دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد و اتیل متان سولفونات (EMS) بر تولید درون‌شیشه‌ای نیشکر مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت

عاطفه اسلامی[۱]، پیام پورمحمدی[۲] و الهام الهی فرد[۳]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران،
(نویسنده مسوول: Mohammadi@asnrukh.ac.ir)
۳- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
تاریخ ارسال: ۹۸/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۲۴
صفحه: ۱۷۵ تا ۱۸۴

چکیده

علف‌های هرز از عوامل محدودکننده کشت نیشکر بوده و قادر به کاهش عملکرد آن در طول فصل رشد هستند. در این پژوهش در ابتدا، تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D در ٦ سطح، کینیتن (Kin) در دو سطح و 6-بنزیل آمینوپورین (BAP) در دو سطح بر روی کالزایی، اندام‌زایی و میزان قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه برگ در نیشکر رقم CP69-1062 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بالاترین کالزایی را دارد. بیشترین میزان قهوه‌ای‌شدن ریز نمونه در محیط کشت MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود. همچنین در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP اندام‌زایی مستقیم مشاهده شد. در آزمایش دوم، کالوس‌های تولیدشده در محیط کشت MS حاوی ١٦ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به محیط کشت باززایی حاوی غلظت‌های مختلف علف‌کش گلایفوسیت منتقل شدند. نتایج نشان داد در محیط کشت باززایی فاقد گلایفوسیت، القاء گیاهچه صورت می‌گیرد اما کالوس‌هایی که تحت تأثیر علف‌کش گلایفوسیت قرار گرفته بودند توانایی تولید گیاهچه را نداشتند. در آزمایش دیگر کالوس‌های تولیدشده در محیط کشت بهینه، جهت ایجاد جهش در محیط کشت مایع حاوی ٤ سطح مختلف اتیل متان سولفونات (EMS) به‌مدت زمان صفر، ۳، ٦، ۱۲، ٢٤ و ٤٨ ساعت غوطه‌ور شدند. در محیط شاهد فاقد EMS کالوس‌ها در تمامی زمان‌ها توانایی تولید گیاهچه را داشتند اما با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار با EMS باززایی گیاه کاهش یافت. سپس برای انتخاب گیاهچه‌های مقاوم، بر روی آنها علف‌کش گلایفوسیت با غلظت ٤ درصد اسپری شد. از میان ۲۰ گیاه تیمارشده با گلایفوسیت، فقط ۱ گیاه نسبت به علف‌کش مقاومت نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نیشکر، ریزازدیادی، جهش زایی، علف‌کش

مقدمه

امروزه نیشکر (*Saccharum* spp) در بیش از ۱۲۰ کشور جهان کشت می‌شود و نزدیک به ۷۰ درصد شکر جهان را تأمین می‌کند. نیشکر گیاهی است که به‌دلیل نیاز به شرایط خاص برای تولید بذر و تنوع ژنتیکی بسیار بالا به‌صورت رویشی تکثیر می شود. کشت بافت روش مناسبی برای ایجاد، نگهداری و بکارگیری تنوع ژنتیکی جهت اصلاح و بهبود ارقام تجاری نیشکر می‌باشد. تکثیر نیشکر به‌وسیله کشت بافت نخستین بار در هاوایی در سال ۱۹۶۱ میلادی به‌وسیله نیکل آغاز و سپس به‌وسیله هینز و می در سال ۱۹۶۹ در تایلند دنبال شد و بعد از آن در چند کشور دیگر از جمله آمریکا، کوبا، برزیل، هند و استرالیا ادامه یافت و امروزه در بسیاری از مراکز اصلاح نیشکر از این روش استفاده می‌شود (۹).

ریزازدیادی نیشکر بستگی به‌مدت زمان استقرار ریزنمونه روی محیط کشت، ژنوتیپ، اندازه و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد به کار رفته در محیط کشت دارد. در نیشکر برای القاء کالوس، از ریزنمونه‌های مختلف می‌توان استفاده کرد. برگ یک منبع برای تهیه ریزنمونه جهت تولید کالوس می‌باشد. معمولاً در نیشکر ریزنمونه برگی در مدت زمان کمتری نسبت به ریزنمونه مریستم انتهایی شروع به کالوس‌زایی می‌نماید و شاخه‌زایی بهتر و بیشتری دارد (۲).

وجود تنوع ژنتیکی یکی از عوامل مؤثر در موفقیت هر برنامه اصلاحی است. تنوعی که در شرایط کشت بافت ایجاد می‌شود را تنوع سوماکلونال می‌نامند. تنوع سوماکلونال حاصل طیف وسیعی از جهش‌ها، شامل جهش‌های نقطه‌ای، تغییر در آرایش کروموزومی (شامل وارونگی، حذف و اضافه داشت) و تغییر در تعداد آن‌ها است. احتمال تغییرات ژنتیکی در هسته سلول‌ها با زیادشدن سن کشت افزایش می‌یابد و این تغییرات به شرایط کشت و نیز ترکیبات محیط کشت به‌ویژه تنظیم‌کننده‌های رشدی، نوع ریزنمونه و تعداد دفعات واکشت بستگی دارد (۷). اصلاح موتاسیونی با ایجاد جهش و تنوع ژنتیکی در ساختار توارثی نباتات، سالیان متمادی در عرصه به‌نژادی گیاهی در کنار روش‌های کلاسیک استفاده می‌گردد. تعداد بیشمار ارقام اصلاحی معرفی شده به کشاورزان، بیانگر ارزش اقتصادی این تکنیک می‌باشد. تلاش‌های گسترده‌ای در تغییر ژن‌ها از طریق القاء جهش در غلات به‌عمل آمده که موارد موفق آن ایجاد پاکوتاهی، زودرسی، تغییرات مورفولوژیکی در ساختمان برگ، تغییر ارزش غذایی، ایجاد نرعقیمی، افزایش پنجه‌های بارور، مقاومت به ورس و مقاومت به بیماری بوده که در نهایت باعث افزایش عملکرد برنج شده است (۱۰).

یکی از مهم‌ترین کاربردهای بیوتکنولوژی ایجاد صفت مقاومت به علف‌کش‌ها در گیاهان است در رابطه با ایجاد مقاومت به علف‌کش‌ها در نیشکر می‌توان به اصلاح گیاهان مقاوم به ترکیبات گلایفوسیت و سولفونیل اوره اشاره نمود (۸). مقاومت به علف کش به‌عنوان توانایی ارثی یک گیاه برای بقاء و تکثیر پس از قرارگرفتن در معرض دزی از علف‌کش که به‌طور معمول برای فرم وحشی آن کشنده است، تعریف می‌شود. در گیاه، مقاومت ممکن است به‌طور طبیعی رخ دهد یا به کمک تکنیک‌هایی از قبیل مهندسی ژنتیک یا انتخاب فرم‌های تولیدشده توسط کشت بافت یا جهش‌زایی، ایجاد شود (۱۴).

گلایفوسیت (N- (phosphonomethyl) glycine) یک نوع مهارکننده سنتز اسیدآمینه بوده که باعث بهم‌خوردن مسیر شیکیمات می‌گردد. این علف‌کش مانع از اتصال آنزیم ۵–انول پیرووِیل شیکیمات ۳–فسفات سینتاز به فسفوانول پیروات می‌گردد که در نیشکر از طریق غلاف برگ به مناطق مریستمی در حال رشد انتقال‌یافته و باعث توقف رشد آن‌ها می‌شود (۵).

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر کالزایی، قهوه‌ای‌شدن و باززرایی از برگ‌های پیچیده انتهایی ساقه نیشکر و بررسی تأثیر سطوح مختلف موتاژن EMS در ایجاد جهش به‌منظور تولید گیاه مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای انجام این تحقیق از رقم CP69-1062 که از ارقام تجاری و پرمحصول کشور است (۱۹) استفاده گردید. به‌منظور تهیه ریزنمونه از سرشاخه‌های حاوی برگ‌های جوان دارای مریستم انتهایی استفاده شد. قلمه‌ها از مزارع نیشکر کشت و صنعت کارون واقع در شهرستان شوشتر در استان خوزستان از گیاهانی با طول عمر ۶ تا ۹ ماه برش داده شده و به آزمایشگاه انتقال یافتند.

سترون سازی

قطعات ۵ سانتی‌متری برگ جداسازی شده و پس از شستشوی سطحی و حذف آلودگی‌های بیرونی، برس‌کشی با مایع صابونی و قراردادن در زیر آب جاری به‌مدت نیم‌ساعت انجام شد. جهت سترون‌سازی، ابتدا ریزنمونه‌ها در زیر هود لامینار به‌مدت ۱۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درصد و سپس در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و پس از آن سه بار و هربار به‌مدت ۳ دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

آزمایش اول: بررسی تاثیر تنظیم‌کننده های رشد 2,4-D، کینتین و BAP بر کالزایی و اندام زایی در کشت برگ نیشکر

در این آزمایش محیط کشت تغییریافته MS (۱۳) دارای ۸ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر شکر و ۱ گرم در لیتر زغال فعال مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد مناسب جهت کالزایی، ۲۴ تیمار متفاوت در یک آزمایش فاکتوریل سه فاکتوره، با طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (پتری دیش) مورد بررسی قرار گرفت. هر تکرار شامل یک پتری دیش بود که در آن ۴ ریزنمونه قرار داشت. فاکتورها شامل 2,4-D با غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۴، ۸ و۱۶ میلی‌گرم در لیتر، کینیتن (Kin) با غلظت صفر و ۱ میلی‌گرم در لیتر و 6–بنزیل آمینوپورین (BAP) با غلظت صفر و ۲ میلی‌گرم در لیتر بودند. یادداشت برداری صفات حجم کالوس تولیدشده به‌صورت کیفی با مقیاس هوکر و نی برز (۱۱)، تعداد کالوس (تعداد ریزنمونه‌ای که در هر تکرار کالوس تولید کرده بود) و میزان قهوه‌ای‌شدن ریز نمونه‌ها به‌صورت کیفی در هر تکرار هر ماه یکبار انجام شد و پس از یادداشت‌برداری، واکشت در محیط کشت مشابه انجام شد.

پتری‌دیش‌های حاوی ریزنمونه‌ها در اتاق کشت با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار گرفتند و پس از یک ماه به نور منتقل شدند.

آزمایش دوم: بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش گلایفوسیت بر روی کالوس نیشکر

در این بخش از آزمایش از محیط کشت پایه MS حاوی ۱۶ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP جهت کالوس‌زایی استفاده شد، زیرا Sweby و همکاران (۱۸) بیان کردند که در سطوح پایین‌تر از ۵ میلی‌گرم در لیتر از تنظیم‌کننده رشد 2,4-D تنوع سوماکلونال ایجاد نمی‌شود. به‌منظور تکثیر کالوس‌ها و القاء بیشتر تنوع، ۳ واکشت روی این محیط کشت انجام گردید. سپس کالوس‌های تولیدشده به محیط کشت باززایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (۴) منتقل شدند. قبل از اتوکلاو، به این محیط کشت سطوح مختلف علف‌کش گلایفوسیت با نام تجاری رانداپ و با ۴۱٪ ماده موثره (تولید شرکت آریا شیمی، ایران) به‌میزان صفر، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲ میلی‌مول در لیتر اضافه شد و به‌مدت چهار هفته، تغییرات مشاهده شده یادداشت برداری شد.

پس از گذشت مدت زمان تعیین‌شده، کالوس‌ها به محیط کشت باززایی فاقد علف‌کش گلایفوسیت در اتاق کشت با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و در روشنایی با دوره ۱۶/۸ساعت (روشنایی/تاریکی) با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار گرفتند.

آزمایش سوم: القاء جهش در نیشکر به‌منظور تولید گیاه مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت با استفاده از ماده جهش‌زای اتیل متیل سولفونات (EMS)

به‌منظور ایجاد جهش ۲۴ ترکیب تیماری متفاوت از غلظت‌ها و مدت زمان‌های مختلف تیمار با EMS در یک آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ابتدا محیط کشت مایع MS فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد تهیه شد و EMS فیلتر استریل‌شده در غلظت‌های صفر، ۸، ۱۶، ۳۲ میلی‌مولار در لیتر به محیط کشت مایع اضافه شد. سپس کالوس‌های نیشکر تولیدشده در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در این محیط کشت به‌مدت زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت غوطه‌ور

شدند . پس از گذشت مدت زمان‌های تعیین‌شده کالوس‌ها جهت باززایی به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA منتقل شدند. سپس شیشه‌های حاوی کالوس به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند و پس از گذشت ۲۴ ساعت به‌منظور تولید گیاهچه به نور منتقل شدند. بعد از گذشت ۴ هفته برخی از کالوس‌ها شروع به باززایی کردند. بعد از دو واکشت در محیط کشت باززایی، گیاهچه‌های تولیدشده به‌منظور ریشه‌زایی به‌صورت تک‌گیاه در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر NAA (۱۵) قرار گرفتند. سپس دو واکشت متوالی در محیط ریشه‌زایی صورت گرفت (مدت زمان هر واکشت ۴ هفته بود).

پس از ریشه‌دارشدن گیاهچه‌ها، جهت تعیین آستانه تحمل گیاهچه ها به علف‌کش، گلایفوسیت در غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد بر روی گیاهچه‌های شاهد اسپری شد و به‌مدت ۴ هفته تغییرات مشاهده‌شده یادداشت شد. پس از تعیین غلظت آستانه، گیاهچه‌هایی که تحت تأثیر تیمار EMS قرار گرفته بودند (گیاهچه‌هایی که در محیط حاوی ۸ و ۱۶ میلی‌مولار در لیتر EMS تولید شده بودند) گلایفوسیت روی آن‌ها اسپری شد. سپس گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از شیشه‌های کشت خارج و پس از شستشوی ریشه، در خاک گلدان که دارای نسبت‌های مساوی کوکوپیت و پرلیت بود قرار گرفتند و مراحل مختلف سازگاری که شامل استفاده از سرپوش‌های پلاستیکی بود صورت گرفت.

آزمایش اول: بررسی تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D، کینتین و BAP بر کالزایی و اندام‌زایی در کشت برگ نیشکر

پس از گذشت ۵ هفته از کشت قطعات برگ جوان، القاء کالوس بر روی قطعات برگ کشت‌شده مشاهده شد. کالوس‌های تشکیل‌شده به دو صورت فشرده، متراکم و شکننده و کالوس‌های غیرفشرده، نرم و آبکی قابل تشخیص بودند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر حجم کالوس (جدول ۱) نشان داد اثر متقابل دو جانبه 2,4-D وBAP و اثر سه‌جانبه 2,4-D، Kin و BAP در سطح احتمال ۵٪ درصد معنی‌دار شد. با توجه به اینکه اثر متقابل سه‌جانبه معنی‌دار شده بود از مقایسه میانگین اثرات تک‌جانبه و دوجانبه خودداری شد و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن برای اثرات سه‌جانبه صورت گرفت.

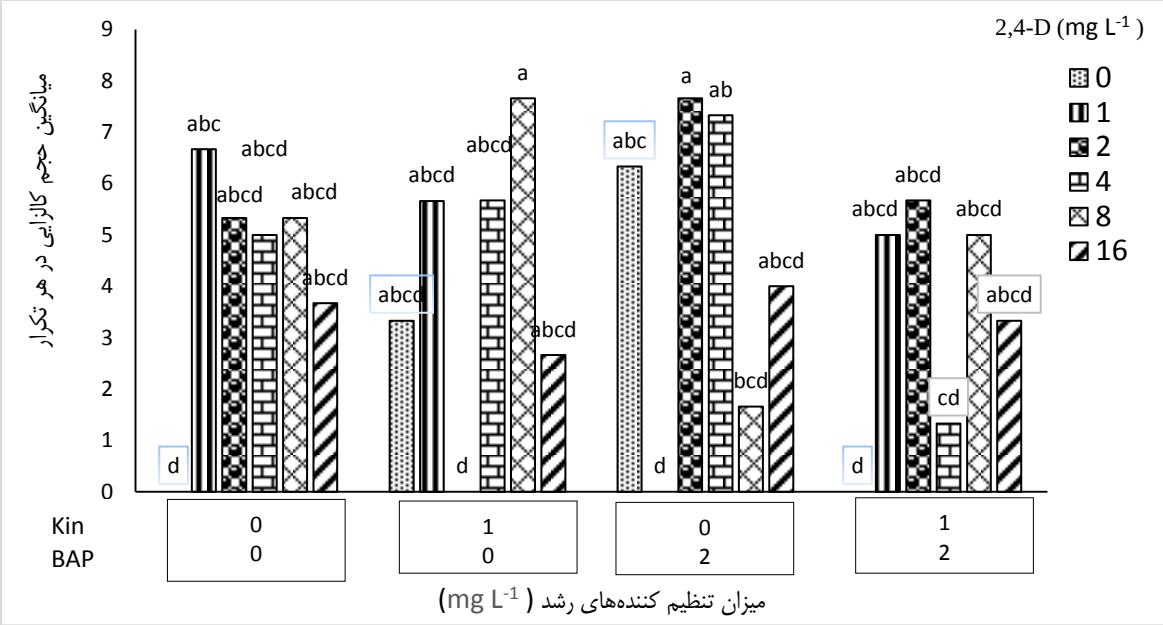
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D، Kin و BAP بر حجم و تعداد کالوس و میزان قهوه‌ای‌شدن در کشت برگ نیشکر رقم CP69-1062

Table 1. Variance analysis of effect of different plant regulators 2,4-D, Kin and BAP on callus volume, callus number and browning in leaf culture of sugar cane cv. CP69-1062

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		حجم کالوس	تعداد کالوس	قهوه‌ای‌شدن
2,4-D	۵	۱۱/۷۱۴^{ns}	۲/۱۸۹^{ns}	۱۱/۱۰۰^{ns}
Kin	۱	۷/۳۴۷^{ns}	۲/۷۲۲^{ns}	۰/۲۲۲^{ns}
BAP	۱	۱/۱۶۸^{ns}	۰/۰۵۶^{ns}	۲/۰۰۰^{ns}
2,4-D × Kin	۵	۱۹/۸۴۷^{ns}	۳/۲۸۹*	۲۳/۱۲۲*
2,4-D × BAP	۵	۲۵/۴۴۷*	۳/۸۸۹*	۱۷/۱۶۷*
Kin × BAP	۱	۴/۰۱۴^{ns}	۲/۰۰۰^{ns}	۸/۰۰۰^{ns}
2,4-D × Kin × BAP	۵	۲۷/۱۱۴*	۳/۵۰۰*	۳۴/۳۱۱*
خطا	۴۸	۸/۷۶۴	۱/۱۸۱	۵/۹۴۴
ضریب تغییرات(٪)		۳۲	۱۷	۲۱

* و ns: به ترتیب اثر معنی‌داری و غیر معنی‌داری در سطح احتمال ٪۵ درصد

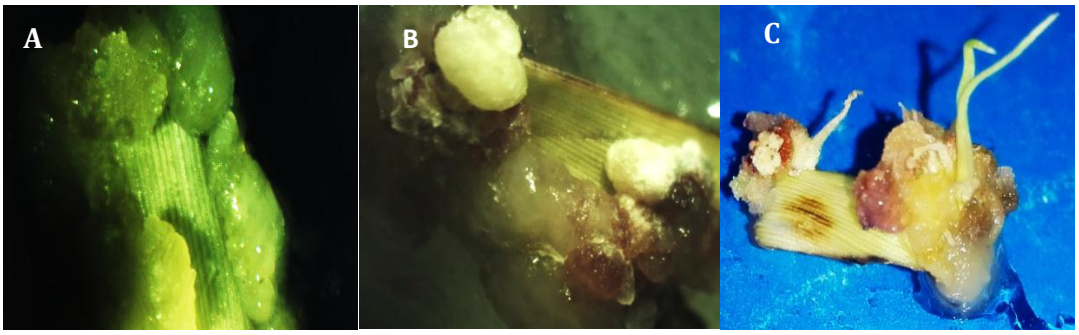
نتایج آزمون مقایسه میانگین دانکن جهت تعیین بهترین مقدار تنظیم‌کننده رشد (شکل ۱)، نشان داد که تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (شکل ۲-الف) و تیمار ۸ میلی‌گرم در لیتر2,4-D به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin (شکل ۲-ب) با میانگین ۷/۶۷ بهترین نتایج را در حجم کالزایی از برگ‌های اولیه به‌همراه داشته‌اند. همچنین محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP تا حدودی اثری مشابه به دو تیمار ذکر شده داشت.



شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر حجم کالزایی ریزنمونه‌ی برگ نیشکر رقم CP69-1062 (با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند).

Figure 1. Mean comparisons of plant growth regulator effect on callus production in leaf culture of sugar cane cv. CP69-1062 (means followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level using Duncan's multiple range test)

مقایسه میانگین (شکل ۱) نشان داد که در عدم حضور تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت کالزایی رخ نمی‌دهد. در عدم حضور 2,4-D وجود یک سیتوکینین (BAP یا Kin) به‌تنهایی می‌تواند منجر به کالزایی شود در صورتی که وجود هر دو سیتوکینین BAP و Kin در شرایط عدم حضور 2,4-D، مانع کالزایی شد. همچنین در عدم حضور 2,4-D، BAP تأثیر بیشتری بر روی کالزایی نسبت به Kin داشت. در محیط کشت‌های فاقد Kin و BAP و دارای 2,4-D کالزایی رخ می‌دهد و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بیشترین میزان کالزایی به‌دست آمد، اما با افزایش سطح 2,4-D تغییری در میزان کالزایی ایجاد نشد. با این حال، در بعضی موارد حضور همزمان اکسین و سیتوکینین باعث افزایش تولید کالوس می‌گردد (۱). با بالا رفتن غلظت 2,4-D حضور یک سیتوکینین (BAP یا Kin) در محیط کشت و یا وجود 2,4-D به‌همراه هر دو تنظیم‌کننده رشد BAP یا Kin می‌تواند منجر به کالزایی مناسب شود (شکل ۲ A و B). Chawla (۶) نشان داد که استفاده از یک سیتوکنین به‌مقدار کم همراه با اکسین می‌تواند اثرات بیش از حد اکسین را کاهش دهد. Sadat و Hoveize (۱۵) بیان کردند استفاده از 2,4-D بدون سیتوکنین، سبب نرم و آبدارشدن کالوس‌ها و متلاشی‌شدن آن‌ها هنگام انتقال به محیط کشت جدید می‌شود.

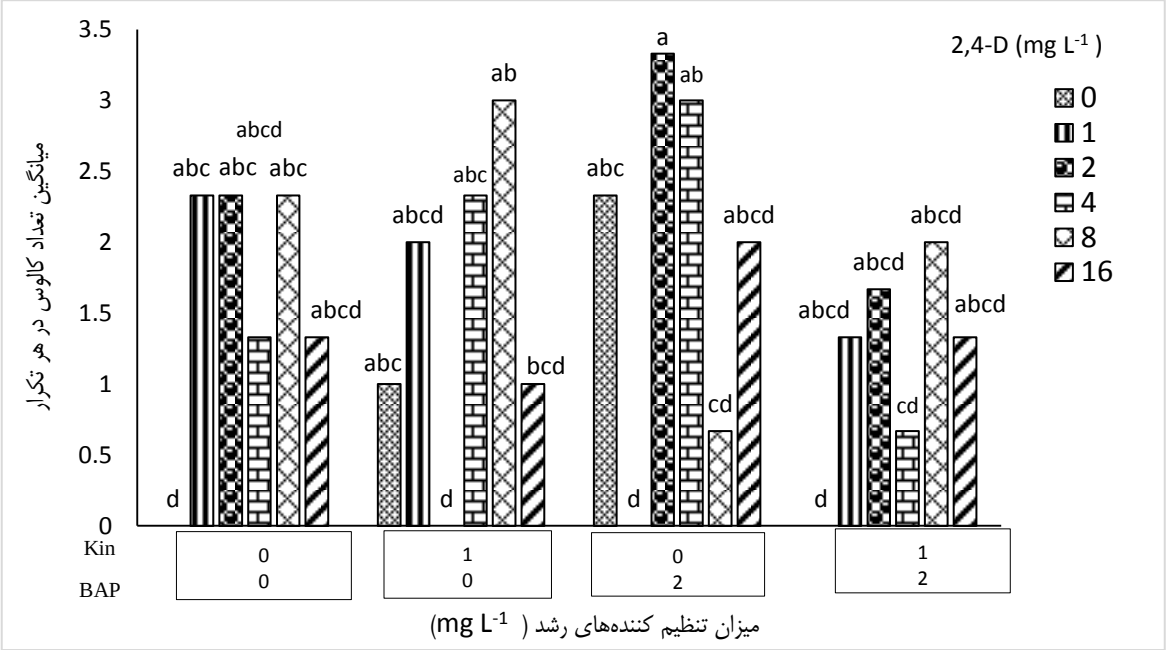


شکل ۲- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D، Kin و BAP بر روی کالزایی و اندام‌زایی الف- تیمار ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۲ میلی‌گرم در لیترBAP، ب- تیمار ۸ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin ج) ساختار اندام‌زایی در محیط MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیترBAP

Figure 2. Effect of 2,4-D, Kin and BAP on callugenesis and organogenesis. A: Treatment with 2 mgl^{-1} 2,4-D and 2 mgL^{-1} BAP. B: Treatment with 8 mgl^{-1} 2,4-D and 1 mgL^{-1} Kin. C: Organogenesis in MS medium with 2 mgL^{-1} BAP

طبق مشاهدات به‌دست‌آمده در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر از BAP و فاقد 2,4-D و Kin اندام‌زایی بر روی کالوس‌ها مشاهده شد (به‌طور متوسط ۴ گیاهچه در هر تکرار، شکل ۲ C).

با توجه به تجزیه واریانس (جدول ۱) هیچکدام از اثرات اصلی در صفت تعداد کالوس معنی‌دار نشد و از بین اثرات متقابل دو جانبه تنظیم‌کننده‌های رشد اثر 2,4-D و BAP و اثر 2,4-D و Kin معنی‌دار شد. اثر سه‌جانبه نیز در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌جانبه تنظیم‌کننده‌های رشد (شکل ۳) نشان داد زمانی که محیط کشت فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین در صورت وجود همزمان سیتوکینین BAP و Kin بدون 2,4-D حضور کالوسی مشاهده نشد. بیشترین تعداد کالوس (۳/۳ کالوس در تکرار) مربوط به زمانی است که ۲ میلی‌گرم در لیتر از 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر از BAP در محیط کشت وجود داشته باشد و تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها داشت. زمانی که 2,4-D به‌همراه هر دو تنظیم‌کننده BAP و Kin در محیط وجود داشته باشد تعداد کالوس نسبت به زمانی که 2,4-D به‌همراه BAP یا Kin در محیط وجود داشته باشد کمتر می‌باشد.



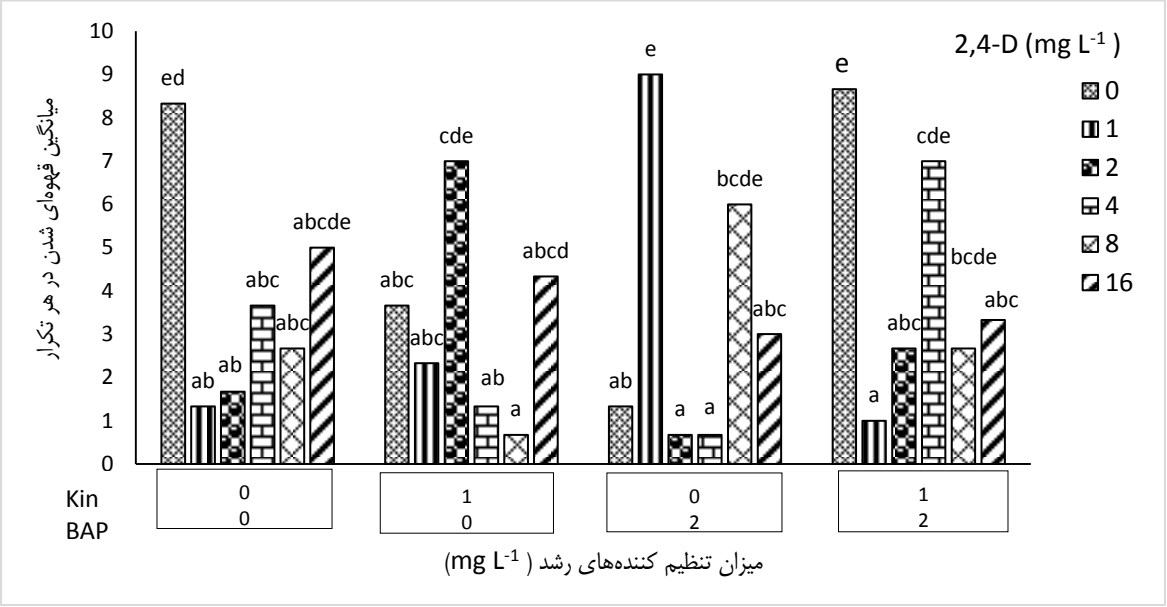
شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر تعداد کالزایی ریزنمونه‌ی برگ نیشکر رقم CP69-1062 (با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ ، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند).

Figure 3. Mean comparisons of plant growth regulation effect on callus number per replication in leaf culture of sugar cane cv. CP69-1062 (means followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level using Duncan's multiple range test)

تجزیه واریانس تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه برگ نیشکر (جدول ۱) نشان داد اثر متقابل دوجانبه 2,4-D و BAP و اثر 2,4-D و Kin بسیار معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل سه‌جانبه هر سه تنظیم‌کننده رشد در سطح ۵٪ معنی‌دار بود.

بر اساس مقایسه میانگین‌ها (شکل ۴) بیشترین میزان قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ها مربوط به تیمار فاقد تنظیم‌کننده رشد و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود و کمترین میزان قهوه‌ای‌شدن مربوط به تیمار۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و تیمار ۸ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر Kin و همچنین محیط کشت MS حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به‌همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بود.

صدیقی و همکاران (۱۷) در مطالعات خود بر روی کشت درون شیشه‌ای انگور گزارش کردند بیشترین میزان قهوه‌ای‌شدن در محیط فاقد اکسین و کمترین آن در غلظت بالای اکسین مشاهده شد. تیمارهای هورمونی در کاهش نکروزه‌شدن نسبت به محیط شاهد اهمیت دارند. تخریب غشاء سلولی باعث فعال‌شدن آنزیم پلی فنل اکسیداز و در نتیجه قهوه‌ای‌شدن می‌گردد. از طرف دیگر فنول‌ها در مقادیر زیاد به‌عنوان مواد اکسیدشونده عمل نموده و باعث ایجاد رنگ قهوه‌ای در گیاه می‌شوند به‌طوری که در نمونه‌های شاهد دیده شد.



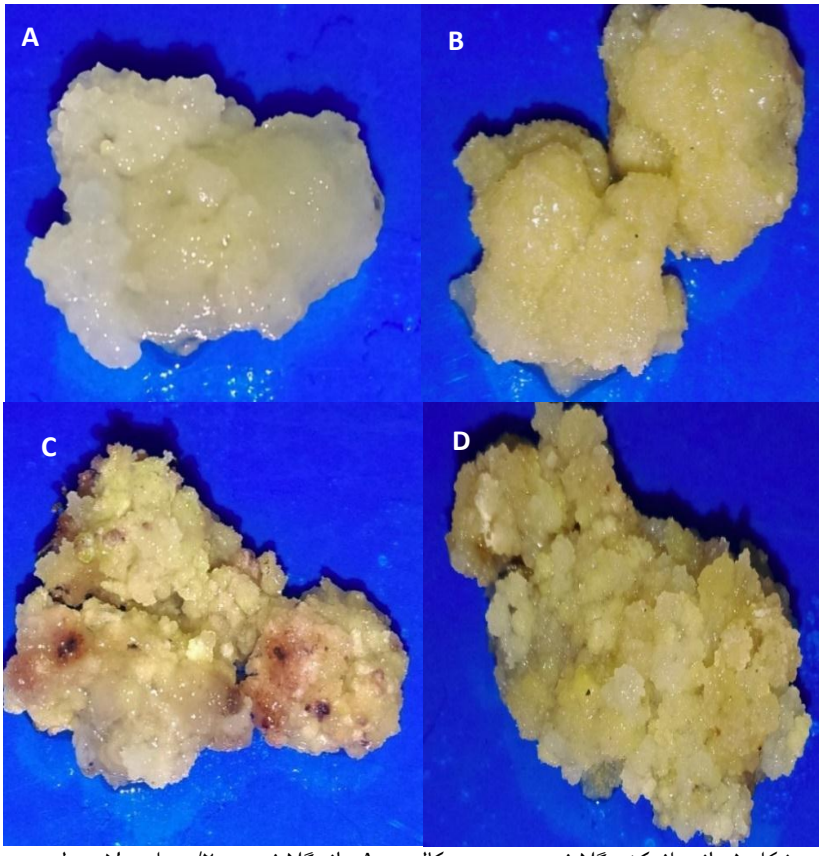
شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد بر قهوه‌ای‌شدن ریزنمونه‌ی برگ نیشکر رقم CP69-1062 (با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند)

Figure 4. Mean comparisons of plant growth regulation effect on explant browning in leaf culture of sugarcane cv. CP69-1062 (means followed by at least one letter in common are not significantly different at the 5% probability level using Duncan's multiple range test)

آزمایش دوم: بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف علف‌کش گلایفوسیت بر روی کالوس نیشکر

در آزمایش بررسی تاثیر سطوح مختلف گلایفوسیت بر روی کالوس، نتایج نشان داد در غلظت ۲ میلی‌مولار در لیتر از گلایفوسیت، بافت کالوس رشد بسیار کمی داشت و بخش زیادی از کالوس دچار حالت نکروزه شده بود، در صورتی که در غلظت‌های پایین‌تر بافت کالوس رشد بیشتری داشته و رنگ کالوس‌ها روشن‌تر بود. هرچه غلظت علف‌کش گلایفوسیت در محیط کشت کمتر شود سلول‌ها روشن‌تر و شفاف‌تر دیده می‌شوند و هرچه غلظت علف‌کش گلایفوسیت افزایش یابد سلول‌ها کرمی رنگ و زرد شده و حالت نکروزه می‌یابند. کالوس‌هایی که تحت تأثیر علف‌کش گلایفوسیت قرار گرفته بودند پس از انتقال به محیط باززایی فاقد علف‌کش گلایفوسیت توانایی تولید گیاهچه را نداشتند. نتایج نشان داد در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌مولار در لیتر (شکل ۵-A) (شکل ۵-B) زیر ۲۰ درصد و در غلظت ۱ میلی‌مولار در لیتر (شکل۵-C) کمتر از ۵۰ درصد و در غلظت ۲ میلی‌مولار در لیتر (شکل ۵-D) گلایفوسیت سبب مهار رشد بیش از ۶۰ درصد در کالوس‌ها شد.

در تحقیق دیگری، به‌منظور بررسی مقاومت کالوس به علف‌کش گلایفوسیت در سه رقم نیشکر شامل CP69-1062, CP57-614 و CP48-103 توسط Mohammadi (۱۲)، ریزنمونه‌های برگی در محیط کشت MS حاوی هورمون 2,4-D با ۳ غلظت مختلف کشت گردیدند. پس از تولید کالوس، کالوس‌ها به محیط کشت MS فاقد هورمون و دارای گلایفوسیت با غلظت‌های ۱/۲، ۱، ۰/۸، ۰/۶، ۰/۴، ۰/۲ و صفر میلی‌مولار در لیتر انتقال یافتند. نتایج نشان داد میزان وزن تر کالوس با افزایش سطح غلظت علف‌کش کاهش پیدا می‌کند و در غلظت ۱ میلی‌مولار در لیتر از علف‌کش گلایفوسیت در هر سه رقم کاهش حدود ۷۰ درصدی در میزان وزن تر نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید. همچنین در میان سه رقم، رقم CP69-1062 بیشترین رشد کالوس و رقم CP57-614 و CP48-103 کمترین رشد کالوس را داشتند.



شکل ۵- اثر علف‌کش گلایفوسیت بر روی کالوس، A- اثر گلایفوسیت ۰/۲ میلی‌مولار در لیتر، B- اثر گلایفوسیت ۰/۵ میلی مولار در لیتر، C- اثر گلایفوسیت ۱ میلی‌مولار در لیتر، D- اثر گلایفوسیت ۲ میلی مولار در لیتر

Figure 5. Effect of Glyphosate herbicide on callus. A: Treatment with 0.2 mML^{-1} Glyphosate B: Treatment with 0.5 mML^{-1} Glyphosate C: Treatment with 1 mML^{-1} Glyphosate D: Treatment with 2 mML^{-1} Glyphosate

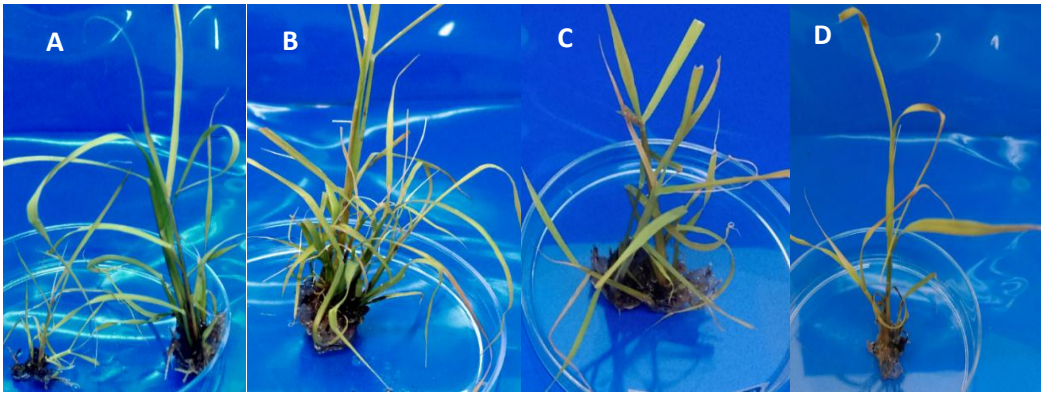
زمبرانو و همکاران، (۲۰) به‌منظور بررسی اثر گلایفوسیت در تولید گیاهان مقاوم، از ارقام PR62258، V64-10 و V71-51 سوسپانسیون سلولی تهیه کردند و سپس سوسپانسیون‌های تهیه شده از ارقام را با گلایفوسیت در غلظت‌های ۱/۲، ۱، ۰/۸، ۰/۶، ۰/۴ و ۰/۲ میلی‌مولار در لیتر تیمار کردند. در نهایت نتایج نشان داد در سه رقم مورد بررسی غلظت‌های ۱ و ۱/۲ میلی‌مولار در لیتر گلایفوسیت سبب مهار رشد بالای ۶۵ درصد و در غلظت ۰/۸ میلی‌مولار در لیتر کمتر از ۵۰ درصد و در غلظت‌های ۰/۶، ۰/۴ و ۰/۲ میلی‌مولار در لیتر زیر ۳۸ درصد می‌شود.

آزمایش سوم: القاء جهش در نیشکر به‌منظور تولید گیاه مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت با استفاده از ماده جهش‌زای اتیل متیل سولفونات (EMS)

در این آزمایش، به‌دلیل از بین‌رفتن برخی از تیمارها در نتیجه استفاده از EMS امکان انجام تجزیه واریانس نبود. بررسی‌ها نشان داد در محیط شاهد (فاقد EMS) در تمامی زمان‌ها کالوس‌ها توانایی تولید گیاهچه را داشتند در حالی که در غلظت ۳۲ میلی‌مولار در لیتر ماده جهش‌زای EMS به‌دلیل از بین‌رفتن کالوس‌ها گیاهچه‌ای به‌دست نیامد. در غلظت ۸ و ۱۶ میلی‌مولار در لیتر، ماده جهش‌زا در زمان صفر، ۳ و ۶ ساعت کالوس‌ها توانایی تولید گیاهچه را داشتند در حالی که در زمان‌های بالاتر هیچ گیاهچه‌ای به‌دست نیامد. بنابراین غلظت‌های بالای ماده جهش‌زای EMS و همچنین مدت زمان بالاتر از ۶ ساعت سبب مهار رشد کالوس‌ها می‌شود و سبب می‌شود که توانایی تولید گیاهچه نداشته باشند.

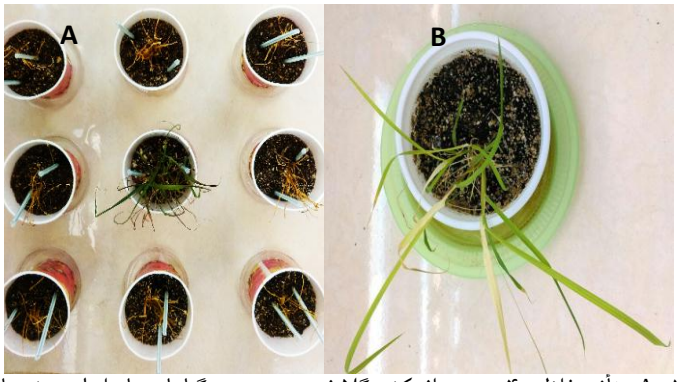
برای تعیین غلظتی از علف‌کش گلایفوسیت که باعث از بین‌رفتن گیاهچه نیشکر می‌شود، در ابتدا علف‌کش در غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد بر روی گیاهچه‌های شاهد (گیاهچه‌های تولیدشده در محیط فاقد EMS) اسپری شد. بعد از گذشت ۴ هفته، نتایج نشان داد در غلظت ۱ درصد (شکل ۶-A)، ۲ درصد (شکل ۶-B) و ۳ درصد (شکل ۶-C) از علف‌کش، بیشتر گیاهچه‌ها سالم ماندند و تغییر زیادی در ظاهر آن‌ها رخ نداد اما در غلظت ۴ درصد، بیشتر گیاهچه‌ها زرد شدند و از بین رفتند (شکل ۶-D). پس از انتخاب غلظت ۴ درصد علف‌کش گلایفوسیت به‌عنوان غلظتی که باعث از بین‌رفتن گیاهچه نیشکر می‌شود، جهت انتخاب گیاهچه‌های جهش‌یافته مقاوم، این غلظت بر روی گیاهچه‌های حاصل از تیمار با EMS که در غلظت ۸ و ۱۶ میلی‌مولار در لیتر تولید شده بودند اسپری شد. بعد از گذشت ۳ هفته گیاهچه‌ها به گلدان منتقل شدند و مشاهده شد که از میان گیاهان

منتقل‌شده به گلدان فقط یک گلدان زنده ماند، بنابراین به‌عنوان گیاهی که احتمالاً جهش‌یافته می‌باشد جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شد (شکل ۷-).



شکل ۶- اثر علف‌کش گلایفوسیت بر روی گیاهچه‌ها A- گلایفوسیت ۱ درصد، B- گلایفوسیت ۲ درصد، C- گلایفوسیت ۳ درصد، D- گلایفوسیت ۴ درصد

Figure 6. Effect of Glyphosate herbicide on plantlets. A: Treatment with 1% Glyphosate B: Treatment with 2% Glyphosate C: Treatment with 3% Glyphosate D: Treatment with 4% Glyphosate



شکل ۷- A- تأثیر غلظت ۴ درصد علف‌کش گلایفوسیت بر روی گیاهان حاصل از جهش با EMS B- گیاهچه مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت

Figure 7. A: Effect of 4% Glyphosate herbicide on plants treated with EMS, B: Mutant Glyphosate resistant plant

سادات و هویزه (۱۵) بیان کردند افزایش غلظت اتیل متان سولفونات (EMS) بر روی کالوس‌های حاصل از نیشکر دو واریته CP48-103 و CP57-614 سبب افزایش مرگ و میر کالوس‌ها می‌شود. القرارانی و خان (۳) بیان کردند که ماده جهش‌زای به‌کاررفته بر روی کالوس‌ها، می‌تواند بر روی باززایی کالوس تأثیرگذار باشد و منجر به کاهش پتانسیل آنها در باززایی گردد. سیاحی و میرپناهی (۱۶) بیان کردند کالوس‌هایی که در معرض مواد جهش‌زا قرار می‌گیرند جهت باززایی نیاز به مقادیر بالاتری از سیتوکینین و مقادیر کمتری از اکسین دارند.

در مجموع نتایج نشان داد استفاده از سطوح متعادلی از تنظیم‌کننده رشد 2,4-D به‌همراه یک تنظیم‌کننده سیتوکینینی مانند کینتین یا BAP می تواند منجر به تولید کالوس در ریز نمونه‌های برگ در نیشکر شود. از طرفی استفاده از علف‌کش گلایفوسیت در محیط کشت باززایی گیاهچه به‌عنوان عامل انتخابگر جهت تولید گیاهان مقاوم به گلایفوسیت در نیشکر روش مناسبی نیست، زیرا منجر به اثرات بازدارندگی شدیدی بر روی باززایی گیاهچه می‌شود و بهتر است به‌منظور انتخاب گیاهان مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت از روش اسپری علف‌کش بر روی گیاهچه‌ها استفاده شود. همچنین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده ماده جهش‌زای EMS جهت القاء تنوع در نیشکر می‌تواند موثر باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بابت فراهم‌کردن امکانات پژوهش و شرکت کشت و صنعت کارون خوزستان بابت فراهم‌کردن مواد گیاهی سپاسگزاری می کنند.

منابع

1. Ahmad, N., H. Fazal and R. Zamir. 2011. Callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert). Sugar Technology, 13(2): 174-177.
2. Ali, A., S. Naz and J. Iqbal. 2007. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane *(Saccharum officinarum* L.). Pakistan Journal of Botany, 39(6): 1961-1977.
3. Al-Qurarainy, F. and S. Khan. 2009. Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. World Applied Sciences Journal, 6(12): 1589-1601.
4. Bahera, K.K. and S. Sahoo. 2009. Rapid *In vitro* micro propagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) through callus culture. Natural Science, 7(4): 0740-1545.
5. Baylis, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. Pest Management Science, 56: 299-308.
6. Chawla, H.S. 2002. Introduction to plant biotechnology. 2nd ed, Enfield, New Hampshire, 495 pp.
7. Gaj, M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Plant Growth Regulation, 43: 27-47.
8. Hunsigi, G. 1993. Production of sugarcane, theory and practice. Springer-Verlag, Berlin, 258 pp.
9. Lakshmanan, P., R.J. Geijskes, L. Wang, A. Elliott, C.P.L. Grof, N. Berding and G.R. Smith. 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. Plant Cell Report, 25: 1007-1015.
10. Majidi Z., N. Babaeian-Jelodar, G. Ranjbar and N. Bagheri. 2013. Study of induced variation by ethyl methane sulphonate and sodium azide on Tarrom mahali rice cultivar. Journal of Crop Breeding, 12(5): 49-62 (In Persian).
11. Mehrabi, A.A., M. Omidi, B.E. Sayed Tabatabaie and A.A.Sh. Boshehri. 2002. In vitro culture and effect of explants coculturing in canola. Iranian Journal of Agriculture Science, 33(4): 627-635.
12. Mohammadi, H. 2011. Resistance of sugarcane callus to Glayfosate herbicide. M.Sc. Thesis, Ramin agriculture and natural resources university of Khuzestan, 80p.
13. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiology of Plant, 15: 473-497.
14. Nandula, V.K., K.N. Reddy, A.M. Rimando, S.O. Duke and D.H. Poston. 2007. Glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism relationships with glyphosate. Journal of Agriculture Food Chemistry, 55: 3540-3545.
15. Sadat, Sh. and M.S. Hoveize. 2012. Mutation induction using ethyl methane Sulfonate (EMS) in regenerated plantlets of two varieties of sugarcane CP48-103 and CP57-614. African Journal of Agricultural Research, 7(8): 1282-1288.
16. Sayahi, S. and L. Mirpanahi. 2017. Induced mutagenesis using sodium azide (NAN3) on sugar cane regeneration from callus in variety CP69-1062. Journal of Agronomy and Plant Breeding, 12(4): 105-115 (In Persian).
17. Seddighi, A., M. Gholami, H. Sarikhani and A. Chehregani. 2016. Optimized culture medium for *in vitro* growth of grapevine inflorescence. Plant Production Technology, 7(2): 203-219.
18. Sweby, D.L., B.I. Hackett and F.C. Botha. 1994. Minimising somaclonal variation in tissue cultures of sugarcane. Proceeding of South African Sugarcane Technology Association, 68: 29-37.
19. Zadegan Dezfooli S.A., K. Alami Saeid, R. Mamaghani and Z. Khodarahmpour. 2016. Correlation analysis of some agronomic traits by using microsatellite markers for select high sugar sugarcane clones in Khuzestan province. Journal of Crop Breeding, 18(12): 104-111 (In Persian).
20. Zambrano, A.Y., J.R. Demey and V. Gonzalez. 2003. *In vitro* selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. Plant Molecular Biology Report, 21: 365-373.

Effects of Plant Growth Regulators and Ethyl Methanesulfonate (EMS) on *In Vitro* Production of Glyphosate Herbicide Resistant Sugarcane

Atefe Eslami[1], Payam Pour Mohammadi[2] and Elham Elahifard[3]

1- Graduated M.Sc. Student of Plant Breeding, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, (Corresponding Author: Mohammadi@asnrukh.ac.ir)
3- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
Received: February 10, 2020 Accepted: June 13, 2020

Abstract

Weeds are a limiting factor in sugarcane cultivation and able to reduce its yield during the growing season. In this study, first, the effect of 2,4-D plant growth regulators at 6 levels, kinetin (Kin) at two levels and 6-benzyl aminopurine (BAP) at two levels on callus induction, organogenesis and browning of leaf explants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivar 'CP69-1062' was investigated. The results showed that the highest callus induction was observed in MS medium (Murashige and Skoog) containing 2 mg.l^{-1} 2, 4-D with 2 mg.l^{-1} BAP. Explant browning was the highest on MS medium without plant growth regulators and MS medium containing 1 mg.l^{-1} 2,4-D and 2 mg.l^{-1} BAP. Also in medium with 2 mg.l^{-1} BAP, direct organogenesis was achieved. In the second experiment, calli produced in MS culture medium containing 16 mg.l^{-1} 2,4-D, 1 mg.l^{-1} Kin and 2 mg.l^{-1} BAP were transferred to regeneration medium containing different concentrations of glyphosate herbicide. The results showed that in regeneration medium without glyphosate, plantlets were induced, but calli affected by the glyphosate herbicide were not able to produce plantlets. In another experiment, calli produced in the optimal culture medium were immersed in the liquid culture medium containing 4 different levels of ethyl methane sulfonate (EMS) for 0, 3, 6, 12, 24, and 48 hours to cause mutations. In an EMS-free control medium, calli were able to produce plantlets at all times, but with increasing concentration and duration of treatment with EMS, plant regeneration was decreased. Then, to select resistant plantlets, glyphosate herbicide was sprayed on them with a concentration of 4%. Of the 20 plants treated with glyphosate, only 1 showed resistance to herbicide.

Keywords: Herbicide, Micropropagation, Mutation, Sugarcane