ۳۸٪ و ۳۵/۸٪، فاقد تفاوت معنی‌دار بودند. این نتایج با داده‌های تحقیقی انجام شده بر روی رقم CP73-21 نیشکر مطابقت داشت (Sadat *et al*., 2008). نتایج استفاده یا عدم استفاده آنتی‌بیوتیک، تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ را نشان داد. تیمارهای حاوی آنتی‌بیوتیک با میانگین ۲۲/۳٪ آلودگی در مقایسه با میانگین ۶۵/۸٪ درصدی عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک، در گروه‌های جداگانه‌ای دسته‌بندی شدند (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل نشان داد که روش شستشوی نمونه‌ها چندان وابسته به ژنوتیپ و محل کشت ژنوتیپ مورد مطالعه نیست. در شستشوی نمونه‌ها، عدم وجود تفاوت معنی‌دار به این معنی است که می‌توان از تیمار دو ساعت زمان برای شستشو صرف نظر کرد و پس از ۳ بار شستشوی عادی نمونه‌ها، وارد مراحل بعدی سترون‌سازی شد. از روش‌های سترون‌سازی، بین روش دوم و سوم تفاوتی دیده نشد. ولی با توجه به خطرات سمیت کلرورجیوه برای انسان و مشاهده نمونه‌های نکروزه شده در زمان استفاده از کلرور جیوه در بین نمونه‌ها، استفاده از روش دوم سترون‌سازی توصیه می‌شود. تیمارهای استفاده و یا عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم در محیط کشت به خوبی نشان دادند که استفاده از آنتی‌بیوتیک برتری قابل توجهی نسبت به عدم استفاده از آن دارد.

نوع برش نمونه

در آزمایش نوع برش نمونه‌ها جهت تولید کالوس، بین ارقام از نظر صفات اندازه‌گیری شده تفاوتی دیده نشد. همان‌طورکه در جدول ٤ مشاهده می‌شود، نوع برش در مورد دو صفت تعداد کالوس و تعداد روز تا تولید کالوس در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌داری نشان دادند ولی برای دو صفت درصد کالوس جنین‌زا و درصد نمونه نکروزه شده تفاوت حاصل، معنی‌دار نبود. همچنین اثر متقابل برش در رقم در هیچ یک از صفات بررسی شده معنی‌دار نبود. نتایج مقایسات میانگین نشان داد که از نظر صفت درصد تولید کالوس، روش برش نیم استوانه‌ای با میانگین ۹٦/٤٪ نسبت به روش برش رینگی با میانگین ۸٤/۲٪ برتری داشت. همچنین در مورد صفت تعداد روز تا تولید کالوس، روش برش رینگی با میانگین ۲٤/۲۸ روز، طولانی‌تر از برش نیم‌استوانه‌ای با میانگین ۱۸/۵ روز بود.

همانطورکه ملاحظه می‌شود برش نیم‌استوانه‌ای نتایج بهتری را در تولید کالوس نشان داده است. علت این امر را می‌توان به افزایش سطح مقطع برش‌یافته در تماس با محیط نسبت داد. در این شرایط، نمونه بیشتر در تماس با محیط حاوی مواد غذایی قرار گرفته و میزان بیشتری از هورمون 2,4-D را دریافت می‌کند (Thrope, 1981; Taiz and Zeiger, 1998). علاوه بر این بافت کالوس از محل زخم تولید می‌شود و هرچه برش با سطح مقطع بزرگتر وجود داشته باشد حجم بافت کالوس تولید شده بیشتر خواهد بود. لازم به ذکر است که نمونه‌های تهیه شده به صورت رینگ، قبل از استقرار روی محیط کشت به سرعت اکسید شده و دیگر برای ادامه کار کیفیت لازم را دارا نبودند در حالی که چنین حالتی کمتر در برش نیم‌استوانه‌ای مشاهده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

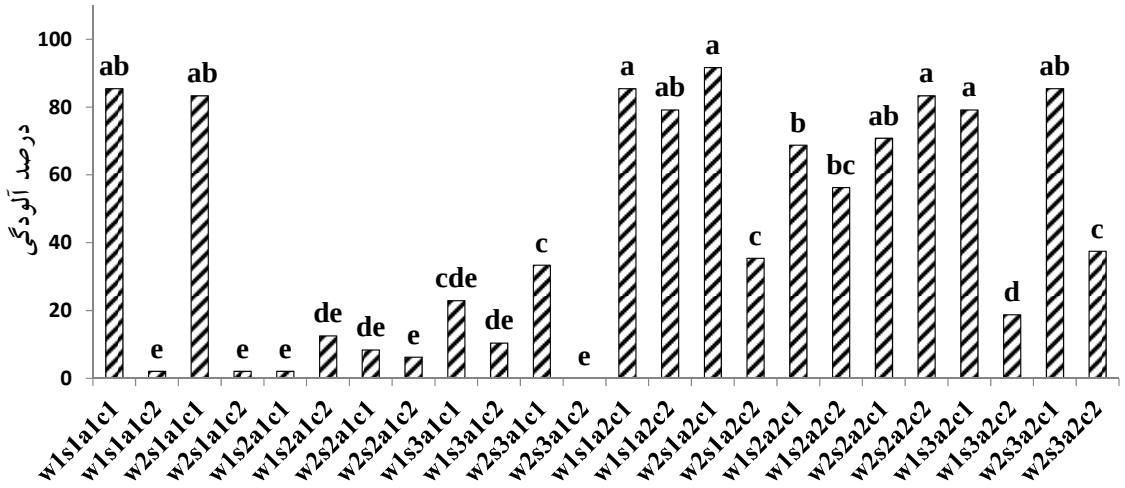
جدول ۳- جدول تجزیه واریانس بررسی میزان آلودگی بر اساس تیمارهای شستشو، سترون‌سازی و آنتی‌بیوتیک در دو رقم نیشکر. **، *و n.s به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح ۱%، ۵% و عدم تفاوت معنی‌دار.

Table 3 - Analysis of variance for infection percentage based on washing, sterilization and antibiotics treatments in two varieties of sugarcane. **,* and n.s respectively significant at 1%, 5% and non-significant.

میانگین مربعات Mean square	Df	منبع تغییرات Source of variation
166.882**	1	رقم (C)
0.255 n.s	1	شستشو (W)
33.723**	2	سترون‌سازی (S)
328.13**	1	آنتی بیوتیک (A)
2.296**	1	W × C
52.286**	2	S ×C
1.171 n.s	1	A × C
5.348**	2	S × W
0.421 n.s	2	A × W
16.598**	2	A × S
4.703**	2	A × S × W
3.39**	2	S × W × C
0.421 n.s	1	A × W × C
25.328**	2	A × S × C
9.203**	2	A × S × W × C
0.338	168	خطا (Error)
21.94		٪**CV**

www.SID.ir

Archive of SID



تیمارهای شستشو، سترون سازی و آنتی بیوتیک

شکل ۱- درصد آلودگی حاصل از روش‌های مختلف شستشو، سترون‌سازی و آنتی‌بیوتیک در دو رقم نیشکر. W) فاکتور شستشو با آب (دو روش)، S) فاکتور مواد سترون‌ساز (سه ترکیب)، A) فاکتور آنتی‌بیوتیک (دو سطح) و C) فاکتور ژنوتیپ (دو رقم)

Figure 1 - Infection percentage of different sterilizing methods including washing, antibiotic and antiseptic materials in two genotypes of sugarcane. (W) Washing with water (two methods), (S) Sterilizing materials (three compounds), (A) Antibiotics (two levels) and (C) Genotypes (two genotypes).

جدول ٤- جدول تجزیه واریانس صفات مختلف بر اساس تیمارهای نوع برش در دو رقم نیشکر. ** ، *و$^{n.s}$ به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح 1%، 5% و عدم تفاوت معنی‌دار.

Table 4 - Analysis of Variance for different traits based on cutting methods in two varieties of sugarcane. * *,* and $^{n.s}$ respectively significant at 1%, 5% and non-significant.

روز تا تولید کالوس Days to callus production	درصد نکروزه شدن Necrotic percentage	درصد کالوس جنین زا Percentage of embryogenic callus	درصد تولید کالوس Percentage of callus production	Df	منبع تغییرات Source of variation
0.035 $^{n.s}$	0.001 $^{n.s}$	0.00001 $^{n.s}$	0.035 $^{n.s}$	1	رقم (Cultivar)
234.32 **	0.0005 $^{n.s}$	0.002 $^{n.s}$	10.324 **	1	برش (Cutting)
0.892 $^{n.s}$	0.0006 $^{n.s}$	0.007 $^{n.s}$	0.035 $^{n.s}$	1	برش × رقم (Cutting ×Cultivar)
1.89	0.001	0.002	0.44	24	خطا (Error)
6.43	8.28	5.34	7.34		٪CV

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش تعیین ترکیب هورمونی مناسب برای تولید کالوس

غلظت بهینه 2,4-D

در این آزمایش، صفت تعداد روز تا ظهور کالوس و درصد تولید کالوس بین ارقام تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۵). بین سطوح هورمونی استفاده شده در هر دو صفت اندازه‌گیری شده تفاوت در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. چنین اختلافاتی در مطالعه نیز گزارش شده است (Sarvari and Hoseinzade, 2000).

نتایج مقایسات میانگین به روش دانکن نشان داد که تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۹۷/۵٪ تولید کالوس به همراه تیمار ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بالاترین درصد کالوس‌زایی را دارا بودند و در یک دسته قرار گرفتند. از نظر تعداد روز تا ظهور کالوس، تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر دارای بیشترین تعداد روز تا ظهور کالوس بوده و کمترین تعداد روز، مربوط به غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۱٤/۵ روز بود (شکل ۲).

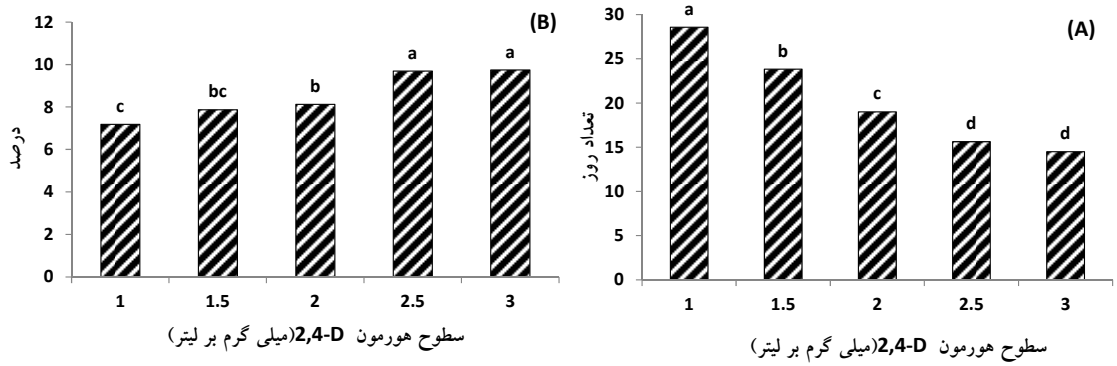
جدول ۵- جدول تجزیه واریانس صفات درصد تولید کالوس و تعداد روز تا تولید کالوس در سطوح مختلف هورمون 2,4-D در دو رقم نیشکر. ** ، *و$^{n.s}$ به ترتیب معنی‌دار در سطح 1%، 5% و عدم معنی‌داری.

Table 5 - Analysis of variance for percentage of callus production and days to callus production at different 2,4-D levels. **, * and $^{n.s}$ respectively significant at 1%, 5% and non-significant.

روز تا تولید کالوس Days to callus production	درصد تولید کالوس Percentage of callus production	Df	منبع تغییرات Source of variation
11.25 $^{n.s}$	6.05 $^{n.s}$	1	رقم (Cultivar)
551.26**	83.57**	4	هورمون (Hormone)
3.65 $^{n.s}$	2.57 $^{n.s}$	4	هورمون× رقم (C× H)
2.86	0.69	70	خطا (Error)
8.33%	11.54%		٪CV

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- مقایسه میانگین (به روش دانکن) صفات در سطوح مختلف هورمون 2,4-D. A) تعداد روز تا تولید کالوس. B) درصد تولید کالوس.

Figure 2 – Mean comparisons (using Duncan test) for different traits at different levels of 2,4-D. A) Days to callus production. B) Percentage of callus production.

تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر از 2,4-D بهترین نتایج را دارا بود، اما در خیلی از موارد بین این سطح هورمونی و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر، تفاوت معنی داری دیده نشد. در مواردی گزارش شده است که با افزایش سطح 2,4-D حجم کالوس بدست آمده افزایش می‌یابد (Ramanand *et al.*, 2006) ولی در پژوهش ما به دلیل از دست رفتن کالوس‌ها و آلوده شدن آنها در زمان توزین، امکان ارزیابی حجم کالوس فراهم نگردید. باید به این نکته هم توجه داشت که با افزایش غلظت هورمون، احتمال وقوع تنوع سوماتیکی نیز بیشتر شده و گیاهان حاصل دارای ویژگی‌های غیرعادی خواهند بود (Farsi and Zolala, 2003; Silvarolla, 1992; Damasco, 1996). زیرا این تنوع، مسیر طبیعی رشد، توسط مریستم‌های بعدی را دنبال نکرده و گیاهانی که از کالوس باززایی می‌شوند، مستعد تولید واریانت‌های سوماکلونی هستند (Burner and Grisham, 1995). در این پژوهش با در نظر گرفتن موارد عنوان شده سطح ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2,4-D به عنوان سطح مناسب انتخاب شد (شکل ۳). در بعضی از منابع به دلیل نرم و آبدارشدن کالوس‌های بدست آمده، استفاده از BAP به میزان کم توصیه شده است (Sadat *et al.*, 2008) اما مشاهدات این تحقیق نشان داد که بعضی از نمونه‌ها حتی تحت تأثیر غلظت‌های کم این هورمون نیز به ساقه‌دهی تحریک شدند به همین دلیل استفاده از این هورمون در مراحل بعد متوقف شد.

غلظت بهینه‌ی NAA+IBA

نتایج تجزیه واریانس استفاده هم‌زمان از دو هورمون NAA و IBA نشان داد که در دو صفت تعداد روز تا تولید کالوس و صفت تعداد کالوس تولیدی، تفاوت معنی‌داری در فاکتورهای ارقام و هورمون دیده نشد و تنها ارقام استفاده شده در درصد نکروزه شدن متفاوت بودند (به دلیل عدم معنی‌داری اکثر فاکتورها، از آوردن جدول تجزیه

www.SID.ir

Archive of SID

واریانس سطوح خودداری شد). نتایج مقایسات میانگین نشان داد که رقم CP69 با میانگین ۲۹/٤٪ نکروزه شدن نسبت به رقم CP48 با میانگین ۱۸/۳٪، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ داشت. در مورد سطوح هورمونی اعمال شده نیز تنها در صفت درصد نکروزه شدن تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. هیچ یک از سطوح هورمونی NAA و IBA به تنهایی تولید کالوس نکردند.

در استفاده همزمان از دو هورمون اکسینی NAA و IBA، به دلیل عدم تولید کالوس در غلظت‌های ۱ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر، این سطوح در تجزیه‌های آماری وارد نشدند. در غلظت‌های بالاتر هر چند که این مشکل تا حدی تعدیل گردید ولی باز هم تولید کالوس پایین بوده و درصد بالای نکروزه شدن مشاهده گردید. در نهایت سطح هورمونی ۷ میلی‌گرم در لیتر بالاترین پاسخ را داشت ولی همچنان بازدهی پایین این سطح هورمونی مانع از معرفی آن به عنوان تیمار هورمونی مناسب برای تولید کالوس از ریزنمونه‌ها شد. در غلظت‌های بالای هورمونی اعمال شده در این آزمایش تنوعات رشدی مشاهده شد برای مثال در تیمارهای بالای ۵ میلی‌گرم در لیتر، تولید ریشه‌های نابجا دیده شد.

در تحقیقی اثر دو نوع اکسین NAA و IBA در غلظتهای ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر بر تولید کالوس نیشکر رقم NCO310 مورد مقایسه قرار گرفت (Daneshvar, 2007). بررسی‌های آماری نشان داد که بین تاثیر اکسین‌های IBA و NAA تفاوت معنی‌داری بر تولید کالوس وجود داشت. همچنین غلظت‌های مختلف اکسین IBA تفاوت معنی‌داری بر تولید کالوس داشتند. در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر IBA در پایان هفته پنجم وزن‌تر کالوس بطور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود که نتایج این پژوهش بر خلاف داده‌های حاصل از تحقیق حاضر است.

بررسی محیط برای باززایی ریزنمونه‌ها

نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف در جدول ٦ آمده است. از لحاظ صفات تولید ساقه و باززایی از کالوس، بین ارقام تفاوت معنی‌داری دیده نشد. تیمارهای هورمونی اعمال شده از نظر صفات روز تا ظهور ساقه و تعداد ساقه تولیدی به ترتیب در سطح ۱٪ و ۵٪ تفاوت معنی‌دار نشان دادند. همچنین اثر متقابل هورمون و رقم در هیچ کدام از فاکتورهای اندازه‌گیری شده معنی‌دار نبود.

نتایج مقایسات میانگین نشان داد (شکل ۳) که بالاترین تعداد روز تا ظهور ساقه مربوط به تیمار اول (۱ میلی‌گرم در لیترIBA) بود و کمترین تعداد روز تا ظهور ساقه در تیمار چهارم (۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین) حاصل شد که این نتایج با پژوهش Ramin (2003) مطابقت دارد. از نظر تعداد ساقه‌های تولیدی، بالاترین تعداد مربوط به تیمار چهارم با میانگین ٤/۵ عدد و کمترین تعداد در تیمار دوم ساقه‌دهی، با میانگین ۳/۳۷ عدد بود. بین تیمارهای دوم، سوم و پنجم تفاوت معنی‌داری دیده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

درضمن از نظر ظاهری و مشاهداتی، در بین تیمارهای اعمال شده، تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA، کیفیت ساقه‌دهی برتری نسبت به سایرین داشت. در پژوهشی برای باززایی رقم CP73-21 از بافت کالوس، همین ترکیب محیط کشت، بیشترین تأثیر را در باززایی به همراه داشت (Sadat *et al.*, 2008) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

با توجه به نتایج حاصله، از بین تیمارهای اعمال شده برای تولید ساقه، تیمار شماره چهار (۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین) بهترین پاسخ را به باززایی داشت، که این نتایج با پژوهش Ramin (2003) مطابقت دارد. این تیمار از نظر تعداد روز تا ظهور ساقه کمترین تعداد روز و از نظر تعداد ساقه تولیدی دارای بیشترین تعداد بود. با توجه به دلایل ذکر شده، این تیمار به عنوان بهترین ترکیب هورمونی معرفی شد.

محیط کشت برای تولید ریشه

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای تولید ریشه نشان داد (جدول ۷) که بین ارقام استفاده شده، در صفات تعداد روز تا ظهور ریشه و بالاترین طول ریشه، در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌داری دیده شد ولی از لحاظ تعداد گیاهان به ریشه رفته بین آنها تفاوتی وجود نداشت. در تمام فاکتورهای اندازه‌گیری شده بین تیمارهای هورمونی اعمال شده تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ دیده شد. در نتایج حاصل از مقایسات میانگین روز تا ظهور ریشه، رقم CP69 با میانگین ۱۳/۱٤ روز نسبت به رقم CP48 با میانگین ۱۱/۹ روز دیرتر تولید ریشه کرد.

تیمار اول (۲ میلی‌گرم در لیترIBA به همراه ۳ گرم در لیتر زغال فعال) با میانگین ۱٦/۳۳ روز بیشترین و تیمار پنجم (۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۳ گرم در لیتر زغال فعال) با میانگین ۹/۸۳ روز کمترین تعداد روز تا ظهور ریشه را دارا بودند. در مقایسات میانگین صفت بالاترین طول ریشه، رقم CP48 با میانگین ٤/۷ سانتی‌متر، طول ریشه بلندتری از رقم CP69 داشت ولی از نظر تعداد ریشه بین دو واریته تفاوتی دیده نشد. تمیارهای ۲ و ٤ دارای بالاترین طول ریشه بودند و در گروهی جداگانه قرار گرفتند. در این مقایسه تیمار ۱ کمترین طول ریشه را دارا بود. در این پژوهش بیشترین تعداد گیاهان به ریشه رفته در تیمارهای ۵، ۲ و ۳ با میانگین ۱۰۰٪ دیده شد.

از میان تیمارهای بررسی شده تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۳ گرم در لیترزغال فعال، بلندترین طول ریشه را تولید کرد که این نتایج با مطالعه Ramin (2003) هم‌خوانی داشت. این تیمار به همراه تیمار پنجم، (۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه زغال فعال) سریع‌تر از سایرین به ریشه‌دهی رسید.

www.SID.ir

Archive of SID

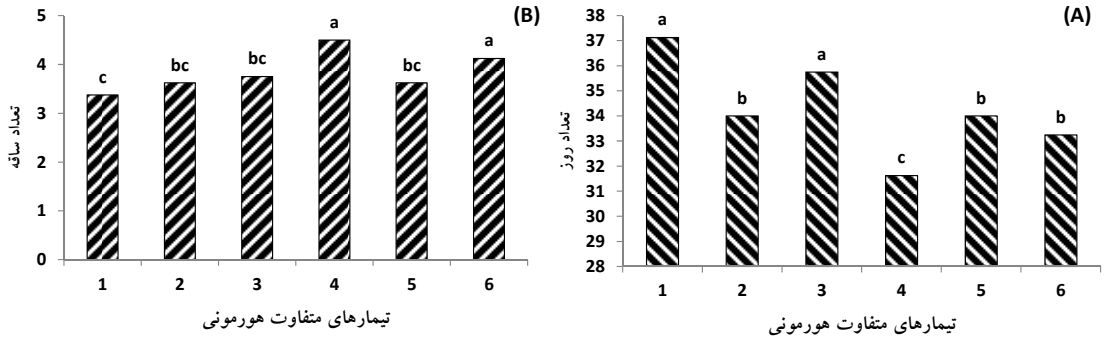
جدول ٦- جدول تجزیه واریانس صفات مرتبط با باززایی نمونه‌های کالوس در دو رقم نیشکر تحت تیمارهای مختلف هورمونی.

Table 6 - Analysis of variance for the traits related to regeneration of callus in two sugarcane cultivars and different hormone treatments.

تعداد ساقه Number of Shoots	روزتا ظهور ساقه Days to shoot production	Df	منبع تغییرات Source of variation
0.33 $^{n.s}$	2.08 $^{n.s}$	1	رقم (Cultivar)
1.33 *	29.63 **	5	هورمون (Hormone)
0.03 $^{n.s}$	1.36 $^{n.s}$	5	هورمون × رقم (Cultivar×Hormone)
0.37	2.37	36	خطا (Error)
15.97	4.49		٪CV

** ، *و$^{n.s}$ به ترتیب معنی‌دار در سطح 1%، 5% و عدم معنی‌داری.

*, ** and $^{n.s}$ respectively significant at 1%, 5% and non-significant



شکل ۳- مقایسه میانگین (به روش دانکن) تیمارهای مختلف هورمونی به منظور باززایی کالوس. A) تعداد روز تا ظهور ساقه B) تعداد ساقه. ترکیبات تیمارهای متفاوت هورمونی در جدول ۱ آورده شده است.

Figure 3 – Mean comparisons (using Duncan test) of different hormone treatments for regeneration from callus. A) Days to shoot production. B) Number of Shoot. The combination of different hormone treatments is presented in table 1.

در تیمار پنجم نیز نتایج نزدیکی بدست آمد به همین دلیل این دو تیمار به عنوان بهترین ترکیب‌های هورمونی برای تولید ریشه در دو رقم CP48 و CP69 معرفی شدند. در این آزمایش با

www.SID.ir

Archive of SID

وجود استفاده از تیمارهای برتر موجود در سایر آزمایشاتی که استفاده از اسید جیبرلیک به میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر توصیه شده (Ather *et al.*, 2009) و یا ترکیب محیط کشت ارائه شده در تحقیق دیگر (Behera and Sahoo, 2009)، با این حال نتایج مشابهی حاصل نشد که علت را می‌توان به شرایط رشدی متفاوت و عکس العمل متفاوت ارقام موجود در کشور در مقابل ارقام استفاده شده در سایر پژوهش‌ها نسبت داد.

افزودن زغال فعال به محیط کشت موجب جذب رنگ دانه‌های سمی (سیاه و قهوه‌ای) که از ترکیبات فنلی هستند، شده و در نتیجه ادامه رشد گیاهچه‌ها را در محیط کشت امکان پذیر می‌سازد (Heinz and Mee, 1969). البته بعضی از ترکیبات هورمونی از جمله اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و برخی از ویتامین‌ها و املاح مانند آهن و روی به وسیله زغال جذب می شوند. بنابراین، باید این مواد به مقدار کافی و مناسب در محیط کشت استفاده شوند (Pierik, 1997).

جدول ۷- جدول تجزیه واریانس صفات مرتبط با تولید ریشه در دو رقم نیشکر تحت تیمارهای مختلف هورمونی.

Table 8 - Analysis of variance for the traits related to rooting of seedlings for two cultivars and different hormone treatments.

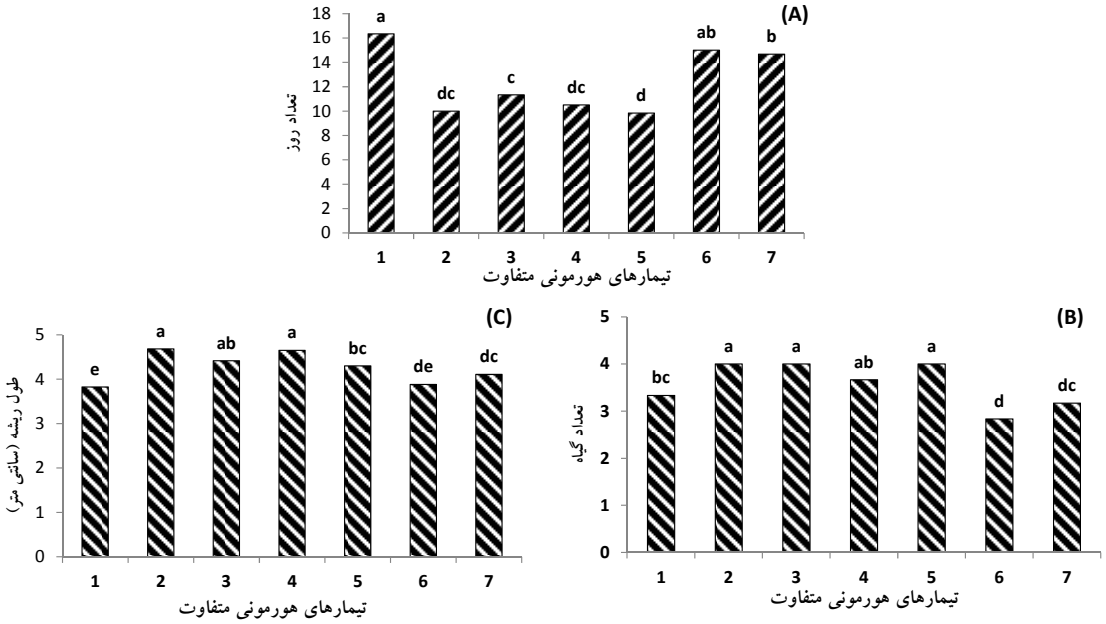
منبع تغییرات Source of variation	Df	روز تا ظهور ریشه Days to root production	طول ریشه Root length	تعداد گیاهان به ریشه رفته Number of seedlings producing root
رقم(Cultivar)	1	16.09 **	8.64 **	0.09 n.s
هورمون(Hormone)	6	44.35 **	0.709 **	1.32 **
هورمون × رقم (Cultivar×Hormone)	6	0.37 n.s	0.03 n.s	0.03 n.s
خطا(Error)	28	1.35	0.04	0.14
٪CV		3.30	5.16	10.58

** ، *و n.s به ترتیب معنی‌دار در سطح 1%، 5% و عدم معنی‌داری.

*, ** and n.s respectively significant at 1%, 5% and non-significant.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- اثرتیمارهای هورمونی متفاوت برصفات مختلف گیاهچه‌ها در دو رقم تجاری نیشکر. A) روز تا ظهور ریشه. B) تعداد گیاهان به ریشه رفته. C) بالاترین طول ریشه. ترکیبات تیمارهای متفاوت هورمونی در جدول ۲ آورده شده است.

Figure 4 – The effects of hormonal treatments on different seedlings traits in two commercial varieties of sugarcane. A) Days to root production. B) Number of seedlings producing root C) Root length. The combination of different hormone treatments are presented in table 2.

از طرف دیگر، زغال فعال برخی از مواد مثل اتیلن تولید شده به وسیله گیاهچه درون شیشه را که می‌تواند مانع ادامه رشد گیاهچه شود، جذب می‌کند (Schenk and Hildebrandt, 1972; Thrope, 1981) و ضمناً استفاده از زغال فعال کمک می‌کند تا هرچه بیشتر شرایط محیط کشت به شرایط گیاه در محیط خارج از شیشه شبیه شود که این مورد بعدها برای انتقال گیاه به محیط مزرعه می‌تواند مفید بوده و استقرار اولیه گیاه را بهبود بخشد (Schenk and Hildebrandt, 1972). مراحل مختلف کشت بافت گیاه نیشکر در آزمایش اخیر را می‌توان در شکل ۵ مشاهده کرد.

نتیجه‌گیری نهایی

جمع‌بندی نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که بهترین روش سترون‌سازی شامل مراحل سه بار شستشوی عادی (هر بار دو تا سه دقیقه) با آب جاری و سپس استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪، الکل ۷۰٪ و قرار دادن نمونه‌ها روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود. نتایج نشان داد که درصد کالوس‌های جنین‌زا و درصد نکروزه شدن نمونه‌ها تا حد زیادی مستقل از نوع برش بود و به ویژگی‌های خود رقم و سایر شرایط کشت بستگی داشت. اما از لحاظ درصد تولید کالوس و تعداد روز تا تولید کالوس

www.SID.ir

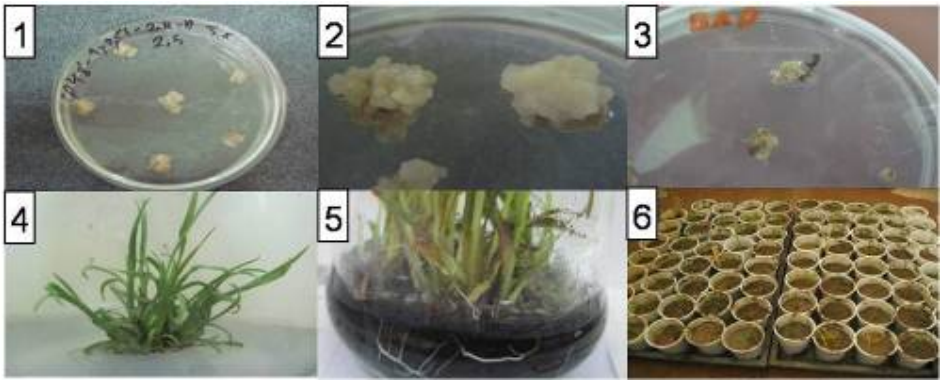
Archive of SID

برش نیم استوانه‌ای نسبت به برش رینگی بهترین نتیجه را بدست داد.

در تولید کالوس، غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2,4-D بهترین نتایج را داشت. به دلیل ساقه‌دهی زود هنگام کالوس‌ها در محیط 2,4-D به همراه BAP، استفاده از هورمون BAP در این بخش متوقف شد. تیمار هورمونی NAA به همراه IBA دارای بازدهی بسیار پایین بوده و نمی‌تواند جایگزین هورمون 2,4-D شود. تیمار ۱ میلی‌گرم در لیترBAP به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین بهترین نتایج را در باززایی از نمونه‌ها نشان داد. در تولید ریشه از نمونه‌های باززایی شده، تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و همین‌طور تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۳ گرم در لیتر زغال فعال به عنوان تیمارهای برتر انتخاب شدند. رعایت موارد عنوان شده به همراه بکارگیری ترکیب‌های مناسب هورمونی و شرایط مناسب دمایی و دوره‌های نوری دقیق، به محقق کمک می‌کند تا درنهایت کشت بافتی با درصد پاسخ‌دهی بالا و با سرعت بیشتر در باززایی گیاه نیشکر از بافت کالوس داشته باشد.

سپاسگزاری

از آقایان مهندس کمال ارگانی و مهندس مصطفی مومن‌زاده شوشتری به دلیل همکاری در انجام این تحقیق، سپاسگزاری می‌شود.



شکل ۳- مراحل مختلف کشت بافت نیشکر. ۱) ریزنمونه برگهای انتهایی بر روی محیط تولید کالوس ۲) تولید بافت کالوس از ریزنمونه ۳) ظهور جوانه‌های حاصل از بافت کالوس در محیط القاء ساقه-زایی ٤) تکثیر شاخساره درون شیشه ٥) القاء ریشه‌زایی در محیط ٦) انتقال گیاهچه‌های مناسب به گلدان‌های خاک تحت شرایط کنترل شده.

Figure 3 - Different stages of sugarcane tissue culture. 1) The terminal leaf explants on callus production medium, 2) Callus production of explants, 3) The germination of callus tissue on shoot induction medium, 4) In vitro shoot proliferation, 5) Root induction in medium, 6) Transfer the seedlings to soil pots under controlled conditions.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Ali A, Naz S, Siddiqui FA (2008). Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) through callogenesis and organogenesis. Pakistan Journal of botany 40: 123-138.

Arvinth S, Arvinth J, Srikanth S, Arun RK, Selvakesavan N, Mukunthan MN, Premachandran P, Ananda Kumar N, Subramonian S (2010). Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. Plant Cell Reports 29: 383–395.

Ather A, Khan S, Rehman A, Nazir M (2009). Optimization of the protocols for callus induction, regeneration and acclimatization of sugarcane cv. thatta-10. Pakistan Journal of botany 41: 815-820.

Behera KK, Sahoo S (2009). Rapid In vitro Micro propagation of Sugarcane (*Saccharumofficinarum* L. cv-*Nayana*) Through Callus Culture. Journal of Nature and Science (ISSN) 7: 1545-0740.

Biradar S, Biradar DP, Patil VC, Patil SS, Kambar NS (2009). In vitro plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane. Karnataka Journal of Agricultural Science 22: 21-24.

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

Cheng PK, Lakshmanan P, and Swarup S (2001). High frequency direct shoot regeneration and continuous production of rapid-cycling Brassicaoleracea in in vitro. *In* Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 37: 592 598.

Damasco OP, Graham GC, Henry RJ, Adkins SW, Smith MK, Godwin ID (1996). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (Musa spp. AAA) bananas. Plant Cell Reports 16: 118-123.

Daneshvar MH (2007). Modification of surface sterilization process and callus production from sugarcane vegetative organs (*Saccharum officinarum*). Journal of Agricultural Sciences 38: 267-275.

Farsi M, Zolala J (2003). Introduction to plant biotechnology. Ferdowsi university press. pp 495.

Gallo-Meagher M, English RG, Abouzid A (2000). Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 36: 37-40.

Gandonou C, Errabil TA, Idaomar M (2005). Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane. African Journal of Biotechnology 4: 1250-1255.

Hamudi J, Parvizi almani M, Bani Abasi N (2005). In vitro micropropagation of some commercial variety and promising clones of sugarcane using lateral and terminal buds and callus. Shekarshekan 100:15-26.

Heinz D J, Mee GWP (1969). Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop Science 9: 346-348.

Karim MZ, Amin, MN, Hossain MA, Islam S, Hossin F, Alam R (2002). Micropropagation of two Sugarcane (*Saccharum officinarum*) varieties from callus culture.Iranian Journal of Agricultural Science 2: 682-685.

Khalil SM (2002). Regeneration via somatic embryogenesis and microprojectile-mediated co-transformation of sugarcane. Arab Journal of Biotechnology 5: 19-32.

Krishnamurthi M (1986). Sugarcane improvement through tissue culture process, American journal of Sugarcane Technology 29: 23-28

www.SID.ir

Archive of SID

Liu MC, Chen WH (1984). Tissue and cell culture, an aid to sugarcane breeding-III. Highsucrose and vigorously growing cell clone 71-489. Tiawan Sugar 31: 77-84.

Ono Y, Takahata Y, Kaizuma N (1994). Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.). Plant Cell Reports 14:13-17.

Pierik RLM (1997). *In vitro* Culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland, pp143.

Ramanand N, Kureel N, Subhanand M, Lal S, Singh B (2006). Plantlet Regeneration Through Leaf Callus Culture in Sugarcane. Sugar Technology 8: 85-87.

Ramin AA (2003). In Vitro propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum*). Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 3: 41-49.

Sadat Sh, Bihamta M, Emam SA (2008). Effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of sugarcane variety CP73-21. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 15: 47-54.

Sarvari M, Hoseinzade A (2000). Effect of genotype, tissue culture and explant on callus induction and plant regeneration in sugarcane. Journal of Agricultural Sciences 31: 211-220.

Schenk RU, Hilderandt AC (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canada Journal of Botany 50: 199-204.

Silvarolla MB (1992). Plant genomic alterations due to tissue culture. Journal of Brazil. American Association for the Advancement of Science 44: 329-33.

Taiz L, Zeiger E (1998). Plant Physiology.2nd ed., Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts.

Thrope TA (1981). Plant Tissue Culture: Method and Applications in Agriculture. Academic Press, N. Y., USA.

www.SID.ir

Archive of SID

Regeneration of two commercial sugarcane cultivars (CP48-103 and CP69-1062) from terminal leaves derived explants

Kalantarhormozi S.[1], Siahpoosh M.R.[*2], Rajabi Memari H.[2], Hamdi H.[3], Shomeili M.[3], Hamoudi J.[3]

[1] MSc. Student, Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahwaz.
[2] Assistant Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahwaz.
[3] Research and Development Institute of Sugarcane Industry.

Abstract

Sugarcane is one of the most important industrial plants. There are many ways to improve the agronomic traits of this plant, such as genetic engineering and gene transfer methods. These modern techniques depend on optimizing the regeneration of plants from callus tissue. In this study, we attempted to optimize all different stages of tissue culture for regenerating the plants from callus tissue derived from terminal roll lives of two commercial sugarcane cultivars, CP48-10 and CP69-1062. Two types of cutting were applied, ring cutting and half-cylinder cutting from roll leaves. Among these cutting types, ring cutting from the roll leaves gives better results. Using solid MS medium with 3 mg per liter 2,4-D could attain the maximum callus production. To produce shoots from callus, the hormone combination of 1 mg per liter BAP and 2 mg per liter Kinetin showed the best response. Seedlings produced in MS medium containing 5 mg per liter IBA, 1 mg per liter Kinetin and 3 mg per liter NAA accompanied by 3 g per liter activated charcoal rendered the most root production. In the treatments with activated charcoal, the regenerated seedlings had superiority for the traits, days to root emergence, root length and number of roots in plants.

Key words: *Regeneration, Sterilization, Callus, Tissue culture, Kinetin, Sugarcane.*

[*] Corresponding Author: Siahpoosh M.R. Tel: 06133364056 Email: siahpoosh@scu.ac.ir

www.SID.ir