Archive of SID

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد یازدهم، شماره سوم، پائیز ۱۳۹۷
۴۸۹-۴۸۱
http://dx.doi.org/ 10.22077/escs.2018.781.1160

تولید تنوعات سوماکلونی درون‌شیشه‌ای متحمل به تنش خشکی در نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) با استفاده از ارقام تجاری ایران

سحر شامنصوری[۱]، مهرآنا کوهی دهکردی[۱]، محمود شمیلی[۲]
۱. گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران
۲. موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۱۸

چکیده

تنش خشکی یک بحران در حال رشد است که به‌شدت تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان را محدود نموده و عامل مهمی در کاهش عملکرد گیاهان زراعی ازجمله نیشکر به‌خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک به شمار می‌رود. به‌منظور گزینش سوماکلون-های متحمل به خشکی در سه واریته تجاری نیشکر، تنش خشکی در چهار سطح (شاهد) صفر=T_1، ۲۵ =T_2، ۵۰ =T_3 و ۷۵ =T_4 گرم در لیتر پلی‌اتیلن‌گلیکول در محیط کشت بافت MS اجرا گردید. شاخص‌های کمی بافت‌های کالوس به‌دست‌آمده از جهش تصادفی، موردمطالعه قرار گرفت. پس از باز زا شدن کالوس‌ها و انتقال گیاهک‌ها به محیط شاخه زایی، از هر سطح تنش خشکی واریانت‌های متعددی انتخاب و میزان تجمع پرولین در ارقام بررسی شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده تمامی شاخص‌های کمی موردمطالعه در هر سه واریته تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفتند. در تیمارهای تحت تنش خشکی زمان القاء ظهور کالوس به‌طور میانگین ۳۳/۸ درصد بیشتر از تیمار شاهد و درصد کالوس‌زایی به‌طور میانگین ۳۱/۷۱ درصد کمتر از تیمار شاهد بود. درصد کالوس باززا نیز به‌طور میانگین ۱۳/۵۳ درصد کمتر از تیمار شاهد و زمان القاء گیاهک به‌طور میانگین ۴۳/۲۱ درصد بیشتر از تیمار شاهد به دست آمد. روند میزان تجمع پرولین به مقدار زیادی متأثر از ژنوتیپ بود و با افزایش سطح تنش خشکی افزایش نشان داد. در سوماکلون‌های حاصل از واریته CP48-103 مقدار تجمع پرولین بیشتری مشاهده شد لذا سوماکلون‌های این واریته به‌شرط حفظ سایر شرایط زراعی خوب و بررسی مولکولی می‌توانند به‌عنوان ژنوتیپ‌های جدید معرفی گردند.

واژه‌های کلیدی: **پرولین، پلی‌اتیلن‌گلیکول، سوماکلون، کالوس**

مقدمه

نیشکر (*Saccharum officinarum* L) از مهم‌ترین گیاهان قندی چندساله است که به‌طورمعمول از آن شکر استحصال می‌گردد (Ramezani, 2008). کشت این گیاه در مرحله نخست، جهت تهیه ساکارز است، اما ملاس، اتیل الکل و فیبر (باگاس) نیز از محصولات دیگر آن به شمار می‌رود. رشد نیشکر به‌طور موفقیت‌آمیزی در دامنه وسیعی از درجه حرارت، تشعشعات خورشیدی، بارندگی و شرایط خاک گزارش شده است (Fathi, 1989). تنش‌های محیطی اعم از تنش‌های زنده و غیرزنده همواره از عوامل اصلی کاهش تولید محصولات زراعی و از موانع اصلی رسیدن به پتانسیل عملکرد محصولات مختلف بوده‌اند. لذا توجه به مقاومت واریته‌های زراعی به این تنش‌ها از دیدگاه بهنژادی همواره موردتوجه بوده است (Chaghakaboodi et al., 2011). تنش خشکی یکی از بزرگترین محدودیت‌ها در رشد محصولات در نواحی خشک و نیمه‌خشک در تمامی نقاط جهان است، چراکه آب نقش حیاتی در متابولیسم گیاه در همه مراحل رشد و نموی دارد (Rabiei et al., 2011). خشکی یکی از چالش‌برانگیزترین مسائل کشاورزی پایدار است که تولید نیشکر را محدود می‌کند و در برخی موارد، کاهش عملکرد به علت خشکی تا ۵۰ درصد برآورد شده

* نگارنده پاسخگو: مهرآنا کوهی دهکردی . پست الکترونیک: m.koohi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

است (Dias et al., 2011). در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای تکمیل روش‌های متداول اصلاحی به‌منظور تولید گیاهان مقاوم در برابر تنش، با استفاده از تنوع موجود یا ایجادشده در کشت بافت صورت گرفته است. سیستم کشت بافت برای ارزیابی تحمل به تنش‌های محیطی مفید است زیرا تنش‌های محیطی در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌سادگی قابل‌کنترل هستند. زمانی که بافت گیاهی در محیط کشت در سطح سلولی در حال رشد است می‌توان آن را تحت تأثیر عوامل تنش قرار داد، بافتی که بتواند در شرایط تنش زنده بماند، می‌تواند با مقاومت به یک صفت از قبل مشخص‌شده به یک گیاه کامل تبدیل شود. آزمایش‌های درون شیشه‌ای برای بررسی تحمل تنش و شناسایی ارقام مقاوم در یک محیط مشخص با شرایط کنترل‌شده در یک فضای محدود و یک دوره زمانی کوتاه مؤثر هستند (Chaghakaboodi et al., 2011). پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) با وزن مولکولی بالا (6000 MW) از مدت‌ها پیش به‌عنوان عامل اسمزی که بدون نفوذ به داخل سلول گیاهی ایجاد تنش کم‌آبی می‌کند، در انتخاب لاین‌های مقاوم در بسیاری از گیاهان مورداستفاده قرار گرفته است. در محیط کشت، پلی‌اتیلن‌گلیکول قادر است تنش خشکی را مشابه با شرایط موجود در مزرعه و گلخانه اعمال نماید (Rabiei et al., 2011). بر اساس نتایج تحقیقات انجام‌شده پلی‌اتیلن‌گلیکول ماده مناسبی برای شبیه‌سازی تنش خشکی است و تأثیر خشکی و پلی‌اتیلن‌گلیکول بر گیاهچه‌ها یکسان بوده است (Ramshini et al., 2009). در راستای شناسایی ارقام متحمل به تنش در شرایط آزمایشگاهی مطالعات متعددی صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به بررسی سوماکلون‌های متحمل به خشکی پنج واریته نیشکر در غلظت‌های صفر، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلیکول اشاره نمود که القاء کالوس، میزان باززایی، پنجه‌زنی و ریشه‌زایی با افزایش سطح PEG کاهش نشان داد (Begum et al., 2011). در مطالعه عکس‌العمل کالوس‌های نیشکر در محیط کشت حاوی عامل تنش‌زای خشکی، مشاهده شد محتوی آب نسبی و رشد کالوس در سطوح بالای تنش کاهش و محتوی پرولین کالوس افزایش یافته است (Errabii et al., 2007). بررسی اثر دو سطح ۲۰ و ۳۰ درصد PEG در کالوس‌های نیشکر نشان داد در سطح ۳۰٪ همه کالوس‌ها از بین رفتند ولی در سطح ۲۰٪، اسمولیت‌هایی مثل پرولین و آسکوربیک اسید نسبت از سطوح بالاتری نسبت به شاهد برخوردار بودند (Rao et al., 2013). با توجه به اینکه انتخاب ارقام از طریق کشت بافت می‌تواند در بهبود سازگاری گیاهان در شرایط خشکی نقش بسزایی داشته باشد، تحقیق حاضر باهدف تولید سوماکلون‌های متحمل به خشکی در شرایط آزمایشگاهی در سه رقم تجاری نیشکر که عملکرد قابل قبولی داشته و سطح زیر کشت زیادی را در استان خوزستان به خود اختصاص داده‌اند، انجام شد.

مواد و روش‌ها

منابع گیاهی آزمایش مشتمل بر سرشاخه سه رقم تجاری نیشکر (CP48-103، CP69-1062 و CP57-614)، از مزارع کشت و صنعت کارون شوشتر تهیه شد. جهت پیش سترون‌سازی، قطعات حدود ده سانتی‌متری از سرشاخه (جوانه انتهایی) جداشده و پس از شستشو با آب و مواد شوینده جهت سترون‌سازی به هود لامینار انتقال یافتند. نمونه‌ها ابتدا در محلول کاربندازیم دو در هزار به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شده، سپس چند بار شستشو و در معرض اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم (۵ درصد کلر فعال) به همراه توین ۲۰، به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و چهار الی پنج بار با آب استریل شستشو شدند. از برگ‌های لوله‌ای سفید اطراف مریستم (برگ‌های پریموردیا) به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد و به قطعات کوچک دو الی سه سانتی‌متری برش داده شد. هر پنج جدا کشت در ۱۰ تکرار (پتری‌دیش) کشت داده شد. هر پتری‌دیش محتوی محیط MS دارای سه میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۳۰ گرم ساکارز، شش گرم آگار و چهار سطح T_1=۰، T_2=۲۵، ۵۰ =T_3 و T_4= ۷۵ گرم در لیتر PEG (6000)، که به ترتیب معادل شاهد، ۰/۱۹-، ۰/۵- و ۰/۹۳- مگاپاسکال می‌باشند، با اسیدیته ۵/۸ بود. شاخص‌های کمی (رشدی و نموی) شامل زمان القاء ظهور کالوس (تعداد روز تا ظهور کالوس بعد از کشت برگ‌های پریموردیا) (Kumlay and Ercisli, 2015)، درصد کالوس‌زایی (درصد ریزنمونه‌های تولیدکننده کالوس)، میزان کالوس باززا (درصد کالوس‌های ناصاف، متراکم، سفید یا زرد کم‌رنگ) و زمان القاء گیاهک (تعداد روز تا باززایی کالوس) جهت بررسی تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی ناشی از کاربرد PEG (6000) (فاکتور فرعی) بر روی کالوس‌های سه واریته (فاکتور اصلی) موردنظر در شرایط درون شیشه‌ای به‌صورت طرح کرت‌های خردشده (به دلیل شرایط خاص کار ازجمله عدم امکان کشت یا بازکشت

www.SID.ir

Archive of SID

هم‌زمان واریته‌ها با یکدیگر و لزوم افزایش دقت در فاکتور دوم یا فرعی) در ده تکرار موردبررسی و با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت (جدول ۱). پتری‌دیش‌های هر واریته به‌طور جداگانه در یک قفسه از اتاق رشد قرار گرفتند و این کار باعث سهولت در اندازه‌گیری شاخص‌های کمی و نیز بازکشت در محیط‌های کشت جدید می‌گشت. اتاق رشد تحت شرایط نور سفید و زرد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محدوده دمایی ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد قرار داشت.

پس از اعمال تیمارهای مختلف و تولید بافت کالوس، کالوس‌های متحمل به خشکی انتخاب و جهت باززایی به محیط کشت باززایی حاوی PEG با همان سطوح قبلی انتقال یافتند. پس از باززا شدن کالوس‌ها، گیاهک‌ها به محیط شاخه‌زایی با ترکیب [MS + Kin (2 mgl^{-1}) + NAA (0.05 mgl^{-1}) + GA3 (0.15 mgl^{-1})] تحت شرایط محیطی فوق‌الذکر انتقال یافتند. بعد از سه الی پنج نوبت واکشت که هرکدام سه هفته به طول انجامید، گیاهچه‌های سالم با طول تقریبی ۱۰ سانتی‌متر و دارای رشد خوب به محیط کشت ریشه‌زایی، محیط پایه MS به همراه NAA (0.1 mgl^{-1}) یا IAA (0.1 mgl^{-1}) و BAP (0.07 mgl^{-1}) منتقل شدند. از هر سطح تنش خشکی واریانت‌های متعددی به دست آمد. واریانت‌های علفی، ضعیف و بدون توان پنجه‌دهی و همچنین آلبنیسم حذف گردید و فقط واریانت‌های قوی مورد تکثیر قرار گرفت پس از ۳ الی ۴ هفته، گیاهچه‌های ریشه‌دار (ریشه‌های توسعه‌یافته و دارای تارهای کشنده کافی) V1(واریانت‌های به‌دست‌آمده از سطح ۲۵ گرم در لیتر)و V2 (واریانت‌های به‌دست‌آمده از سطح ۵۰ گرم در لیتر) جهت بررسی مقاومت به تنش خشکی، به مدت یک هفته به محیط حاوی پلی‌اتیلن‌گلیکول منتقل و در معرض تنش (سطوح صفر، ۲۵ و ۵۰ گرم در لیتر پلی‌اتیلن‌گلیکول) قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته، اندازه‌گیری میزان پرولین با استفاده از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) انجام شد.

نتایج و بحث

تأثیر تنش خشکی بر خصوصیات کمی کالوس

نتایج تجزیه واریانس برای صفات اندازه‌گیری شده در کشت کالوس نشان داد واریته‌های موردبررسی برای تمامی صفات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول۱). بین سطوح مختلف تنش خشکی (صفر، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ گرم در لیتر) برای تمامی صفات اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ولی بین ارقام و سطوح مختلف تنش خشکی برای صفات زمان القاء ظهور کالوس و درصد کالوس‌زایی اثر متقابل معنی‌داری مشاهده نشد، درحالی‌که برای صفات میزان کالوس باززا و زمان القاء گیاهک اثر متقابل معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد.

زمان القاء ظهور کالوس

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد شاخص زمان القاء ظهور کالوس در تیمارهای آزمایشی، تحت تأثیر تنش خشکی قرارگرفته و در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار گردید ولی اثر متقابل معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی وجود نداشت (جدول ۱). افزایش شدت تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار زمان القاء کالوس گردید به‌طوری‌که در تیمارهای تحت تنش خشکی زمان القاء کالوس به‌طور میانگین ۳۳٫۸ ٪ بیشتر از تیمار شاهد بود (شکل ۱).

در بین واریته‌های موردمطالعه بهترین زمان القاء ظهور کالوس با ۱۸٫۳ روز، در واریته CP48-103 مشاهده شد و دو واریته دیگر CP57-614 و CP69-1062 با محدوده ۲۲ تا ۲۳ روز اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۱). کمترین زمان القاء ظهور کالوس در واریته CP69-1062 با ۱۹٫۴ روز (تیمار شاهد) و بیشترین زمان القاء ظهور کالوس در واریته CP57-614 با ۲۷٫۴ روز (تیمار ۷٫۵ درصد PEG) مشاهده شد (شکل۱). نتایج تحقیقات پیشین حاکی از آن است که افزایش مقدار PEG به محیط کشت به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش زمان القاء ظهور کالوس می‌شود درحالی‌که کمترین زمان القاء ظهور کالوس از محیط کشت بدون PEG گزارش شده است (Islam et al., 2010; Begum et al., 2011). تأثیرپذیری کمتر CP48-103 نسبت به دو واریته دیگر تحمل سلول‌های مریستمی (سلول‌های با توان تقسیم و تکثیر بالا که در اطراف و نزدیک مریستم قرار دارند) آن را نسبت به تنش خشکی نشان می‌دهد، لذا فعالیت حیاتی این واریته ممکن است در تنش خشکی با آسیب کمتری نسبت به دو واریته تجاری دیگر همراه باشد و قدرت‌ترمیم بهتری داشته باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

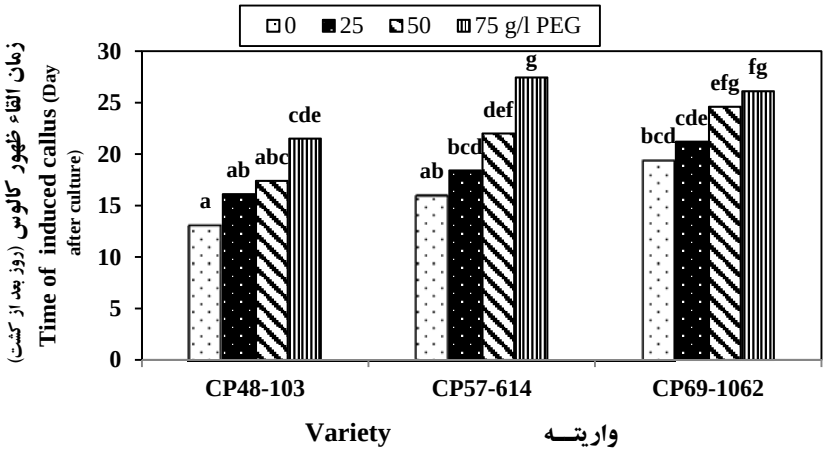
جدول ۱. تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی و نموی صفات اندازه‌گیری شده (میانگین مربعات)

Table 1. Analysis of variance of growth and development index of measured traits (mean square)

			Mean squares		میانگین مربعات	
Source of variation	منابع تغییر	درجه آزادی df	زمان القاء ظهور گیاهک (روز) Shoot initiation induction time (day)	درصد کالوس باززا Callus regeneration percentage	درصد کالوس‌زایی Callogenesis percentage	زمان القاء ظهور کالوس (روز) Callus emergence induction time (day)
Variety (V)	واریته	2	2.12**	31.39**	23.37*	2.48*
Erorr a	خطای a	27	0.29	0.73	1.95	0.11
Stress (S)	تنش	3	0.45*	9.12*	4.19**	2.20*
Erorr b	خطای b	81	0.37	7.78	0.95	1.16
V × S	واریته × تنش	6	0.42*	40.58*	2.15ns	1.28ns
CV (%) V	ضریب تغییرات V		*6.09*	*4.65*	*8.30*	*6.54*
CV (%) S	ضریب تغییرات S		*5.71*	*7.01*	*6.02*	*4.34*

** ، * و ns به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ ٪ و ۵ ٪ آماری و اختلاف غیرمعنی‌دار

*, ** Significantly different at a=0.05 and a=0.01 probability levels, respectively; ns: non-significant



شکل ۱. تأثیر سطوح مختلف تیمار PEG بر روی زمان القاء ظهور کالوس

Fig. 1. The effect of different levels of PEG on the time of callus emergence induction

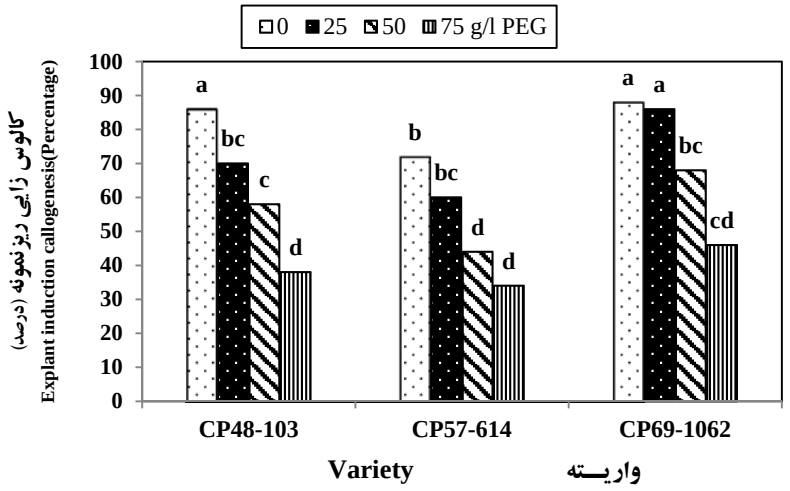
درصد کالوس‌زایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد شاخص کالوس‌زایی در تیمارهای آزمایشی، تحت تأثیر تنش خشکی قرارگرفته است و در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار گردید. بین سطوح مختلف تنش خشکی در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشته ولی اثر متقابل معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی وجود نداشت (جدول۱). در مطالعه حاضر، افزایش تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار درصد کالوس‌زایی گردید به‌طوری‌که در تیمارهای تحت تنش خشکی درصد کالوس‌زایی به‌طور میانگین ۳۱٫۷۱٪ کمتر از تیمار شاهد بوده است. در بین واریته‌های موردمطالعه، CP69-1062 با میانگین ۶۶٫۶۷٪ بیشترین و CP57-614 با میانگین ۴۶٪ کمترین درصد کالوس‌زایی را نشان دادند (شکل۲).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد ریزنمونه‌ها بر اساس غلظت PEG در محیط کشت، کالوس‌های مختلفی تولید کردند. در تیمار شاهد تقریباً تمام ریزنمونه‌ها کالوس تولید کردند به‌طوری‌که واریته CP69-1062 با ۸۸٪ بیشترین و در سطح (۷/۵٪ PEG)، CP57-614 با ۳۴٪ کمترین کالوس-زایی را نشان دادند (شکل ۲). قبلاً نیز بگوم و همکاران (Begum et al., 2011) نشان دادند با افزایش سطح PEG، درصد تولید کالوس به‌طور معنی‌داری کاهش‌یافته است به‌طوری‌که در تیمار شاهد ۹۹٪ ریزنمونه‌ها و در سطح ۱۰٪ PEG، فقط ۱۰٪ ریزنمونه‌ها کالوس تولید کردند. تأثیرپذیری واریته CP57-614 در سطوح بالای تنش خشکی نسبت به دو واریته دیگر نشان می‌دهد فعالیت حیاتی این واریته در تنش خشکی با آسیب بیشتر و واریته CP48-103 با آسیب کمتری نسبت به دو واریته دیگر همراه است و به نظر می‌رسد در شرایط مزرعه نیز بتواند واکنش مشابهی را نشان دهند.



شکل ۲. تأثیر سطوح مختلف PEG بر روی درصد کالوس‌زایی

Fig. 2. The effect of different levels of PEG on callogenesis percentage

درصد کالوس باززا

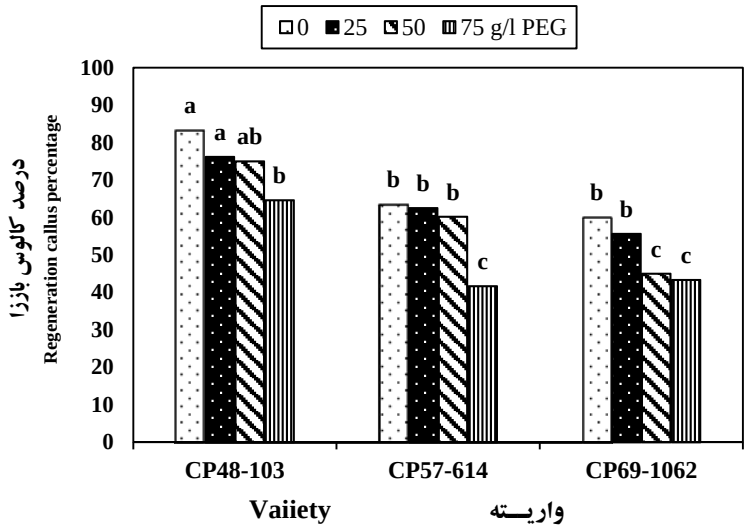
شاخص کالوس باززا در تیمارهای آزمایشی و همچنین بین سطوح مختلف خشکی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود ولی اثر متقابل معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (جدول ۱). در مطالعه حاضر، افزایش شدت تنش خشکی باعث کاهش میزان کالوس‌های باززا گردید به‌طوری‌که در تیمارهای تحت تنش خشکی درصد کالوس باززا به‌طور میانگین ۱۳/۵۳٪ کمتر از تیمار شاهد بوده است. در بین واریته‌های موردمطالعه CP48-103 با ۷۱/۹۲ ٪ بیشترین و CP69-1062 با ۴۷/۹۹ ٪ کمترین میزان کالوس باززا را نشان دادند(شکل ۳).

زمان القاء ظهور گیاهک

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده شاخص زمان القاء ظهور گیاهک در تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر تنش خشکی قرارگرفته است و در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار گردید (جدول ۱). بین سطوح تنش خشکی در سطح احتمال ۵٪ و بین تیمارهای آزمایشی اثر متقابل در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار گردید به‌طوری‌که در تیمارهای تحت تنش خشکی زمان القاء ظهور گیاهک به‌طور میانگین ۴۳/۲۱٪ بیشتر از تیمار شاهد بوده است. کمترین و بیشترین زمان القاء به ترتیب ۱۴/۴ روز در CP57-614 و ۴۸ روز در CP69-1062 مشاهده شد (شکل ۴).

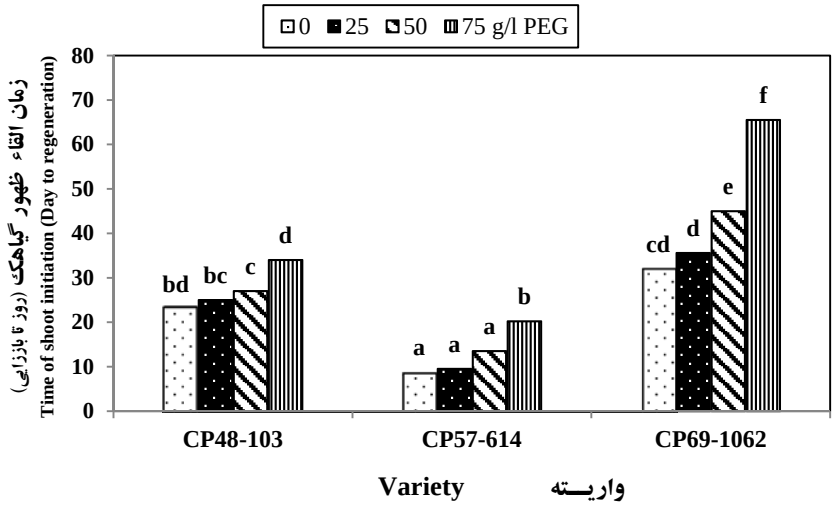
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. تأثیر سطوح مختلف PEG بر روی درصد کالوس باززا

Fig. 3. The effect of different levels of PEG on percentage of regenerated callus



شکل ۴. تأثیر سطوح مختلف PEG بر روی زمان القاء ظهور گیاهک

Fig. 4. The effect of different levels of PEG on plantlet initiation induction time

بهینه‌سازی محیط باززایی کالوس

نتایج آزمایش محیط‌های مختلف باززایی کالوس برای سه واریته تجاری مطالعه نشان داد که نوع محیط تأثیر زیادی بر وضعیت باززایی کالوس هر واریته داشته است. در واریته CP48-103 تیمار (Kin=0.5 mg L^{-1} و BAP=0.5 mg L^{-1}) با میانگین ۷۰٪، در واریته CP57-614 تیمار Kin=3 mg L^{-1} و NAA=0.5 mg L^{-1}) با میانگین ۶۰٪ و در واریته CP69-1062، تیمار (Kin =3 mg L^{-1} و NAA=0.1 mg L^{-1}) با میانگین ۵۰٪ بالاترین درصد باززایی را به همراه داشت.

پس از باززا شدن کالوس‌ها و انتقال گیاهک‌ها به محیط شاخه‌زایی، از رقم CP48-103 از سطح شاهد ۵ واریانت، از سطح T1، ۶ واریانت، از سطح T2، ۱۷ واریانت و از سطح T3، ۲ واریانت به دست آمد. در رقم CP57-614 از سطح شاهد، ۱ واریانت، از سطح T1، ۱۰ واریانت و از سطح T2، ۷ واریانت و از سطح T3، ۴ واریانت به دست آمد که ۲ واریانت تولیدی از سطح T3 حالت آلبنیسم داشتند و ۲ واریانت دیگر خیلی ضعیف بودند. در رقم CP69-1062 از سطح شاهد ۳ واریانت، از سطح T1، ۳ واریانت، از سطح

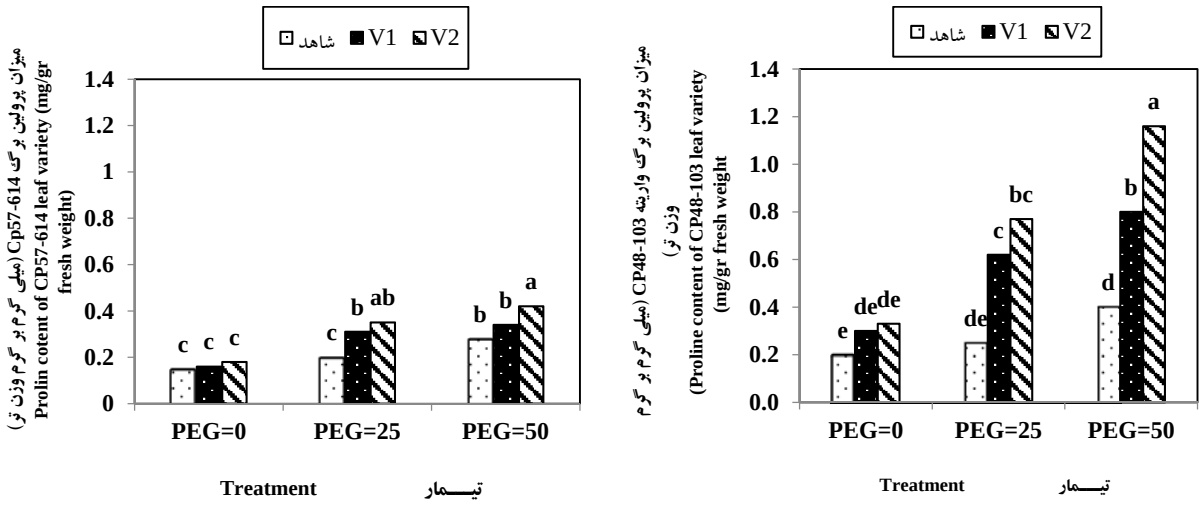
www.SID.ir

Archive of SID

T2، ۲ واریانت و از سطح T3، ۱ واریانت به دست آمد که غیر از واریانت‌های تولید شاهد بقیه خیلی ضعیف بوده و حالت باریک و علفی داشتند. واریانت‌های به‌دست‌آمده از سطح ۲۵ گرم در لیتر V1 و واریانت‌های به‌دست‌آمده از سطح ۵۰ گرم در لیتر V2 نامیده شدند.

میزان تجمع پرولین در گیاهچه‌های تحت تنش

با توجه به ضعیف بودن واریانت‌های به‌دست‌آمده از رقم CP69-1062، بررسی میزان تجمع پرولین در دو قم CP48-103 و CP57-614 انجام شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که شاخص میزان تجمع پرولین در گیاهچه‌های تیمارهای آزمایشی، در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار گردید و واریانت‌های به‌دست‌آمده مقادیر متفاوتی از پرولین تولید و ذخیره کردند. در هر دو واریته موردمطالعه روند میزان تجمع پرولین با افزایش سطح تنش خشکی افزایشی است (جدول ۲).



شکل ۵. تأثیر سطوح مختلف PEG بر روی محتوای پرولین گیاهچه‌های باززا شده

Fig. 5. The effect of different levels of PEG on proline content of regenerated plantlets

جدول ۲ . تجزیه واریانس میزان پرولین برگ گیاهچه‌های باززا شده (میانگین مربعات)

Table 2. Analysis of variance for leaf proline content of regenerated plantlets (Mean squares)

Source of variation	منابع تغییر	درجه آزادی df	CP48-103	CP57-614
Variety (V)	واریته	2	41.36*	34.08*
Erorr a	خطای a	27	0.11	0.09
Stress (S)	تنش	2	9.77*	11.29*
Erorr b	خطای b	54	0.16	0.24
V × S	واریته × تنش	4	1.52 ns	1.28 ns
CV (%) V	ضریب تغییرات V		*3.56*	*4.29*
CV (%) S	ضریب تغییرات S		*4.41*	*3.07*

در واریانت‌های به‌دست‌آمده از واریته CP48-103 نسبت به واریانت‌های به‌دست‌آمده از واریته CP57-614 این روند، شیب بیشتر و مقدار پرولین بیشتری در هر سطح تجمع یافته است. به‌طور میانگین میزان تجمع پرولین در واریانت‌های واریته CP48-103 دو برابر واریانت‌های واریته CP57-614 در تمام سطوح تنش خشکی بود (۰/۵۴ میلی-

www.SID.ir

Archive of SID

گرم در مقابل ۰/۲۷ میلی‌گرم در گرم ماده تر). بیشترین میزان تجمع پرولین به میزان ۱/۱۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر در واریانت V2 واریته CP48-103 در سطح ۵۰ گرم در لیتر PEG مشاهده شد و کمترین میزان آن مربوط به واریته CP57-614 (شاهد) و در شرایط بدون تنش به میزان ۰/۱۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود (شکل ۵). با بررسی اثر تنش شوری در شرایط کشت درون شیشه‌ای بر نیشکر مشاهده شد در محیط غیرشور پرولین در پایین‌ترین مقدار قرار داشته و با افزایش کمترین نمک به محیط، تولید و انتقال آن به بخش‌های هوایی گیاهچه‌ها افزایش می‌یابد تا جایی که در رقم مادری (شاهد) ۳/۵ برابر و در سوماکلون ۲ برابر افزایش مشاهده شده است (Shomeili, 2011). عکس‌العمل کالوس‌های حاصل از نیشکر در محیط کشت حاوی عامل تنش‌زای خشکی بیانگر افزایش محتوی پرولین کالوس است (Erabii et al., 2006). به نظر می‌رسد گیاهان در هنگام تنش خشکی با تغییراتی که در برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی خود ایجاد می‌نمایند، به تنش‌های مختلف پاسخ می‌دهند که یکی از این پاسخ‌ها تجمع پرولین است.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به اینکه در نیشکر گیاهان باززایی شده از کشت سلولی و بافت کالوس حساس به تنوعات بدنی یا سوماکلونی گزارش‌شده‌اند (Lakshmanan et al., 2006)، لذا گیاهانی که از بافت کالوس باززایی می‌شوند مستعد تولید واریانت‌های سوماکلونی برای صفاتی مختلف همچون عملکرد ساقه و قند بالا، مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشند (Chengalrayan and Gallo-Meagher., 2001). ازاین‌رو در تحقیق حاضر نیز مقایسه واریانت‌ها یا گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کالوس‌های باززایی شده ژنوتیپ‌های موردبررسی انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد تمامی شاخص‌های کمی موردمطالعه در واریته‌های موردمطالعه تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفتند. زمان القاء ظهور کالوس و درصد کالوس‌زایی به‌طور میانگین به ترتیب ۳۳/۸ درصد بیشتر از تیمار شاهد و ۳۱/۷۱ درصد کمتر از تیمار شاهد بود. درصد کالوس باززا نیز به‌طور میانگین ۱۳/۵۳ درصد کمتر از تیمار شاهد و زمان القاء ظهور گیاهک به‌طور میانگین ۴۳/۲۱ درصد بیشتر از تیمار شاهد به دست آمد. بررسی تغییرات تجمع پرولین گویای آن بود که این شاخص به مقدار زیادی متأثر از ژنوتیپ بوده به‌طوری‌که در واریته CP48-103 در تمامی سطوح تنش خشکی مقدار بیشتری پرولین نسبت به واریته CP57-614 تولید شد. با این تفاوت که در محیط بدون تنش کالوس‌های مادری CP48-103 نسبت به CP57-614 ۳۳/۳ درصد پرولین بیشتری داشتند ولی با اعمال تنش خشکی و در بالاترین سطح تنش موردبررسی در این مرحله این تفاوت به بیش از ۱۲۵ درصد افزایش یافت. به‌طورکلی واریانت‌های به‌دست‌آمده از سطح تنش خشکی ۵۰ گرم در لیتر PEG (V2) در دو واریته CP48-103 و CP57-614 میزان تجمع‌پذیری پرولین بیشتری را نسبت به واریانت‌های به‌دست‌آمده از سطح تنش خشکی ۲۵ گرم در لیتر PEG (V1) داشتند. علی‌رغم اینکه در این مطالعه کالوس واریته CP48-103 حساسیت بیشتری را نسبت به تنش خشکی در قیاس با سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد اما در بین واریته‌های موردمطالعه CP48-103 با ۷۱/۹۲٪ بیشترین میزان کالوس باززا و همچنین بهترین درجه القاء ظهور کالوس را با ۱۸/۳ روز نشان داد. علاوه بر این با افزایش سطح تنش خشکی واریته CP48-103 نسبت به دو واریته دیگر سرعت رشد نسبی بیشتری داشته است و واریانت‌های به‌دست‌آمده از آن با تولید مقادیر بیشتری پرولین، مکانیسم‌های تحمل به خشکی خود را تقویت نموده و این احتمال می‌رود که بتوانند نسبت به واریته مادری خود که حساسیت بالایی به تنش خشکی نشان داده است شرایط محیطی مزرعه را بهتر تحمل نمایند و به‌شرط حفظ سایر شرایط زراعی خوب واریته‌CP48-103، به‌عنوان ژنوتیپ‌های جدید معرفی گردند.

قدردانی

از مدیریت و سرپرست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی اصفهان آقایان دکتر اطرشی و مهندس مختاری، مدیریت و همکاران محترم تحقیقات کشاورزی شرکت کشت و صنعت کارون آقایان مهندس نیکفر، مهندس نوری و مهندس امام و سرکار خانم مهندس چعبیان که در اجرای این طرح همکاری داشتند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Bates, S., Waldern, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207.

Begum, M.K., Islam, M.O., Miah, M.A.S., Hossain, M.A., Islam, N., 2011. Production of somaclone in vitro for drought stress tolerant plantlet selection in sugarcane (*Saccharumofficinarum* L.). The Agriculturists Journal. 9, 18-28.

Chaghakaboodi, Z., Zebarjadi, A.R., Kahrizi., 2012. Evaluation of rapeseed genotypes response to drought stress via callus culture. Agricultural Biotechnology. 10(2), 49-57. [In Persian with English Summary].

Chengalrayan, K., Gallo-Meagher, M., 2001. Effect of various growth regulator on shoot regeneration of sugarcane. In Vitro Cell. Developmental Biologiy -Plant. 37, 434-439.

Dias, B.B.A., Souto, B.M., Leao, A.P., Cago, B.N., Molinaria, H.B.C., 2011. Differentially expressed gene in drought stressed sugarcane. Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GENÉTICA MOLECULAR DE PLANTAS, 3. Ilhéus. Resumos. Ribeirão Preto: SBG.

Errabii, T., Gandonou, C.h.B., Essalmani, H., Abrini, J., Idaomar, M., Skali-Senhaji, N., 2006. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. African Journal of Biotechnology. 5(16), 1488- 1493.

Fajrya, N.K., Balygar, V.S., Jones, H.A., 1999. The growth and Nutrition of Crop Plants. Translated by G. Fathi, Mashhad. Mashhad University Jihad Press, 372 p. [In Persian].

Islam, M.W., Miah, M.A.S., Pramanik, M.H.R., Hossain, M.A., Begum, M.K., Islam, M.S., 2010. In vitro selection of somaclones of Sugarcane under drought stress condition and their evaluation field condition. Pakistan Sugar Journal. 25(4), 11-24.

Kumlay, A.M., Ercisli, S., 2015. Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment. 29(6), 1075-1084.

Lakshmanan, P., Geijskes, R.J., Wang, L., Elliott, A., Grof, C.P.L., Berding, N., Smith, R., 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. Plant Cell Reports. 25, 1007–1015.

Rabiei, K., Khodambashi, M., Omidi, M., 2011. Advantage of Somaclonal Variation in Carrot (*Daucus carota* L.) in Order to Production Drought Resistant varieties. Journal of Horticultural Science (Agricultural Science and Technology). 25(2), 156-169. [In Persian with English Summary].

Ramazani, M.H., 1999. Deficit Irrigation and Drought Stress Effects on three Varieties of Sugarcane. MSc dissertation, Gilan, Faculty of Agriculture, University of Gilan, Iran. 160 p. [In Persian with English summary].

Ramshini, H.E., Peyghambari, S.E., Shahnejat boushahri, E.A., Omidi, M., Newman, K., Shvaryzr, P., 2009. Screening of Barley Seedlings tolerant to Drought Stress. Iranian Crop Researches Journal. 7(2), 440-431. [In Persian with English Summary].

Rao, S., Jabeen, F.T.Z., 2013. In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantles from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants. 19(2), 261-268.

Shomeilil, M., 2011. Evaluation of Salt Tolerance cane germination and early growth using somaclonal variation, Ph.D. Thesis in the field of Crop Physiology, Faculty of Agriculture, University of Shahid Chamran, Ahwaz, Iran.163 p. [In Persian with English Summary].

www.SID.ir