Archive of SID

بررسی اثر ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه بر پینه زایی و باززایی نیشکر

اکبر سروری و عبدالهادی حسین زاده
دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات
دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۱۰/۱

خلاصه

به منظور دستیابی به روش مناسب القای پینه زایی و باززایی در نیشکر، اثر سه فاکتور ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه در ارقام تجاری نیشکر ایران *Saccharum officinarum* L. در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا" تصادفی با سه تکرار در دو آزمایش جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول جهت مطالعه پینه زایی، ریز نمونه های برگ جوان و مریستم انتهایی از سه رقم نیشکر بنامهای NCO310, CP57-614, CP48-103 در چهار محیط کشت موراشیگ و اسکوگ تغییر یافته MS2-1, MS2-0, MS3-1, MS3-0 کشت گردیدند. تجزیه های آماری نشان داد که ریز نمونه برگی در مدت زمان کمتری نسبت به مریستم انتهایی شروع به پینه زایی می‌نماید. بهترین ارقام در ریز نمونه برگی از نظر زمان شروع پینه زایی CP48 و CP57 با میانگین ۱۱ روز و بهترین محیط های کشت MS3-1, MS3-0 بودند. در مورد ریز نمونه مریستم انتهایی اثر متقابل معنی داری بین ژنوتیپ ها با محیط کشت مشاهده گردید. از نظر حجم پینه، ریز نمونه برگی بیش از ریز نمونه مریستم انتهایی پینه تولید نمود. در آزمایش دوم به منظور باززایی گیاهچه های کامل از پینه ، ارقام فوق بعلاوه رقم L64-96 و محیط های کشت MS-D+SH, MS, MS5 استفاده گردید. تجزیه واریانس درصد شاخه و برگ زایی و ریشه زایی اثر متقابل معنی داری را بین ریز نمونه ، رقم و محیط کشت نشان داد.بطوریکه ریز نمونه برگی رقم L62 بیشترین و رقم CP48 کمترین میزان شاخه و برگ زایی را در هر سه محیط نشان دادند.

واژه های کلیدی : باززایی نیشکر ، ریز نمونه، پینه زایی و محیط کشت

مقدمه

تولید گیاه کامل از ریز نمونه گیاهی بوسیله تکنیکهای کشت بافت فواید متعددی را در گیاهان مختلف فراهم کرده است . در نیشکر، *Saccharum officinarum* L. ، از این طریق می توان گیاهانی راکه به سبب تکثیر غیر جنسی و به مرور زمان توسط عوامل ویروسی آلوده شده و عملکرد آنها به شدت کاهش یافته عاری از ویروس ساخت(۱۵). همچنین، از این طریق می توان با هزینه کمتر و در زمان کوتاهتر تعداد قلمه بیشتری را در مقایسه با روشهای معمول تولید نمود (۲ و ۳). با استفاده از این تکنیک نیز می توان با افزایش دامنه تنوع ژنتیکی برای مقاومت به تنش های زنده و غیر زنده ژنوتیپهای مطلوب راشناسایی و گزینش نمود (۸، ۱۰ و ۱۲).

تحقیقات در زمینه کشت بافت نیشکر در سال ۱۹۶۱ در هاوایی آغاز گردید (۱۴). القای پینه زایی و تمایز شاخ و برگ از ریز نمونه های مریستم انتهایی، برگ و گل آذین نیشکر اولین بار توسط هینز و می گزارش گردید(۶ و۷). لیو (۳) نشان داد که گنل آذین نارس بیشترین ظرفیت تمایز به گیاهچه را دارد و در بین گیاهچه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

حاصله از این بافت تغییرات ژنتیکی چندانی دیده نمی شود . وی مضافا" به این نتیجه رسید که پینه زایی و باززایی تحت تاثیر ژنوتیپ ، منبع ریز نمونه و محیط کشت می باشند. ندار و هینز (۱۹۷۴) در تحقیقات خود مشاهده کردند که ارقام قدیمی مانند بادیلا و Poj 2878 نسبت به ارقام جدید مانند F170 ، F160 دارای فراوانی باززایی کمتری هستند (۱۷). در مورد اثر محیط کشت بر پینه زایی و باززایی نیشکر مطالعات زیادی صورت گرفته است (۱۴،۱۳ و ۱۵). در یک تحقیق لیو نشان داد که توسعه ریشه در شاخه های باززایی شده در محیط کشت SH به مراتب بهتر از آن در دو محیط MS می باشد. یکی از دلایل تفاوت در اثر محیط کشتها، نوع و میزان هورمونهای بکار رفته در آنها می باشد. اهلو والیا (۱) در تحقیق خود به این نتیجه رسید که بکارگیری ۱ میلی گرم در لیتر هورمون کینتین به همراه ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون تو-فور-دی بعلاوه ۳/۲ میلی گرم هورمون IAA برای القای پینه زایی در سیب زمینی بسیار مطلوب می باشد . همچنین نتیجه تحقیقات مقدماتی در زمینه کشت بافت نیشکر به ما نشان داد که مقادیر کم کینتن همراه 2,4-D در رشد، توسعه و شادابی پینه ها بسیار موثر می باشد (داده های منتشر نشده) ولی میزان این تاثیر، همانطور که در منابع آمده است ، در ژنوتیپها و ریز نمونه های مختلف متفاوت خواهد بود. لذا در تحقیق حاضر برای درک بهتر این مطلب اثر دو سطح هورمونهای تو-فور-دی و کینتین در پینه زایی و باززایی دو ریز نمونه در چند رقم تجاری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این آزمایش سر شاخه هایی به اندازه ۶۰-۵۰ سانتیمتر از سه ژنوتیپ از ارقام تجاری نیشکر ایران بنامهای NCO310، CP48-103، CP57-614 از مزارع شرکت هفت تپه واقع در کیلومتر ۲۵ جنوب دزفول تهیه و جهت اجرای آزمایشهای در داخل کیسه های پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال یافتند. علت انتخاب این ارقام بالا بودن سطح کشت آنها در کشور بود.

از دو بافت بعنوان ریز نمونه استفاده گردید یکی ناحیه مریستمی انتهای ساقه شامل گره اول تا گره هشتم و دیگری اولین و دومین غلاف برگی چسبنده به ناحیه آپکس به اندازه ۳-۲ سانتیمتر. جهت جداسازی ریز نمونه ها ابتدا غلافهای برگی پیر و بیرونی تا گره دهم جدا شدند. این عمل تا دومین غلاف برگی جوان در زیر هود استریل ادامه یافت. مریستم انتهایی (اغلب تا گره هشتم) بعلاوه ۳ تا ۵ سانتیمتر غلاف برگی جوان چسبیده به آپکس به کمک اسکالپل استریل جدا گردید. ریز نمونه های برگی بمدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه در اتانل ۹۵ درجه و ۳ تا۵ دقیقه در کلراکس ۲۰٪ و ریز نمونه های مریستمی بمدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه در اتانل ۹۵ درجه و ۴ تا ۱۰ دقیقه (با توجه به اندازه بافت ها) در کلراکس ۲۰٪ ضدعفونی گردیدند. بافت ها بلافاصله سه بار با آب دوبار تقطیر استریل شستشو داده شدند. ریز نمونه ها پس از خشک شدن باکاغذ صافی استریل به محیط های کشت استریل در سه تکرار انتقال داده شدند.جهت کاهش ترشحات فنلی (که موجب قهوه ای شدن محیط کشت و پوسیدگی بافت می گردد)، عمل جداسازی بافت ها با سرعت انجام گرفت و در برخی موارد کربن فعال به محیط های کشت اضافه گردید. پس از انتقال ریز نمونه ها به داخل محیط کشت و ثبت مشخصات مربوط به تیمارها و تاریخ کشت بلافاصله به اتاقک با دمای ۲۷ درجه سانتیگراد و شرایط تاریکی انتقال یافتند. شرایط تاریکی بخاطر جلوگیری از ترشح و اکسیده شدن بافت ها اعمال گردید. پس از یک هفته، شرایط نوری با شدت ۴۰۰۰ لوکس نور سفید با فتوپریود ۱۲/۱۲ (تاریکی / روشنایی) تحت دمای ۲۷ درجه اعمال گردید تا عمل پینه زایی تسریع گردد.

آزمایش اول: بررسی تاثیر ژنوتیپ ها، محیط کشت و ریز نمونه بر پینه زایی ارقام نیشکر.

در این آزمایش سه ژنوتیپ از ارقام تجاری نیشکر ایران بنامهای NCO310، CP57-614، CP48-103در چهار محیط کشت MS3-1 (MS به اضافه ۳ میلیگرم توفوردی و ۱ میلیگرم کینتین) MS3-0(MS+۳ میلیگرم توفوردی بدون کینتین) MS2-1 (MS به اضافه ۲ میلیگرم توفوردی و ۱ میلیگرم کینتین) و MS2-0 (MS به اضافه ۲ میلیگرم توفوردی بدون کینتین) با دو ریز نمونه برگ جوان و مریستم انتهایی در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا" تصادفی در سه تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. تهیه محیط های کشت بر اساس دستورالعمل پیشنهادی لیو صورت گرفت (۱۴ و ۱۵). ریز نمونه ها پس از انتقال به محیط های کشت و اتاقک رشد بطور روزانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. از دو صفت زمان شروع پینه زایی و حجم پینه ، یادداشت برداری گردید. حجم پینه با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

روش هوکر و نی برز صورت گرفت. در این روش هوکر حجم پینه بر مبنای اندازه ۲۳ دایره مختلف تعیین می گردد که کوچکترین دایره با قطر ۱ میلی متر نشان دهنده کمترین حجم و بزرگترین دایره با قطر ۲۳ میلیمتر نشان دهنده بیشترین حجم پینه می‌باشد.

آزمایش دوم: بررسی تاثیر ژنوتیپ ، محیط کشت و ریز نمونه بر باززایی ارقام نیشکر.

در این آزمایش پینه های حاصل از ریز نمونه برگی و مریستم انتهایی از سه رقم آزمایش اول و از رقم L602-96 در سه محیط کشت MS, MS5 ,MS (MSبا ۵ میلی گرم در لیتر NAA) و MSD(MS با ۱ میلی گرم در لیتر کینتین) جهت شاخه و برگ زایی و در سه محیط کشت SH , MS5 , MS جهت ریشه زایی قرار داده شدند.

پینه های حاصله از ریز نمونه های ارقام فوق تحت شرایط استریل به قطعات کوچک وهم اندازه تقسیم و در داخل ظروف پتری به تعداد ۱۰-۸قطعه قرار داده شدند. ظروف پتری سپس در اتاقک رشد با دمای ۲۷ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۶/۸ ساعت (تاریکی / روشنی) نگهداری و بصورت هفتگی مورد بررسی قرار گرفته و تغییرات مربوطه بویژه ظهور شاخه و برگ و میزان رشد آنها ثبت می گردید. وقتیکه طول شاخه و برگها به ۳ تا ۵ میلی متر می‌رسید جهت ریشه زایی به محیط‌های SH, MS5, MS منتقل گشته و درصد ریشه زایی یادداشت برداری می گردید. گیاهچه های ریشه دار شده پس از رسیدن به طول ۱۰ الی ۱۵ سانتیمتر به گلدانهای حاوی خاک استریل و ورمی کولیت در گلخانه انتقال یافتند.

داده های مربوطه به درصد شاخه و برگ زایی و ریشه زایی با روش بارتلت مورد آزمون یکنواختی واریانس قرار گرفت. به دلیل معنی دار شدن این آزمون (سطح ۱٪) ، ابتدا داده ها با استفاده از فرمول Arcsin(SQRT(+1/4N)تبدیل و سپس با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و MSTAT-Cبصورت فاکتوریل در طرح پایه کاملا"تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگن ها با روش دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش اول: بررسی تاثیر ژنوتیپ ، محیط کشت و ریز نمونه بر پینه زایی نیشکر.

تجزیه واریانس نشان داد که از نظر زمان شروع پینه زایی بین ارقام، محیط های کشت ، ریز نمونه ، اثر متقابل رقم × محیط کشت و ریز نمونه × محیط کشت در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری وجوددارد (جدول ۱).

با توجه به جدول ۱ در ریز نمونه برگی بین ارقام و محیط های کشت اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ وجود دارد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که رقم CP48 ، CP57 بدون اختلاف معنی‌داری با یکدیگر (با میانگین حدود ۱۱ روز)، زودتر از رقم NCO310 شروع به پینه زایی نمودند (جدول ۲). محیط های کشت MS3-0 ،MS3-1بدون اختلاف معنی دار با یکدیگر و با میانگین حدود ۱۱ روز، بهتر از دو محیط کشت دیگر عمل کردند (جدول ۳).

در ریز نمونه مریستم انتهایی بین ارقام در سطح احتمال ۱ و اثر متقابل رقم× محیط کشت در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی داری مشاهده گردید. چون این اثر از نوع تغییر در ترتیب بود، لذا اثر متقابل به اثرات ساده هر فاکتور در سطوح فاکتور دیگر تفکیک گردید و قضاوت ها بر روی F های مربوطه به این اثرات صورت گرفت. براساس این نتایج تمامی اثرات ساده ارقام در هریک از محیط های کشت در سطح ۱٪ معنی دار و در مورد اثرات ساده محیط کشت در هر رقم فقط اثر محیط کشت در رقم CP57 در سطح ۱٪ معنی دار گردید. مقایسه میانگین در هر چهار محیط کشت نشان داد که، ارقام CP48 و NCO310بدون اختلاف معنی داری با یکدیگر،زودترازرقمCP57 شروع به پینه زایی نمودند (جدول ۴).

بخاطر ناهمگن بودن اندازه بافت ها در دو ریز نمونه برگی و مریستمی، تجزیه واریانس برای تعیین اختلاف بین دو ریز نمونه از نظر حجم پینه زایی میسر نبود، لکن مشاهدات ظاهری حاکی از تولید بیشتر پینه در ریز نمونه برگی بود.

جدول ۱ تجزیه واریانس صفت حجم پینه را برای هر دو ریز نمونه نشان می دهد. بر اساس این جدول در ریز نموهه برگی فاکتور رقم و اثر متقابل رقم × محیط کشت در سطح ۱٪ معنی دار گردیده است و بین محیط های کشت اختلاف معنی داری وجود ندارد. نتایج مقایسه میانگین این اثرات در سطح ۵٪ نشان داد که در محیط کشت MS3-0 ، رقم CP48با بیشترین میانگین بیش از دو رقم دیگر پینه تولید نموده ودر کلاس اول قرار گرفته است. در محیط های

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ - میانگین مربعات برای صفات زمان شروع پینه زایی، حجم پینه درصد ریشه زایی و شاخ و برگ زایی در ریزنمونه های برگی و مریستم انتهایی نیشکر

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی df	میانگین مربعات (M.S)			
		ریز نمونه برگی		ریز نمونه مریستم انتهایی	
		زمان شروع پینه زایی	حجم پینه	زمان شروع پینه زایی	حجم پینه
رقم	۲	۷/۱۹**	۳۲/۵۳**	۳۰/۰۸**	۳۶/۴۱**
محیط کشت	۳	۳/۳۷**	۰/۰۴ns	۲/۳۲ns	۲۲/۷۱**
رقم×محیط کشت	۶	۱/۴۷ns	۱۳/۲۹**	۳/۸۳**	۲/۶۵ns
اشتباه آزمایش	۲۴	۸/۳۳	۱/۹۶	۱/۲۷۸	۱/۶۳
		شاخ و برگ زایی	ریشه زایی	شاخ و برگ زایی	ریشه زایی
رقم	۳	۱/۹۴**	۰/۱۲**	۰/۱۲**	۰/۱۶**
محیط کشت	۲	۰/۰۴ns	۱/۳۲**	۰/۰۳ns	۰/۱۶**
رقم×محیط کشت	۶	۰/۰۸**	۰/۲۴**	۰/۰۷**	۰/۲۷**
اشتباه آزمایش	۲۴	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲

** و * : به ترتیب معنی دار در سطح ۱٪ و ۵٪

ns : غیرمعنی دار

جدول ۲ - میانگین زمان شروع پینه زایی ریز نمونه برگی ارقام نیشکر. مقایسه میانگین‌ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است. میانگین های دارای حروف مشابه اختلاف معنی دار ندارند

میانگین (روز)	ارقام
۱۰/۷۵ a	CP48
۱۰/۹۲ a	CP57
۱۲/۱۷ b	NCO 310

جدول ۳ - میانگین اثر محیط های کشت بر زمان شروع پینه زایی ریز نمونه برگی ارقام‌نیشکر. مقایسه میانگین ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است. میانگین های دارای حروف مشابه اختلاف معنی دار ندارند

میانگین (روز)	ارقام
۱۰/۸۹ a	MS3-0
۱۰/۶۷ a	MS3-1
۱۲/۰۰ b	MS2-0
۱۱/۵۶ ab	MS2-1

www.SID.ir

Archive of SID

کشت MS2-1, MS3-1 ارقام NCO310, CP48بدون اختلاف معنی داری بیش از رقم CP57 پینه تولید نموده اند در حالیکه در محیط کشت MS2-1 رقم NCO310 بهتر از دو رقم دیگر عمل نموده است (جدول ۵).

در ریز نمونه مریستم انتهایی (جدول شماره ۱) اثر متقابل رقم×محیط کشت معنی‌دار نبوده ولی اثرهای رقم و محیط کشت در سطح ۱٪ معنی دار شده است. بنابراین میانگین ارقام و محیط های کشت بطور جداگانه مقایسه گردیدند که در نتیجه رقم CP48 با بیشترین میانگین از دو رقم دیگر بهتر عمل نموده و در کلاس اول و رقم CP57 در کلاس سوم قرار گرفته است (جدول ٦). در بین محیط های کشت ، محیط کشت MS3-0بیشترین تاثیر و محیط کشت MS2-1کمترین تاثیر را در تولید پینه از خود نشان دادند (جدول ۷).

تولید پینه از ریز نمونه های برگ جوان ، مریستم انتهایی ، گل آذین نارس و مغز پارانشیمی ساقه نیشکر در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ تغییر یافته توسط محققین زیادی گزارش گردیده است (۵،۷،۹،۱۳ و۱۴). پینه اغلب پس از انتقال به محیط کشت از محل برش ریز نمونه ها شروع به رشد کرده و در نهایت تمام سطح ریز نمونه را می پوشاند. زمان شروع پینه زایی و میزان تولید آن اغلب تحت تاثیر فاکتورهایی مثل ژنوتیپ ، ریز نمونه ، محیط کشت و اثر متقابل آنها (۱۳،۱۴ و۱۵) و حتی زمان تهیه ریز نمونه (۴) قرار میگیرد. در این آزمایش ریز نمونه برگی بمراتب زودتر از مریستم انتهایی شروع به پینه زایی نمود که این امر احتمالا" مربوط‌به اثر منبع ریز نمونه بوده که در گزارشات هینز و می (٦ و۷) لیو و (۱۳) نیز بدان اشاره شده است.

در مجموع رقم CP48 تحت شرایط مشابه زودتر و بیشتر از دو رقم دیگر پینه زایی نمود که ناشی از واکنش متفاوت ژنوتیپ ها به این شرایط است. در ارتباط با محیط های کشت ،محیطهای MS3-1 MS3-0 ،بیش از دو محیط دیگر در کوتاه کردن دوره پینه دهی موثر بودند که این تفاوت به احتمال قوی بخاطر اثر مثبت غلظت بالای تو،فور-دی‌برای شروع پینه‌زایی‌است،چون غلظت‌بالای تو،فور-دی پدیده تقسیم سلولی را تسریع کرده و تولید پینه را القاء می نماید. در غلظت های ثابت تو،فور-دی وجود کینتین اثر مثبتی در کوتاه کردن پینه دهی داشت، اگر چه این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود.

در مورد ریز نمونه مریستم انتهایی، ژنوتیپ ها از لحاظ زمان شروع پینه زایی در محیط های کشت متفاوت واکنش مختلفی را از خود نشان دادند . در مجموع ارقام NCO310, CP48 زودتر از رقم CP57 پینه زایی نمودند. اثر محیط های کشت در مورد ارقام یکسان بود یعنی غلظت های ۲ و۳ میلی گرم در لیتر تو،فور-دی ، ۰ و۱ میلیگرم در لیتر کینتین در شروع پینه زایی این ریز نمونه به یک اندازه موثر بودند. این امر احتمالا" بخاطر وجود هورمون های اندروژن در بافت های مریستمی است.

نتایج آزمایش دوم: بررسی تاثیر ژنوتیپ، محیط کشت و ریز نمونه بر بازایی نیشکر

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های درصد شاخه و برگ زایی و ریشه زایی نشان داد که عامل رقم برای صفات درصد ریشه زایی و شاخ و برگ زایی در هر دو ریز نمونه و عامل محیط کشت برای صفت درصد ریشه زایی در هر دو ریز نمونه و اثر متقابل در هر چهار مورد در سطح احتمال ۱٪ معنی دار گردید.

در ریز نمونه برگی بخاطر معنی دار بودن اثر متقابل رقم × محیط کشت (از نوع تغییر در ترتیب) این اثر به اثرات ساده هر فاکتور در سطوح فاکتور دیگر تجزیه گردید.

مقایسه میانگین ارقام در هریک از سه محیط کشت MS-D, MS5, MS نشان داد که رقم L62 در محیط کشت MS5 و MS-D با بیشترین درصد شاخ و برگ زایی بهتر از سه رقم دیگر عمل نمود. در محیط کشتMS ساده، ارقام CP57 و L62 با اختلاف معنی داری نسبت به ارقام CP48 و NCO310 بازازایی بیشتری نشان دادند (جدول ۸).

در ریز نمونه مریستم انتهایی نیز بعلت معنی دار بودن اثر متقابل رقم × محیط کشت مشابه روش قبلی عمل گردید. بر اساس نتایج مقایسه میانگین رقم L65در محیط های کشت MS5 و MS-Dبا بیشترین میانگین ،بیش از سه رقم دیگر شاخه و برگ تولید نمود در حالیکه در محیط کشتMS رقم CP57 بیشترین شاخ و برگ زایی را داشت. در هر سه محیط کشت کمترین میزان شاخ و برگ زایی را رقم NCO310از خود نشان داد (جدول ۹).

در مورد درصد ریشه زایی ریزنمونه برگی نیز بعلت معنی دار بودن اثر متقابل رقم× محیط کشت (از نوع تغییر درترتیب) مشابه موارد قبل عمل گردید. نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد ریشه زایی ارقام در هر محیط کشت نشان داد که در محیط کشت MS5 رقم

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴ - میانگین زمان شروع پینه زایی ریز نمونه مریستم انتهایی ارقام نیشکر در سطوح محیط کشت. مقایسه میانگین ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است. میانگین های دارای حروف مشترک (در ستون ها) اختلاف معنی داری ندارند.

ارقام	محیط کشت			
	MS3-0	MS3-1	MS2-0	MS2-1
CP48	۱۸/۶۷ a	۱۸/۶۷ a	۱۹/۶۷ a	۱۹/۳۳ a
CP50	۲۶/۰۰ b	۲۹/۰۰ b	۲۹/۶۷ a	۲۸/۰۰ a
NCO 310	۲۰/۳۳ a	۲۰/۰۰ a	۱۹/۰۰ a	۲۰/۶۷ a

جدول ۵ - میانگین حجم پینه ریز نمونه برگی ارقام نیشکر در سطوح محیط کشت. مقایسه میانگین ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است. میانگین های دارای حروف مشابه (در ستون ها) اختلاف معنی داری ندارند.

ارقام	محیط کشت			
	MS3-0	MS3-1	MS2-0	MS2-1
CP48	۱۸/۴۴ a	۱۷/۷۲ a	۱۶/۵۶ b	۱۷/۶۳ a
CP57	۱۵/۸۰ c	۱۶/۶۸ b	۱۷/۲۵ ab	۱۶/۱۴ b
NCO 310	۱۶/۸۱ b	۱۷/۲۲ a	۱۸/۲۸ a	۱۷/۳۳ a

جدول ۶ - میانگین حجم پینه ریز نمونه مریستم انتهایی ارقام نیشکر. مقایسه میانگین ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است. میانگین های دارای حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند

ارقام	حجم پینه
CP48	۴/۲۲ a
CP57	۱/۸۳ c
NCO 310	۲/۹۶ b

جدول ۷ - میانگین اثر محیط کشت بر حجم پینه ریز نمونه مریستم انتهایی ارقام نیشکر. مقایسه میانگین ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است. میانگین های دارای حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند

محیط کشت	حجم پینه
MS3-0	۴/۳۲ a
MS3-1	۳/۴۵ b
MS2-0	۲/۷۲ b
MS2-1	۱/۶۱ c

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۸ - میانگین اثر محیط های کشت بر روی درصد شاخه زایی و برگ زایی ریز نمونه برگی ارقام نیشکر و مقایسه میانگین ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است میانگین های دارای حروف مشابه (در ستونها) اختلاف معنی داری ندارند

رقم	محیط کشت		
	MS5	MS	MS-D
CP48	۰/۵ c	۰/۵۸ b	۰/۵۹ c
CP57	۰/۷۴ b	۰/۹۳ a	۰/۹۸ b
NCO 3.0	۰/۵۸ c	۰/۳۶ c	۰/۷۱ c
C62	۱/۵۸ a	۱/۰۶ a	۱/۲۲ a

جدول ۹ - میانگین درصد شاخ و برگ زایی ریز نمونه مریستم انتهایی ارقام نیشکر در سطوح مختلف کشت مقایسه میانگین ها طبق روش دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفته است میانگین های دارای حروف مشابه (در ستونها) اختلاف معنی داری ندارند

رقم	محیط کشت		
	MS5	MS	MS-D
CP48	۰/۳۱ b	۰/۳۰ c	۰/۳۵ b
CP57	۰/۲۷ b	۰/۶۸ a	۰/۲۹ b
NCO 3.0	۰/۳۰ b	۰/۲۸ c	۰/۱۰ c
C62	۰/۵۸ a	۱/۴۰ b	۰/۵۲ a

جدول ۱۰ - میانگین درصد ریشه زایی در ریزنمونه برگی و مریستم انتهایی ارقام نیشکر در چند محیط کشت . مقایسه میانگین ها طق روش دانکن در سطح اختمال ۵٪ صورت گرفت. میانگین های دارای حروف مشابه (در ستونها) اختلاف معنی داری ندارند.

رقم	ریز نمونه					
	مریستم برگی			مریستم انتهایی		
	محیط کشت			محیط کشت		
	MS5	MS	SH	MS5	MS	SH
CP48	۰/۶۳ b	۰/۹۱ ab	۰/۸۸ c	۰/۵۶ b	۰/۶۲ b	۰/۷۶ b
CP57	۰/۶۵ b	۱/۱۲ a	۱/۳۹ab	۰/۵۶ b	۰/۷۳ b	۱/۰۸ a
NCO 310	۰/۸۵ a	۰/۵۵ b	۱/۵۸ a	۰/۶۶ a	۰/۷۶ a	۰/۱۳ c
L62	۰/۳۰ c	۱/۰۲ ab	۱/۲۳ b	۰/۴۶ c	۰/۷۷ a	۱/۱۶ a

www.SID.ir

Archive of SID

NCO310 با بیشترین ریشه زایی در گروه اول قرار گرفته و کمترین میزان ریشه زایی مربوط به رقم L62بوده است (جدول ۱۰) . در محیط کشت MS ارقام CP57, CP48 و L62 بدون اختلاف معنی دار بیش از رقم NCO310 ریشه زایی نمودند.. در محیط کشت SHارقام NCO2310 و CP57 بدون اختلاف معنی داری در گروه اول و ارقام L62 وCP48 بترتیب در گروههای بعدی قرار گرفتند (جدول ۱۰). در ریز نمونه مریستم انتهایی ، مقایسه میانگین صفت ریشه زایی برای ارقام در هر محیط کشت نشان داد که در محیط کشتMS5 رقم NCO310 با بیشترین میانگین در کلاس اول و رقم L62 در کلاس آخر قرار دارد و در محیط کشت MS ، ارقام NCO310، CP57 و L62 بدون اختلاف معنی دار با یکدیگر، در کلاس اول و رقم CP48 در کلاس بعدی قرار گرفت. در محیط کشت SH رقم L62 و CP57 بدون اختلاف معنی دار باهم ، با بیشترین درصد ریشه زایی در کلاس اول و رقم CP48 و NCO310 در کلاسهای بعدی قرار گرفتند (جدول ۱۰).

چند روز پس از انتقال پینه ها به محیط های کشت باززایی تجمع کلروفیل در سطح پینه صورت گرفت و حدود دو هفته پس از بازکشت در همان محیط ها برگهای کوچک و مینیاتوری در سطح پینه‌ها ظاهر شدند. در این بررسی اختلافاتی در بافت پینه ها ی ایجادشده مشاهده گردید . بطوریکه برخی از پینه ها بسیار ترد و شکننده و برخی ژله مانند و نرم بودند. پینه های ترد وشکننده نسبت به پینه های نرم و ژله مانند باززایی بیشتری انجام دادند.

باززایی از پینه های نیشکر همانطوریکه لیو و چن (۱۱) و ندار و همکاران (۱۸) گزارش نمودند به دو صورت ارگانوژنز و امبریوژنز انجام می گیرد. در محیط کشت MS5که حاوی ۵ میلیگرم درلیتر هورمون NAAبوددر زیر برخی از گیاهچه های تولید شده اندامهای تاج مانندی بنام Crown(توده گیاهی فشرده) تشکیل گردید که پس از رشد تبدیل به گیاهچه گردیدند. چنین پدیده‌ای در مطالعات ندار و هینز (۱۷) نیز گزارش گردیده است.

در این بررسی میزان شاخه و برگ زایی و ریشه زایی ریز نمونه برگی در تمامی ارقام در همه محیط های کشت بیش از ریز نمونه مریستم انتهایی بود که این امر احتمالا" بخاطر اختلاف پتانسیل باززایی ریز نمونه ها است . مارکس و مایرز (۱۶) نیز اثر منبع ریزنمونه را در میزان رشد و تمایز گیاهچه ها ذکر نمودند. از طرفی نتیجه فوق با یافته های لیو (۱۳) مغایرت دارد چراکه بر اساس گزارشهای وی اختلاف معنی داری بین ریز نمونه برگی و مریستم انتهایی از حیث تمایز به گیاه کامل وجودندارد. این تفاوت ممکن است ناشی از اثر ژنوتیپ و یا زمان تهیه ریز نمونه ها (۴) باشد. چون ریز نمونه های مورد استفاده در این تحقیق در فصل پاییز برداشت شده‌اند و احتمالا" غلظت اکسین‌ها در بافت های مریستمی بعلت کاهش فعالیت فیزیولوژیکی گیاه کاهش یافته و میزان رشد و تمایز ریز نمونه‌ها را تحت تاثیر قرار داده است. محیط کشت SH نسبت به محیط‌های کشت MS, MS5 اثر زیادی در ریشه زایی ریز نمونه های برگی و مریستمی داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان دادند که پینه زایی و باززایی گیاهچه‌های نیشکر تحت تاثیر ژنوتیپ، ریز نمونه، محیط کشت و اثر متقابل آنها قرار می‌گیرد. بنابراین بایستی در مورد هر رقم این مطالعات صورت گیرد تا بهترین محیط کشت و منبع ریز نمونه بسته به هدف اصلاحگر تعیین گردید. در مجموع محیط‌های کشت MS3-0 ,MS3-1جهت تولید پینه و محیط‌های کشت MSD+SHجهت شاخ و برگ زایی و ریشه زایی گیاهچه‌های نیشکر توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

از دکتر سیروس عبدمیشانی بخاطر پیشنهادات ارزنده و فراهم ساختن امکان استفاده از آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و همچنین از مهندس بخشی زاده ریاست محترم شرکت نیشکر هفت تپه و مهندس کاظمی رئیس بخش تحقیقات آن شرکت که در امر تهیه مواد گیاهی لازم جهت انجام این تحقیق صمیمانه ما را مساعدت نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

. Ahloowalia, B. A. S. 1982. Plant regeneration from callus Culture in potato. Eupytica 31:755-759.

www.SID.ir

Archive of SID

2 . Artschwager, E. 1925. Anatomy of the vegetative organs of sugarcane. J. Agric. Res. 30: 197-221.

3 . Barba, R. C., A. B. Zamora, A. K. Mallion & C.K. Linga. 1977. Sugarcane tissue culture research. Proc. Congr. Intl. Soc. Sugarcane Technol. (Brazil) 16:1843-1864.

4 . Evans, D. A., W. R. Sharp, & C. E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. P. 45-111. In: T. A. Thorpe (Ed) Plant tissue culture-methods and application in agriculture. Academic Press, New York.

5 . Gil Diaz, V. A., G. Morejon, J. Preze ponce, & I. H. O'Farril. 1991. Improvement of rooting induction in sugarcane (Hybrid Saccharum Spp.) Obtained by micropropagtion. Horticulture Abs. 61(8): 7505.

6 . Heinz D. J., & G. W. P. Mee. 1968. Tissue callus differentiation and regeneration of plants in Saccharum sp. Agron. Abs. p.10.

7 . Heinz, D. J., & G. W. P. Mee. 1969. Plant differntiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop. Sci. 9:340-348.

8 . Kirshnamuthi, M. & J. Tlaskal. 1974. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* Var. Pinder subclones from tissue cultures. Proc. Congr. Soc. Sugarcane Technol. (South Africa) 15:130-137.

9 . Lago, L. & B. Peteria . 1988. Preliminary study of the effect of myo-inositol on callus growth of sugarcane in vitro. Horticulture Abs. 61(9):8622.

10. Liu, M. C. & H. S. Yeh. 1982. Selection of NaCl tolereant line through stepwise salinized sugarcane cell cultures. Proc. 5th Issct. pp 477-478. Tokyo. Japan.

11. Liu, M. C. & W. H., Chen, 1974. Histological studies on the origin and process of plantlet differentiation in sugarcane callus mass. Proc. 15th Issct. pp 118-129. Durban, South Africa.

12. Liu, M. C. & W. H. Chen. 1979. Application of tissue and cell culture technique for sugarcane improvement. Annual Report Research Development Councill, pp 26-29. Taiwan sugar crop. Taiwan.

13. Liu, M. C. 1981. In vitro methods applied to sugarcane improvement p. 299-324. In:T. A. Thorpe (Ed.) Plant tissue culture-methods and application in Agriculture. Academic Press. New York.

14. Liu, M. C. 1984. Sugarcane. P. 572-605. In:sharp, W. R., D. A. Evans, P. V. Ammirato, and Y. Tamada (Eds.) Handbook of plant cell culture. Vol. 2 Crop species, Mac Millan Pub. Co. New York.

15. Lourens, A. G. & F. A. Martin. 1987. Evaluation of in vitro propagated hybrid for somaclonal variation. Crop Sci. 27:793-795.

16. Marks, T. R. & P. E. Myers. 1992. Effect of explant location upon early culture development in vitro. Jour. of Hortic. Sci. 67(5):583-591.

17. Nadar, H. M. & D. J. Heniz 1977. Root and shoot development from sugarcane callus tissue. Crop Sci. 17:814-816.

18. Nadar, H.M. S. Soeprapotpo, D. J. Heinz & S. L. Ladd. 1978. Fine structure of sugarcane (Saccharum sp.) callus and the role of auxin in embryogenesis. Crop Sci. 18:210-216.

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of Genotype, Media and Explant on Callus Initiation and Plant Regeneration in Sugarcane

A. SORORY AND A. HOSIEN-ZADEH

Former Graduate Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran , Karaj , Iran.

Accepted Dec. 22 1999

SUMMARY

Effects of three variables on callus initiation and plant regeneration in sugarcane were studied in two experiments using a factorial experiment based on complete randomized design with three replicaions. For callus initiation, explants from young leaf tissue and apical meristem of three sugarcane cultivars, CP48, CP57, and NCO 310 were excised and placed on four modified Murashinge and Skoog medium (MS-C) named MS3-0, MS3-1, MS2-0, and MS2-1. In the first experiment, statistical analysis showed that the leaf explant as compared with apical meristem explant took less time to initiate callus. Number of days to callus initiation (NDCI) from leaf explant was lowest for cultivars CP48, and CP57 (with the mean of 11 days) and MS3-0 and MS3-1 culture media. There was significant interaction between genotype and media regarding NDCI. Callus volume was found to be larger for leaf rather than apical meristem explant. In the plant regeneration study, calluses from the above cultivars were transferred to three regeneration media including MS, MS5, and MS-D + SH. Analysis of variance on percent shoot and root regeneration showed significant interaction between explants, media, and cultivars. Leaf explant of cultivar L62-96 produced the highest percent of shoot production and that of cultivar CP48 produced the lowest percent in all media.In Summary, it was concluded that both callus intiation and plant regeneration in sugarcane were substantially affected by all three variables and that in most cases, there was significant interaction betwwen the variables.

Keywords: Sugarcane, Explant, Callus, Regeneration

www.SID.ir