جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره پنجم، ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی نیشکر واریته CP73-21

شهاب سادات[۱]، محمدرضا بی‌همتا[۲] و سید احسان امام[۳*]
[۱]کارشناس‌ارشد حوزه تحقیقات کشاورزی کشت و صنعت کارون، [۲]استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تهران،
[۳]کارشناس حوزه تحقیقات کشاورزی کشت و صنعت کارون

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۱۰

چکیده

در این بررسی، جهت سترون‌سازی برگ‌های اولیه نیشکر (*Saccharum officinarum*) واریته CP73-21، ۵ تیمار در یک طرح کاملاً تصادفی با ٦ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تیمار هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه همراه با کلرورجیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه، بهترین نتایج را در سترون‌سازی برگ‌های اولیه به همراه داشت. ٦ تیمار کالوس‌زایی در یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با ٤ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. محیط MS [۱] پایه که با 2,4-D [۲] به‌میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP [۳] به‌مقدار ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر تکمیل شده بود، به‌ترتیب، بهترین نتایج را در القای کالوس از برگ‌های اولیه دارا بودند. باززایی کالوس‌ها در پنج تیمار در یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بررسی گردید. محیط MS تغییر یافته (حاوی کازئین هیدرولیزات[٤]) فاقد هورمون و نیز محیط MS تغییر یافته همراه با BAP به‌میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA [٥] به‌مقدار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین تاثیر را در باززایی به همراه داشتند. ریشه‌زایی نوشاخه‌ها، در پنج تیمار در یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار ارزیابی شد. محیط MS با ۱/۲ نیترات که با IBA [٦] به‌میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر تکمیل شده بود، به‌عنوان بهترین تیمار ریشه‌زایی پیشنهاد گردید. گیاهک‌های باززایی شده مراحل مختلف سازگاری را با موفقیت سپری کردند.

واژه‌های کلیدی: *Saccharum officinarum*، برگ اولیه، باززایی کالوس، ریشه‌زایی، سازگاری

*- مسئول مکاتبه: shahab-302004@yahoo.com

1- Murashig & Skoog
2- 2,4-dichlorophenoxy acetic acid
3- 6-benzylamino purine
4- Casein hydrolyzate
5- Naphthalene acetic acid
6- Indole-3-butyric acid

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

نیشکر (*Saccharum* sp.) منبع تولید ٦٠ درصد شکرجهان است. اهمیت نیشکر در سال‌های اخیر به‌دلیل استفاده در صنعت شکر و صنایع جانبی آن نظیر تولید الکل، اسید استیک، بوتانول، کاغذ، تخته‌های چند لا، آنزیم‌های صنعتی و نیز به‌عنوان یک منبع غذایی با ارزش برای دام رو به افزایش است (دسایی و همکاران، ٢٠٠٤). با توجه به اهمیت این گیاه در صنعت کشاورزی، کوشش زیادی جهت بهبود صفات این گیاه صورت گرفته است. لکن مشکلات اساسی در بهبود صفات آن از طریق هیبریداسیون وجود دارد (مقبول و اختر، ٢٠٠٠). روش‌های اصلاحی متداول و برنامه‌های گزینش، جهت معرفی یک واریته به زمانی معادل ١٠ تا ١٥ سال نیاز دارند که به‌دلیل پیچیدگی ژنتیکی بیشتر این گیاه در مقایسه با گیاهان با ژنوم کوچک‌تر است، از طرفی دیگر، به‌علت فراهم نبودن شرایط اقلیمی مناسب در مناطق نیشکرخیز ایران (طول مدت روشنایی، درجه حرارت و مقدار رطوبت نسبی) گلدهی نیشکر نیاز به شرایط کنترل شده گلخانه داشته که می‌تواند زمان لازم برای یک برنامه اصلاحی را افزایش دهد. به این علت واریته‌های تجاری نیشکر در خوزستان پس از سال‌ها کشت هنوز جایگزینی بهتر از خود نیافته‌اند. کشت بافت گیاهی نقش اساسی در بهبود ژنتیکی گیاهانی نظیر نیشکر دارد که به روش غیرجنسی تکثیر می‌یابند (لیو و چن، ١٩٨٤؛ کریشنامورتی، ١٩٨٦؛ سدیکوی و همکاران، ١٩٩٤). گیاهان باززایی شده از کالوس و کشت‌های سلولی، حساس به تنوعات سوماکلونی هستند (فارسی و ذوالعلا، ٢٠٠٣؛ سیلوارولا ١٩٩٢؛ داماسکو و همکاران، ١٩٩٦). زیرا این تنوعات، مسیر طبیعی را برای رشد، توسط مریستم‌های بعدی دنبال نمی‌کنند (برنر و گریشام، ١٩٩٥). گیاهانی که از کالوس باززایی می‌شوند، مستعد تولید واریانت‌های سوماکلونی برای صفات مختلفی نظیر عملکرد بالا، مقاومت به بیماری، بردباری به خشکی، جبران قند از دست رفته پس از خسارت، زودرسی و غیره هستند (نیاز و کورایشی، ٢٠٠٢). تولید کالوس از ارقام مختلف نیشکر و باززایی آن جهت ایجاد تنوع سوماکلونی، توسط متخصصین کشت بافت مورد توجه قرار گرفته است. کریم و همکاران (٢٠٠٢) تیمارهای مطلوب کالوس‌زایی و باززایی را در دو واریته نیشکر lsd-28 و lsd-16 معرفی نمودند. گاندانو و همکاران (٢٠٠٥) نیز موفق به تولید کالوس از ٨ واریته مختلف نیشکر (CP59-73، CP57-614، CP63-588، CP80-314، SP71-1081، L62-96، F160 و CP70-321) گردیده و سپس اقدام به باززایی کالوس‌های حاصله نمودند. بر این اساس، در این تحقیق سعی بر آن است تا تیمارهای سترون‌سازی، کالوس‌زایی، شاخه‌زایی و ریشه‌زایی مناسب در واریته CP73-21 که یکی از ارقام تجاری ایران است معرفی گردند. لذا دیگر محققان می‌توانند بدون صرف مدت زمانی (٣ الی ٦ ماه) که جهت دست‌یابی به تیمارهای مذکور به طول می‌انجامد، با در اختیار داشتن این تیمارها از این واریته، واریانت‌هایی با صفات متنوع تولید و در پایان، گزینش[1] برای صفات مطلوب در مزرعه انجام گیرد.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های نیشکر واریته CP73-21 از مزرعه تهیه و به آزمایشگاه انتقال یافتند. قطعات ٥ سانتی‌متری حاوی جوانه انتهایی، جداسازی شده، و برس‌کشی با مایع صابونی و قرار گرفتن در زیر آب جاری به‌مدت نیم ساعت انجام شد. ٥ تیمار سترون‌سازی در زیر هود مورد استفاده قرار گرفت. هیپوکلریت سدیم ٢٥ درصد به‌مدت ١٠ دقیقه در تمامی تیمارهای سترون‌سازی به‌صورت ثابت و کلرور جیوه ٠/١ درصد به مدت ١٥ ثانیه برای تیمار ١، ٢٠ ثانیه برای تیمار ٢، ٢٥ ثانیه برای تیمار ٣، ٣٠ ثانیه برای تیمار٤ و ٣٥ ثانیه برای تیمار ٥، مورد استفاده قرار گرفتند. تیمار با هیپوکلریت سدیم ٢٥ درصد، برروی قطعات حاوی جوانه انتهایی انجام شد در حالی‌که تیمار با

1- Selection

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کلرور جیوه ۰/۱ درصد پس از جداسازی برگ‌های اولیه اطراف مریستم صورت گرفت. استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد جهت سترون‌سازی سطحی اکثر گونه‌های گیاهی به‌عنوان یکی از مواد سترون‌کننده موثر، توسط فارسی و ذوالعلا (۲۰۰۳) پیشنهاد شده است. در این تحقیق، جهت تاثیر بیشتر هیپوکلریت سدیم بر قسمت‌های بیرونی‌تر قطعات ساقه که دارای آلودگی (بیشتر قارچی) بیشتری بودند، غلظت این محلول، ۲۵ درصد و زمان لازم جهت غوطه‌وری، ۱۰ دقیقه انتخاب گردید. در استفاده از کلرور جیوه ۰/۱ درصد و در دامنه زمانی ۱۵ تا ۳۵ ثانیه، احسان پور و امینی (۲۰۰۳) استفاده از این ماده را در غلظت‌های ۰/۱ درصد تا ۱ درصد به‌مدت ۲ تا ۱۰ دقیقه با توجه به نوع بافت گیاهی، جهت سترون‌سازی مفید می‌دانند. در نظر گرفتن مدت زمان پایین‌تر از مقدار پیشنهادی، به‌علت حساسیت بالای ریزنمونه‌ها (برگ‌های اولیه)، به ماده سمی کلرور جیوه است. تیمارهای سترون‌سازی در ٦ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. هر تکرار عبارت از یک پتری محتوی محیط کشت MS پایه (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹٦۲) بود که در آن ۱۰ عدد ریزنمونه (برگ اولیه) قرار داشت. ۱۰ روز بعد، تعداد ریزنمونه‌های سترون‌شده در هر پتری شمارش و تجزیه واریانس داده‌ها، جهت بررسی اثرات تیمارهای سترون‌سازی انجام گرفت. ریز نمونه‌های سترون‌شده به محیط‌های کشت کالوس‌زایی انتقال یافتند. ٦ تیمار کالوس‌زایی در یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با ٤ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. 2,4-D در دو سطح (۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و BAP در۳ سطح (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط MS پایه ، تیمارهای کالوس‌زایی را تشکیل دادند. کاربرد اکسین 2,4-D به‌میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر در محیط MS پایه جهت کالوس‌زایی برگ‌های اولیه، پیش‌تر توسط کریم و همکاران (۲۰۰۲) بر روی دو واریته lsd-16 و lsd-28 و نیاز و کورایشی (۲۰۰۲) بر روی دو واریته CPF-237 و SPF-213 انجام گرفته است. به‌علت نرم و آبدار بودن کالوس‌های به‌دست آمده در این تحقیق با استفاده از 2,4-D به‌میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر و متلاشی‌شدن آنها در هنگام انتقال به محیط‌های کشت باززایی، از یک سیتوکینین (BAP) نیز در کنار 2,4-D استفاده گردید. انتخاب یک سیتوکینین در مقادیر اندک در کنار اکسین می‌تواند اثر زیاد اکسین (افزایش حجم واکوئول در سلول‌های پارانشیمی کالوس) را تعدیل نماید (فارسی و ذوالعلا، ۲۰۰۳). هر تکرار شامل یک پتری (محتوی تیمار کالوس‌زایی) بود که در آن ۱۰ عدد ریزنمونه قرار داشت. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت کالوس‌زایی، پتری‌ها در محدودهٔ دمایی ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد به تاریکی انتقال یافتند. سه هفته بعد، تعداد کالوس‌ها در هر پتری شمارش گردیده و داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. دست‌یابی به مقادیر کافی از کالوس، با واکشت کالوس‌ها به بهترین محیط‌های کشت کالوس‌زایی صورت گرفت. جهت باززایی کالوس‌ها، ۵ تیمار در یک طرح کاملاً تصادفی در ٤ تکرار بررسی شد. محیط MS تغییر یافته که شامل محیط MS ساده به همراه ٦۰ گرم در لیتر ساکارز و ۵۰۰ میلی‌گرم کازئین هیدرولیزات بود، به‌عنوان محیط پایه انتخاب گردید. انتخاب این محیط کشت، به‌عنوان یک منبع غذایی پیچیده، جهت باززایی کالوس در گونه‌های مختلف نیشکر موثر شناخته شده است (آفتاب و همکاران، ۱۹۹٦؛ گاندانو و همکاران، ۲۰۰۵). این تیمارها عبارت بودند از ۱- محیط MS تغییر یافته، ۲- محیط MS تغییر یافته حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳- محیط MS تغییر یافته حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin[1]، ٤- محیط MS تغییر یافته حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۵- محیط MS تغییر یافته حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA. علت استفاده از BAP در مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA به‌میزان ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر، معرفی این ترکیب به‌عنوان یک ترکیب ایده‌آل در محیط MS تغییر یافته جهت باززایی در دو واریته

1-Kinetin

نیشکر lsd-16 و lsd-28، توسط کریم و همکاران (۲۰۰۲) است. لکن به‌علت متفاوت‌بودن واریته‌های استفاده شده در این تحقیق سعی گردید تا تاثیر سیتوکینین متداول دیگر در کشت بافت (Kin)، نیز با همان غلظت پیشنهادی BAP مورد بررسی قرار گیرد. در کنار تلفیق سیتوکینین‌های مذکور با NAA، اثرات استفاده از آنها به‌طور مجزا نیز در غلظت پیشنهادی این محققان، مورد بررسی قرار گرفت. هر تکرار، شامل یک ردیف ۱۰ تایی از لوله‌های کشت (۱۰ سانتی‌متر طول و ۲ سانتی‌متر قطر) بوده و در هر کدام یک کالوس قرار گرفت. کالوس‌های کشت شده به اتاق رشد با فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محدودهٔ دمایی ۲ ±۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. واکشت کالوس‌ها هر ۳ هفته یک‌بار روی محیط مشابه انجام گرفت. پس از ۵ هفته، اولین نوشاخه‌ها ظاهر شدند. دو هفته بعد، تعداد کالوس‌های باززایی شده برای هر تیمار شمارش، و داده‌های حاصل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نوشاخه‌های به‌طول تقریبی ۱۰ سانتی‌متر به محیط‌های کشت ریشه‌زایی انتقال یافتند. ۵ تیمار ریشه‌زایی در یک طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار تهیه گردید. محیط MS با نصف غلظت نیترات به‌عنوان محیط پایه برای تیمارهای ریشه‌زایی در نظر گرفته شد. تیمارهای ریشه‌زایی به‌ترتیب ذیل بودند: **۱**- محیط MS با ۱/۲ نیترات، **۲**- محیط MS با ۱/۲ نیترات به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA، **۳**- محیط MS با ۱/۲ نیترات به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، **٤**- محیط MS با ۱/۲ نیترات به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و **۵**- محیط MS با ۱/۲ نیترات به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA. علت استفاده ازنیترات به‌میزان نصف، آن است که کاهش غلظت مواد معدنی در محیط MS به این میزان به‌عنوان محیط پایه برای ریشه‌زایی اکثر گونه‌های گیاهی مفید می‌باشد (پیریک، ۱۹۹۷). همچنین، محیط MS با ۱/۲ نیترات به‌عنوان محیط کشت فاقد هر گونه تنظیم‌کننده رشد گیاهی، جهت ریشه‌زایی در اکثر گونه‌های نیشکر، توسط لال و سینگ (۱۹۹٤) پیشنهاد گردیده است. استفاده از IBA بدون تلفیق با اکسین یا سیتوکینین دیگر، پیش‌تر توسط گالومیگر[٤] و همکاران (۲۰۰۰) در ریشه‌زایی واریته CP48-1198 گزارش شده است. لکن در این تحقیق سعی گردید تا اثرات استفاده از دیگر اکسین متداول در کشت بافت (NAA) نیز بدون تلفیق با هورمون دیگر، بر ریشه‌زایی نوشاخه‌های حاصله بررسی گردد. هر تکرار، شامل یک ردیف ۱۰ تایی از لوله‌های کشت (۲ ×۱۰ سانتی‌متر) بود و در هر لوله کشت، یک نوشاخه قرار گرفت. محیط‌های کشت ریشه‌زایی به اتاق رشد با فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محدوده دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از سه هفته، تعداد نوشاخه‌های ریشه‌دار (ریشه‌های توسعه‌یافته و دارای تارهای کشندهٔ کافی) برای هر تیمار شمارش و تجزیه واریانس داده‌ها، جهت بررسی اثرات تیمارها به انجام رسید. گیاهک‌های به‌دست آمده از لوله‌های 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 سرپوش‌های پلاستیکی برای گلدان‌ها به‌مدت یک هفته، و نگهداری در گلخانه به‌مدت یک ماه بود، گیاهک‌های سازگار به مزرعه انتقال یافتند.

نتایج

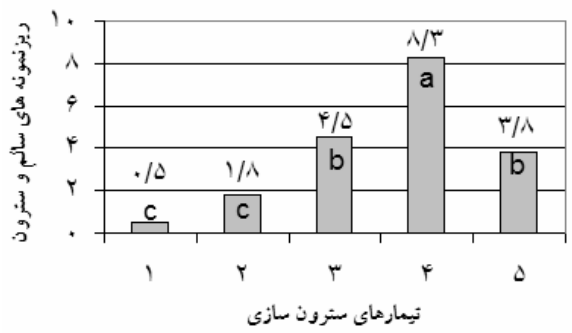
جدول ۱، نتایج تجزیه واریانس داده‌های تبدیل شده (تبدیل جذری) را برای تیمارهای مختلف سترون‌سازی، کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی واریته CP73-21 نشان می‌دهد. این نتایج برای تیمارهای سترون‌سازی، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار این تیمارها در سطح α=۰/۰۱ بود. نتایج آزمون دانکن (شکل ۱) نشان داد که تیمار ٤ شامل هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه همراه با کلرور جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه، با میانگین ۸/۳ ریزنمونه سترون، بهترین نتایج را در سترون‌سازی برگ‌های اولیه داراست. نتایج حاصل از

تجزیه واریانس تیمارهای مختلف کالوس‌زایی نیز نشان داد که اثرات متقابل مقادیر مختلف اکسین و سیتوکینین به‌کار رفته، بر کالوس‌زایی واریته CP73-21، در سطح α=۰/۰۱ معنی‌دار است. آزمون دانکن (شکل ۲) جهت تعیین بهترین مقادیر استفاده شده در این تلفیق هورمونی، نشان داد که تیمار a۲b۱ شامل محیط MS پایه به‌همراه 2,4-D به‌میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP به‌مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و نیز a۲b۲ شامل 2,4-D به‌مقدار ۳ میلی‌گرم در لیتر به‌همراه BAP به‌مقدار ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر بهترین نتایج را در کالوس‌زایی برگ‌های اولیه به‌همراه داشتند. این تیمارها به‌ترتیب دارای میانگین ۸/۵ و ۸ کالوس از ۱۰ ریزنمونه اولیه بودند. تکثیر و ازدیاد کالوس‌ها نیز در محیط MS پایه که با 2,4-D به‌مقدار ۳ میلی‌گرم در لیتر و BAP به‌مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، تکمیل شده بود انجام شد. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف باززایی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح α=۰/۰۱ بود. نتایج آزمون دانکن (شکل۳) نشان داد که تیمار۱ شامل محیط MS تغییر یافته (۶۰ گرم در لیتر ساکارز و ۵۰۰ میلی‌گرم کازئین هیدرولیزات) و نیز تیمار ٤ شامل محیط MS تغییر یافته که با BAP به‌میزان ۱ میلی‌گرم در لیتر و NAA به‌مقدار ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تکمیل شده بود، به‌عنوان بهترین تیمارهای باززایی از کالوس‌های موجود می‌باشند. این تیمارها به‌ترتیب دارای میانگین ۸/۷ و۸/۵ کالوس باززایی شده بودند. نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف ریشه‌زایی، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح α=۰/۰۱ بود. نتایج آزمون دانکن (شکل ٤) تیمار ۲ را شامل محیط MS با ۱/۲ نیترات به‌همراه IBA به‌میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، با میانگین ۹/۳ نوشاخه ریشه‌دار به‌عنوان بهترین تیمار ریشه‌زایی معرفی نمود. ۹٦ درصد گیاهک‌های انتقال یافته به خاک، مراحل مختلف سازگاری را با موفقیت پشت سر گذاشتند. شکل ۵ الف تا ج مراحل کالوس‌زایی، باززایی، ریشه‌زایی و انتقال گیاهک‌ها به خاک در مرحله سازگاری را نشان می‌دهند.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف سترون‌سازی، کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی واریته CP73-21.

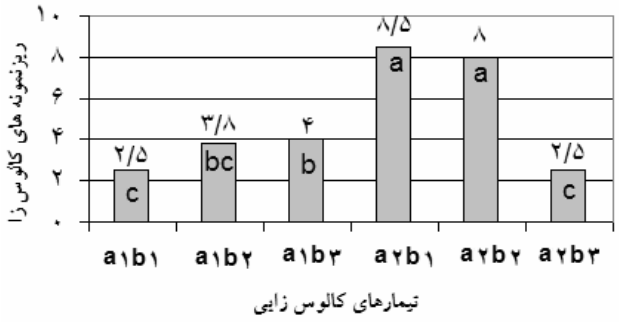
تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
سترون‌سازی	٤	۳/٤۹	۳۰/۸٤**
کالوس‌زایی	۵	۱/۵۱	۲۲/۰۳**
عامل A (2,4-D)	۱	۲/٤	۳۵/۰۸**
عامل B (BAP)	۲	۰/۸	۱۱/۷٤**
اثرمتقابل AB	۲	۱/۷۷	۲۵/۸**
شاخه‌زایی	٤	۲/۳٦	۱۵/۵۷**
ریشه‌زایی	٤	۱/۸٦	۱٦/۲٤**

** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱



شکل۱- تیمارهای سترون‌سازی، میانگین تعداد ریزنمونه‌های سالم و سترون برای هر تیمار، و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۱) در نیشکر واریته CP73-21.

تیمار ٤: هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد (۱۰ دقیقه) + کلرور جیوه ۰/۱ درصد (۳۰ ثانیه).

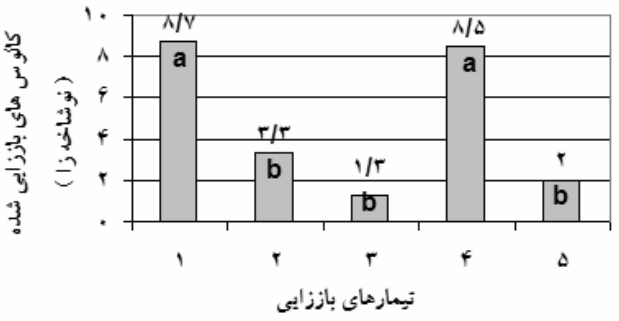


شکل ۲- تیمارهای کالوس‌زایی، میانگین تعداد ریزنمونه‌های کالوس‌زا برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۱) در نیشکر واریته CP73-21.

تیمار a۲b۱ : محیط MS +۳* 2,4-D= + BAP=۰/۱.

تیمار a۲b۲ : محیط MS + ۳ 2,4-D= + BAP=۰/۳.

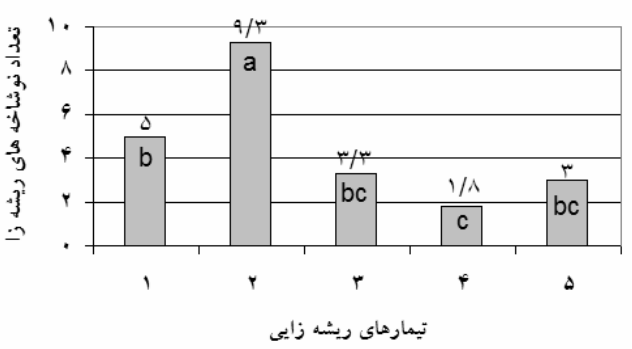
*= مقادیر برحسب میلی‌گرم در لیتر است.



شکل ۳- تیمارهای باززایی، میانگین تعداد کالوس‌های باززایی شده (نوشاخه زا) برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۱) در نیشکر واریته CP73-21.

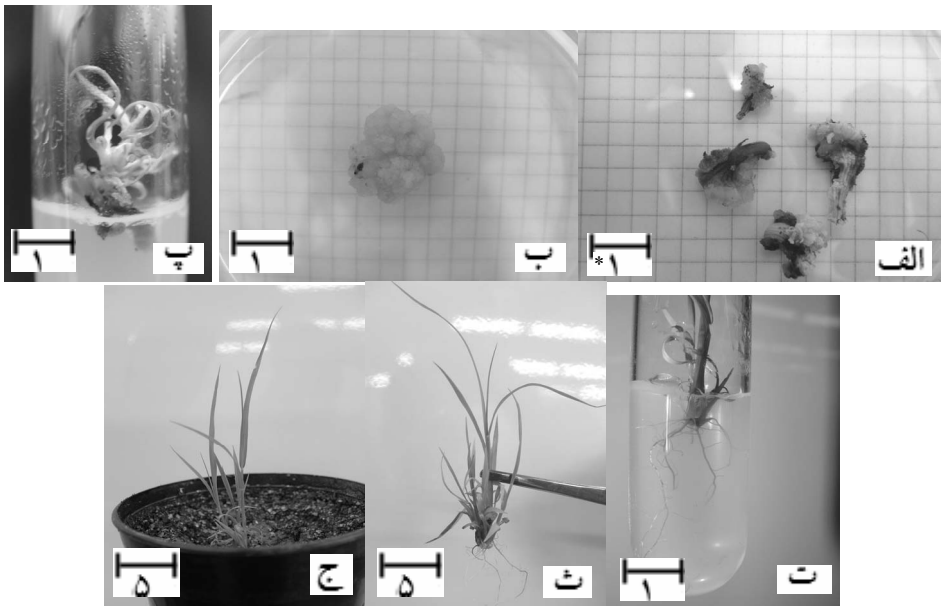
تیمار ۱: محیط MS تغییر یافته،

تیمار٤: محیط MS تغییر یافته + BAP=۱ + NAA=۰/۲.



شکل ٤- تیمارهای ریشه‌زایی، میانگین تعداد نوشاخه‌های ریشه‌زا برای هر تیمار و اختلافات بین تیمارها از طریق آزمون دانکن (α=۰/۰۱) در نیشکر واریته CP73-21 .

تیمار ۲: محیط MS (۱/۲ نیترات) + IBA= ۰/۰۱.



شکل ۵- الف- تشکیل کالوس از برگ‌های اولیه در محیط MS پایه + ۳ =2,4-D + ۰/۱ =BAP.
ب- کالوس توسعه یافته، پیش از انتقال به محیط کشت باززایی. پ- باززایی کالوس در محیط MS تغییر یافته +۱ =BAP + ۰/۲=NAA .
ت- تشکیل ریشه در محیط MS با ۱/۲ نیترات + ۰/۰۱=IBA . ث- گیاهک آماده انتقال به خاک.
ج- گیاهک انتقال یافته به خاک در مرحله سازگاری.

*- واحد مقیاس‌ها، سانتی‌متر است.

بحث

انتخاب برگ‌های اولیه، به‌عنوان ریزنمونه جهت تولید کالوس، به‌دلیل جوانی سلول‌ها و نهایتاً پتانسیل بالای آنها در تمایزیابی است (فارسی و ذوالعالی، ۲۰۰۳). دست‌یابی به درصد قابل توجهی ریزنمونه سترون شده (۸۳ درصد) در استفاده از کلرور جیوه به‌مدت ۳۰ ثانیه، بیانگر تأثیر بالای این محلول در سترون‌سازی ریزنمونه‌هاست. لکن، افزایش مدت زمان استفاده از این محلول به ۳۵ ثانیه (تیمار ۵)، برخلاف سترون‌سازی تمام ریزنمونه‌ها، منجر به مرگ و میر قابل توجهی (٦٢ درصد) از ریزنمونه‌ها گردید که نشانگر حساسیت بالای برگ‌های اولیه به ماده سمی کلرور جیوه است. در کالوس‌زایی برگ‌های اولیه، استفاده از سیتوکینین BAP در کنار 2,4-D جهت تعدیل اثر زیاد اکسین، موثر واقع گردید و جابجایی کالوس‌ها به‌هنگام واکشت در بهترین تیمارهای کالوس‌زایی به‌سهولت انجام شد. نکته قابل توجه اینکه، در تیمارهایی که مقادیر سیتوکینین بالاتری به‌کار رفته بود (BAP=۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)، کالوس‌های حاصله نسبت به کالوس‌های دیگر تیمارها، دارای تردی کمتر و بافت سخت‌تری بوده و جابجایی آنها در محیط‌های کشت جدید، به‌سهولت انجام می‌گرفت. در ارتباط با باززایی کالوس‌های حاصله، هر چند محیط MS تغییر یافته به‌عنوان محیط باززایی مناسب توسط بعضی محققان پیشنهاد گردیده است (آفتاب و همکاران، ۱۹۹٦؛ گاندانو و همکاران، ۲۰۰۵)، لیکن نتایج این تحقیق نشان داد که تلفیقی مناسب از سیتوکینین‌ها و اکسین‌های متداول، در کنار محیط مذکور نیز می‌تواند منجر به باززایی کالوس‌ها در واریته CP73-21 گردد. اگر چه نتایج آزمون دانکن، هر دو تیمار (۱ و ٤) را به‌عنوان تیمارهای مناسب باززایی برای واریته CP73-21 معرفی می‌کند، ولی باززایی کالوس‌ها در تیمار چهارم در مدت زمان کوتاه‌تری (۱۱ روز زودتر) اتفاق افتاد. این مسأله نشان داد که تلفیق مناسبی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در کنار محیط MS تغییر یافته می‌تواند فرایند باززایی را از کالوس‌های واریته CP73-21 تسریع بخشد. در ارتباط با دست‌یابی به بهترین محیط کشت ریشه‌زایی، (محیط MS با غلظت ۱/۲ نیترات به‌همراه IBA به‌میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر)، به‌رغم مطابقت این نتایج با نتایج گالومیگر و همکاران (۲۰۰۰) در نوع اکسین استفاده شده (IBA در غلظت ٤ میلی‌گرم در لیتر در محیط MS با غلظت ۱/۲ نیترات) در

ریشه‌زایی واریتهٔ CP48-1198، ولی نتـایج ایـن تحقیـق نشان داد که استفاده از مقـادیر بـسیار انـدک IBA (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) نیـز مـی‌توانـد منجـر بـه درصـد بـالای ریشه‌زایی (۹۳ درصـد) در نوشـاخه‌هـای حاصـله گـردد. همچنین نتایج به‌دست آمده با نتایج لال و سـینگ (۱۹۹٤)، که محیط MS با ۱/۲ نیترات را به تنهایی جهت ریـشه‌زایـی اکثر گونه‌های نیشکر، پیشنهاد داده‌اند همسویی ندارد. زیرا استفاده از ایـن محـیط کـشت پیـشنهادی، تنهـا منجـر بـه ریشه‌زایی ۵۰ درصد نوشاخه‌ها گردیـد. درحـالی‌کـه ایـن تحقیق مقدار ۰/۰۱ میلی‌گـرم در لیتـر IBA را در محـیط MS با ۱/۲ نیترات پیشنهاد می‌کند. از تفاوت‌های موجـود، چنین نتیجه می‌شود که تیمارهای مجزایی برای هـر گونـه یا واریته، جهت دست‌یابی به آغازش سریع شاخه و القای ریشه نیاز است (چیما و حسین، ۲۰۰٤).

منابع

1.Aftab, F., Zafar, Y., and Malik, K.A. 1996. Plant regeneration from embryogenic cell suspension and protoplasts in sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrid cv. Col-54). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44: 71-78.

2.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.

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

4.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.

5.Desai, N.S., Suprasana, P., and Bapat, V.A. 2004. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Succharum* spp.). Curr. Sci. 87: 764-768.

6.Ehsanpour, A., and Amini, F. 2003. Plant cell and tissue culture. Isfahan jehad Daneshgahi Press. Second Publish. 182p.

7.Farsi, M., and Zolala, J. 2003. Introduction to plant biotechnology. Number 392. First Publish. Ferdowsi university press. 495pp. (Translated in Persian).

8.Gallo-Meagher, M., English, R.G., and Abouzid, A. 2000. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. Dev. Boil plant. 36: 37-40.

9.Gandonou, C., Errabil, T.A., and Idaomar, M. 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane. Afr. J. Biot. 4(11): 1250-1255.

10.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.

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

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

13.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.

14.Maqbool, A., and Akhtar, M.E. 2000. Problems and prospects of sugarcane research and development in Pakistan. Pal. Sugar J. 15: 97-98.

15.Murashig, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol.P. L. 15: 473-497.

16.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.

17.Pierik, R.L.M. 1997. In Vitro Culture of Higher Plants. pp. 195-196. Kluwar Academic publishers. Netherlands.

18. 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.

19. Silvarolla, M.B. 1992. Plant genomic alterations due to tissue culture. J. Brazil. Assoc. Adv. Sci. 44: 329-33.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(5), 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of sugarcane variety CP73-21

***Sh. Sadat[1], M.R. Bihamta[2] and S.E. Emam[3]**
[1]M.Sc, of Research Dept. of Karun Agromony Industry, [2]Prof. Dept. of Biotechnology Tehran University,
[3]B.Sc. of Research Dept. of Karun Agromony Industry

Abstract

In this study, in order to disinfect initial leaves of the sugarcane (*Saccharum officinarum*) variety CP73-21, five treatments were studied in a completely randomized design (CRD) with six replications. Sequential applications of 25% sodium hypochlorite for 10 minutes and 0.1% mercuric chloride for 30 seconds had the best results on disinfection of initial leaves. Six callus induction treatments were evaluated through a factorial experiment based on CRD with four replications. Murashig and skoog (MS) based medium supplemented with 3 mgl^{-1} 2,4-D along with 0.1 mgl^{-1} and 0.3 mgl^{-1} BAP respectively, had the best results for callus induction of initial leaves. Regeneration of calli was studied using five treatments in a completely randomized design with four replications. Hormone- free modified MS (including casein hydrolyzate) and also modified MS with 1 mgl^{-1} BAP and 0.2 mgl^{-1} NAA were more efficient on regeneration. Root formation was studied using five treatments in a completely randomized design with four replications. Half- strength MS medium supplemented with 0.01 mgl^{-1} IBA was found as the best for root induction treatment. The regenerants passed different stages of acclimatization successfully.

Keywords: *Saccharum officinarum*; Initial leaves; Callus regeneration; Root formation; Acclimatization.

*- Corresponding Auther; Email: shahab-302004@yahoo.com