مجله زراعت و اصلاح نباتات
جلد ۱۲، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۵
صفحات ۱۱۵-۱۰۵

جهش القایی با استفاده از سدیم آزاید (NAN3) بر گیاهک‌های نیشکر باززایی شده از کالوس در واریته CP69-1062

Induced mutagenesis using sodium azide (NAN3) on sugar cane regeneration from callus in variety CP69-1062

سید سعید سیاحی[۱]، لعیا میرپناهی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۵

چکیده

به‌منظور بررسی القاء موتاسیون در نیشکر واریته CP69-1062 ماده جهش‌زایNAN3 در مقادیر مختلف بر روی کالوس‌های به‌دست آمده از برگ‌های اولیه دور مریستم اعمال گردید. شش تیمار سترون‌سازی با ٤ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی بر روی ریزنمونه‌های حاصل از برگ‌های اولیه دور مریستم اعمال گردید. ۵ تیمار کالوس‌زایی با ٤ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی جهت کالوس‌زایی ریزنمونه‌های حاصل از برگ‌های اولیه مورد بررسی قرار گرفت. 2,4-D به مقدار ٤ و ۳ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب منجر به بیش‌ترین میزان کالوس‌زایی گردیدند. نتایج حاصل از تجزیه پرویبت و نیز تجزیه رگرسیون معادله رگرسیونی Y= ۵/۱+۸٤/۷۸X را معرفی نمود. با استفاده از معادله، LD50 محاسبه و مقدار ۰/۳٤mm به‌عنوان دزی که منجر به ۵۰ درصد مرگ و میر در کالوس‌ها می‌گردد، معرفی شد. جهت باززایی نیز ٦ تیمار باززایی در یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با ٤ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. هورمون Kin در ۲ سطح و NAA در ۳ سطح تیمارهای مذکور را تشکیل دادند. Kin به‌میزان ۳ میلی‌گرم در لیتر و NAA به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم درلیتر اختلاف معنی‌داری با بقیه تیمارها در سطح α=۰/۰۱ داشتند. ریشه‌زایی نوشاخه‌ها در محیط MS پایه با نصف غلظت نیترات که با مقادیر مختلفی از دو اکسین IBA و NAA کامل شده بود، انجام گرفت. نتایج نشان داد که محیط MS پایه که با نصف غلظت نیترات کامل شده بود، به همراه NAA به‌میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را در ریشه‌زایی گیاهک‌های باززایی شده به همراه داشته است.

کلمات کلیدی: نیشکر، موتاسیون، کالوس، باززایی، ریشه زایی.

[۱] – کارشناسی ارشد پژوهشی سازمان تحقیقات و آموزش و منابع طبیعی استان خوزستان (saeed.sayahi92@gmail.com).
[۲] – کارشناسی ارشد کشاورزی، اصلاح نباتات.

مقدمه

نیشکر با اسم علمی (*Saccharum officinarum* L.)، متعلق به خانواده (Gramineae) و از جنس (*Saccharum*) است (D'Hont *et al*., 1995). اهمیت نیشکر در سال‌های اخیر به دلیل استفاده در صنعت شکر و صنایع جانبی آن رو به افزایش است (Desai *et al*., 2004). کشور ایران با دارا بودن شرایط اقلیمی خاص در بعضی مناطق، مناسب کشت و زرع نیشکر می‌باشد. نیاز به واریته‌های جدید که جایگزین ارقام پیشین گردد در مناطق نیشکر خیز ایران به‌خوبی احساس می‌گردد. آن چه که نیاز به واریته‌های جدید را در مناطق نیشکر خیز ایران اجتناب ناپذیر می‌سازد، جلوگیری از آسیب‌پذیری ژنتیکی ارقامی است که برای سالیان متمادی کشت و زرع می‌شوند (صادق زاده حمایتی و همکاران، ۱۳۹۰). اگر چه اصلاح نباتات کلاسیک نقش مهمی در تولید ارقام گیاهی برتر بازی می‌کند، اما به دلیل پیچیدگی ژنتیکی بیشتر این گیاه در مقایسه با گیاهان با ژنوم کوچک‌تر، معرفی یک واریته نیشکر به روش‌های اصلاحی کلاسیک، به زمان نسبتاً طولانی (معادل ۱۰ تا ۱۵ سال) نیاز دارد. از طرفی، فراهم نبودن شرایط اقلیمی مناسب جهت گلدهی نیشکر در ایران، نیاز آن را به شرایط کنترل شده گلخانه‌ای ضروری می‌سازد که می‌تواند زمان لازم برای یک برنامه اصلاحی را بیش از پیش افزایش دهد (Krishnamurthi, 1986؛ Liu and Chen, 1984؛ Siddiqui *et al*., 1994). راه کار دوم که از اصلاح نباتات مدرن بهره می‌گیرد ضمن افزایش دقت مطالعات و عملیات اصلاحی، زمان لازم برای تغییر در خصوصیات گیاه را نیز کاهش می‌دهد. همچنین با به‌کارگیری تکنیک‌های جدید، منابع قابل استفاده جهت کسب صفات مطلوب را با رفع موانع بین جنسی و بین گونه‌ای، به‌طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (Galiba, 1994). در این مقوله، کشت بافت گیاهی و استفاده از مارکرهای مولکولی به‌طور وسیعی توسط محققین به‌نژادی گیاهی در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. کشت بافت گیاهی نقش اساسی در بهبود ژنتیکی گیاهانی نظیر نیشکر دارد که به روش غیر جنسی تکثیر می‌یابند (Liu and Chen, 1984). باتوجه به مشکلاتی که در زمینه اصلاح نیشکر وجود دارد می‌توان گفت یکی از راه‌کارهای اصلاحی این گیاه ایجاد موتاسیون جهت بهبود بعضی از خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک ارقام تجاری ایران است. القای موتاسیون زمانی که با تکنیک کشت بافت همراه می‌گردد، روش مؤثرتری را جهت افزایش تنوع‌های ژنتیکی جدید به همراه خواهد داشت. با توجه به این که سلول‌های کالوس، تمایز نیافته بوده و تقسیمات میتوزی را با سرعت بسیار بالایی به انجام می‌رسانند این سلول‌ها به میزان بسیار بالایی مستعد القای موتاسیون هستند (Crino *et al*., 1994). ایجاد موتاسیون شیمیایی یک روش آسان در گیاهان به‌منظور بهبود صفات زراعی آن‌هاست. موتاسیون‌های القاء شده دارای پتانسیل عظیم و فوق العاده‌ای هستند که به‌عنوان یک روش مکمل در بهبود ژنتیکی گیاهان زراعی محسوب می‌شوند (Mahandjiev *et al*., 2001). موتاژن‌های شیمیایی معمولاً موتاسیون‌هایی را ایجاد می‌کنند که منجر به جایگزینی‌های جفت بازی ATGC شده که منجر به تغییرات آمینواسیدی می‌شوند، که عملکرد پروتئین را تغییر داده، لیکن همانند تغییرات حذف یا تغییر در چارچوب قرائت (Frame shift) منجر به از دست رفتن عملکرد پروتئین نمی‌شود (Bhat *et al*., 2005؛ Dhanayanth and Reddy, 2000). سدیم آزاید (NaN_3) یکی از قوی‌ترین موتاژن‌های شیمیایی برای اصلاح گیاهان زراعی است. ایجاد موتاسیون به کمک یک موتابولیت ارگانیک تولید شده از ترکیبات آزاید ایجاد می‌شود (Owais and Kleinhofs, 1988). این موتابولیت وارد هسته سلول شده، با مولکول DNA واکنش داده و منجر به ایجاد موتاسیون نقطه‌ای در ژنوم می‌شود (Kleinhofs *et al*., 1978؛ Gichner and Veleminsky, 1977). جهت بررسی اثر موتاسیون هر چند ارزیابی صفات مختلف در مزرعه مؤثرترین روش شناخته شده است، اما نباید از نظر دور داشت که با افزایش حجم مواد گیاهی حاصل از القای موتاسیون،

کنترل این مواد گیاهی، در طرح‌های آزمایشی مختلف با افزایش هزینه و وقت زیاد همراه خواهد بود. بنابراین نشانگرهای مولکولی که یکی از انواع نشانگرهای ژنتیکی می‌باشند می‌توانند به‌طور مؤثری در غربال‌گری اولیه مورد استفاده قرار گیرند. به عنوان پیشنهاد، استفاده از مارکرهای مولکولی خصوصاً SSRها که از دقت بسیار بالایی برخوردارند، می‌تواند مدت زمان لازم برای بررسی اثرات این مواد موتاژن در ایجاد موتاسیون را به‌طور چشم‌گیری کاهش دهد. تکرارهای توالی ساده چندین جفت بازی (SSR)، توانایی یافتن پلی‌مورفیسم DNA را در میان جمعیت‌های جهش‌یافته دارا هستند (Hoang Khai and Thi Lang, 2005). ثابت شده است که این مارکرهای مولکولی می‌توانند به‌طور مؤثری در شناسایی موتاسیون‌های نقطه‌ای مورد استفاده قرار گیرند (Xie *et al*., 2006). هدف از اجرای این ازمایش، القای موتاسیون با استفاده از موتاژن شیمیایی سدیم آزاید بر روی کالوس‌های بدست آمده از نیشکر در واریته CP69-1062 و سپس باززایی آن‌ها، همچنین اقدام به شناسایی پلی‌مورفیسم DNA (چند شکلی) درگیاهک‌های باززایی شده با استفاده از مارکر مولکولی و بررسی تنوع‌های آللی ایجاد شده با استفاده از یک نشانگر مولکولی قدرتمند نظیر SSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

قلمه‌های نیشکر واریته CP69-1062 از مزرعه تهیه و به آزمایشگاه انتقال یافتند. قطعات ۵ سانتی‌متری حاوی جوانه انتهایی، جداسازی شده، برس‌کشی با مایع صابونی و قرار گرفتن در زیر آب جاری به مدت نیم ساعت انجام شد. پیش سترون‌سازی شامل غوطه کردن قلمه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه بود. پس از پیش سترون‌سازی، برگه‌های اولیه در زیر هود جداسازی شده و شش تیمار سترون‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. این ۶ تیمار با افزایش ۴۵ ثانیه‌ای هیپوکلریت سدیم از ۴۵ ثانیه تا ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه برای هر تیمار اعمال گردید (جدول ۱).

استفاده از هیپوکلریت سدیم جهت سترون‌سازی سطحی اکثر گونه‌های گیاهی توسط (Chawla, 2000)، پیشنهاد شده است. تیمارهای سترون‌سازی در ۴ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. هر تکرار عبارت از یک پتری محتوی

جدول ۱- تیمارهای مختلف سترون‌سازی، کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی نیشکر در واریته CP69-1062

Table 1. Different treatments of sterilization, callogenesis, regeneration and rhizogenesis sugar cane in CP69-1069 variety

تیمارهای سترون‌سازی	تیمارهای کالوس‌زایی	تیمارهای باززایی	تیمارهای ریشه‌زایی
هیپوکلریت سدیم: ۴۵ ثانیه	2,4-D= 1	Kin= 2 NAA= 0.1	(1.2MS) + 0.01 IBA
هیپوکلریت سدیم: ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	2,4-D= 2	Kin= 2 NAA= 0.3	(1.2MS) + 0.01 NAA
هیپوکلریت سدیم: ۲ دقیقه و ۱۵ ثانیه	2,4-D= 3	Kin= 2 NAA= 0.5	(1.2MS) + 0.02 IBA
هیپوکلریت سدیم: ۳ دقیقه	2,4-D= 4	Kin= 3 NAA= 0.1	(1.2MS) + 0.02 NAA
هیپوکلریت سدیم: ۳ دقیقه و ۴۵ ثانیه	2,4-D= 5	Kin= 3 NAA= 0.3	(1.2MS)+0/02 NAA +0.02 IBA
هیپوکلریت سدیم: ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه	----------	Kin= 3 NAA= 0.5	----------

محیط کشت MS پایه (Murashige and Skoog, 1962) بود که در آن ۱۰ عدد ریز نمونه (برگ اولیه) قرار داشت. بعد از چند روز تعداد ریزنمونه‌های سترون شده در هر پتری شمارش و تجزیه واریانس داده‌ها، جهت بررسی اثرات تیمارهای سترون‌سازی انجام گرفت. ریزنمونه‌های سترون شده به محیط‌های کشت کالوس‌زایی انتقال یافتند. پنج تیمار کالوس‌زایی در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. این تیمارها شامل مقادیر متفاوتی از2,4-D

بودند. چاولا (۲۰۰۰)، به این نکته اشاره کرده است که استفاده از هورمون 2,4-D که اکسین بسیار قوی می‌باشد، به تنهایی برای القاء کالوس کافی است. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت، انتقال به تاریکی با درجه حرارت ۲ ± ۲۵ °C انجام گرفت. پس از سه هفته از کشت ریزنمونه‌ها و دستیابی به کالوس، یادداشت برداری برای تعداد ریزنمونه‌های کالوس‌زا انجام گرفت (جدول ۱).

جهت القاء موتاسیون، کالوس‌ها در معرض غلظت‌های متفاوتی از سدیم آزاید قرار گرفتند. کالوس‌ها بعد از برداشتن از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در محلول سدیم آزاید با غلظت‌های مختلف قرار گرفتند. در این تحقیق تصمیم گرفته شد تا کاهش مدت زمان حاصله در اولویت قرار گیرد. لذا باززایی از تک سلول‌ها و یا قطعات کوچک کالوس با مشکلات فراوان همراه بود. بنابراین در این تحقیق سعی گردید تا با افزایش بیش‌تر غلظت موتاژن و نیز کاهش مدت زمان استفاده از آن، علاوه بر اثر بخشی موتاژن بر سلول‌های کالوس، حفظ ساختار کالوس و نیز حفظ پتانسیل بالاتر آن در باززایی، نیز مورد توجه قرار گیرد. غلظت‌های به کار رفته از سدیم آزاید شامل ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ میلی‌مولار بودند. پس از تیمار با سدیم آزاید، ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، هر بار به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت. کالوس‌های هر تیمار آنگاه بر روی محیط کشت نیمه جامد قرار داده شده، هر دو هفته یکبار برای ارزیابی میزان مرگ و میر مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های حاصل از تعداد کالوس‌های زنده بر اساس تعداد کالوس‌های زرد رنگ و تازه یادداشت گردید. آنگاه با استفاده از روش تجزیه پروبیت داده‌های بدست آمده آنالیز و معادله خط رگرسیونی برازش شد. به علاوه LD50 موتاژن بکار رفته با استفاده از معادله خط بدست آمده محاسبه گردید. کالوس‌های حاصله آنگاه به محیط کشت باززایی منتقل شدند.

جهت باززایی کالوس‌ها، شش تیمار در یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی در ۴ تکرار بررسی شد. محیط MS ساده به عنوان محیط پایه و تلفیقی از هورمون‌های NAA و Kin انتخاب گردیدند (Chawla, 2000). هر تکرار، شامل یک ردیف ۱۰ تایی از لوله‌های کشت (۱۰ سانتی‌متر طول و ۲ سانتی‌متر قطر) بوده و در هر لوله کشت، یک کالوس قرار گرفت. کالوس‌های کشت شده به اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محدوده‌ی دمایی ۲ ± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال یافتند. واکشت کالوس‌ها هر ۳ هفته یک‌بار روی محیط کشت مشابه انجام گرفت (جدول ۱).

نوشاخه‌های به طول تقریبی ۱۰ سانتی‌متر به محیط‌های کشت ریشه‌زایی انتقال یافتند. ۵ تیمار ریشه‌زایی در یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار تهیه گردید.

محیط MS که با نصف غلظت نیترات تکمیل شده بود به عنوان محیط پایه برای تیمارهای ریشه‌زایی در نظر گرفته شد (Pierik, 1997). کاهش غلظت مواد معدنی در محیط MS را به میزان نصف به‌عنوان محیط پایه برای ریشه‌زایی اکثر گونه‌های گیاهی مفید می‌داند. هر تکرار، شامل یک ردیف ۱۰ تایی از لوله های کشت (۲ ×۱۰ سانتی‌متر) بود و در هر لوله کشت، یک نوشاخه قرار گرفت. محیط‌های کشت ریشه‌زایی به اتاق رشد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در محدودهٔ دمایی ۲°C ±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از سه هفته، تعداد نوشاخه‌های ریشه‌دار (ریشه‌های توسعه یافته و دارای تارهای کشنده کافی) برای هر تیمار شمارش و تجزیه واریانس داده‌ها، جهت بررسی اثرات تیمارها به انجام رسید.

جدول۲- تجزیه واریانس تیمارهای مختلف سترون‌سازی، کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی در واریته CP69-1062

Table 2. Variance analysis of different treatments sterilization, callogenesis, regeneration and rhizogenesis in CP69-1069 variety.

آزمایش	منابع تغییر	DF	SS	F	C.V
سترون‌سازی	تیمار	5	2.25	36.20**	12.93
--------	خطای آزمایشی	18	0.06	--------	--------
کالوس‌زایی	تیمار	4	1.65	33**	10.21
--------	خطای آزمایشی	15	0.05	--------	--------
--------	فاکتور A (Kin)	1	0.3	14.43**	--------
باززایی	فاکتور B (NAA)	2	0.79	38.03**	6.11
--------	اثر متقابل A و B	2	0.62	29.61**	--------
--------	خطای آزمایشی	18	0.02	--------	--------
ریشه‌زایی	تیمار	4	1.62	16.93 **	16.29
--------	خطای آزمایشی	15	0.09	--------	--------

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ **significant at 1 percent probability

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های تبدیل شده (تبدیل جذری) را برای تیمارهای مختلف سترون‌سازی، کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی نیشکر واریته CP69-1062 نشان می‌دهد. تیمارهای سترون‌سازی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ نشان دادند. نتایج آزمون دانکن نیز نشان داد که تیمار ۴ شامل هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به مدت ۳ دقیقه، با میانگین ۸/۲۵ ریز نمونه سالم و سترون شده بهترین نتیجه را در سترون‌سازی ریزنمونه‌های نیشکر واریته CP69-1062 به همراه داشته است (جدول ۴). این مسأله ممکن است به‌علت پایداری شیمیایی هورمون 2,4-D باشد (Jha and Roy, 1982) (جدول ۳). در این تحقیق انتخاب برگ‌های اولیه اطراف مریستم مد نظر قرار گرفت. زیرا این برگ‌ها به‌علت جوانی سلول‌هایی که اطراف سلول‌های مریستمی را در برگرفته‌اند از پتانسیل بسیار بالایی جهت تقسیمات میتوزی برخوردارند (Chawla ,2000). استفاده از برگ‌های اولیه جهت کالوس‌زایی توسط (Behra and Sahoo, 2009)، (Niaz and Quraishi, 2002)، (Sadat *et al*., 2008)، (Daneshvar, 2007)، (Franklin *et al*., 2006) و (Karim *et al*., 2002) نیز پیش‌تر گزارش شده است. علت انتخاب هیپوکلریت سدیم به‌عنوان یک ماده سترون‌ساز در این پژوهش، تبعیت از نتایج گزارش‌های ارائه شده پیشین دال بر کارآمدی بالای آن در سترون‌سازی ریزنمونه‌های حاصل از ارقام مختلف نیشکر است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس تیمارهای مختلف کالوس‌زایی نشان داد که اختلاف بین این تیمارها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۳). نتایج آزمون دانکن جهت تعیین بهترین مقدار هورمون استفاده شده، نشان دادکه تیمار ۴ شامل محیط MS پایه به همراه 2,4-D به میزان ۴ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۸/۷۵ ریزنمونه کالوس‌زا و تیمار ۳ شامل محیط MS پایه به همراه ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و میانگین ۶/۷۵ ریزنمونه کالوس‌زا از ۱۰ ریزنمونه، بهترین نتایج را در کالوس‌زایی برگ‌های اولیه به همراه داشته‌اند. استفاده از هورمون 2,4-D برای القاء کالوس از برگ‌های اولیه نیشکر پیش‌تر توسط گاندانو و همکاران (۲۰۰۵)، کریم و همکاران (۲۰۰۲) و نیاز و کورایشی (۲۰۰۲) جهت کالوس‌زایی واریته‌های مختلف نیشکر پیشنهاد شده است. در این جا باید به این نکته اشاره کرد (جدول ۴).

علت انتخاب اکسین 2,4-D، قوی‌تر بودن این هورمون نسبت به سایر اکسین‌هاست، که اغلب برای ایجاد و حفظ کالوس و همچنین رشد سلول‌های سوسپانسیون (محلول) به‌کار می‌رود (سیدطباطبایی و امیدی، ۱۳۸۹). انتخاب غلظت‌های هورمون 2,4-D در این دامنه براساس بررسی منابع انجام شده (بهرا و ساهو، ۲۰۰۹؛ سادات و همکاران، ۱۳۸۷؛ ایکرم وهمکاران، ۲۰۱۱؛ مائورین و همکاران، ۱۹۹۰؛ کریم و همکاران، ۲۰۰۲؛ فرانکلین و همکاران، ۲۰۰۶، علی و همکاران، ۲۰۰۷؛ کمریت و همکاران، ۲۰۱۲ و اسمیولا و همکاران، ۲۰۱۲) صورت گرفت. گزارش‌های فوق مبنی بر این موضوع است که بیش‌تر محققین در رابطه با نوع اکسین مورد استفاده (2,4-D) و غلظت آن (۳ میلی‌گرم در لیتر) نظرات هم‌سویی دارند. نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین دانکن نیز در این پژوهش، نتایج حاصل از گزارش‌های پیشین را تأیید می‌کند. همچنین نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف باززایی، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار این تیمارها در سطح احتمال ۱٪ بود (جدول۳).

جدول ۳- آزمون مقایسه میانگین دانکن برای تیمارهای سترون‌سازی، کالوس‌زایی، باززایی و ریشه‌زایی نیشکر در واریته CP69-1062

Table 3. Duncan comparison test for treatments sterilization, callogenesis, regeneration and rhizogenesis in CP69-1069 variety.

تیمارهای سترون‌سازی/ زمان	میانگین	تیمارهای کالوس‌زایی	میانگین	تیمارهای باززایی	میانگین	تیمارهای ریشه‌زایی	میانگین
هیپوکلریت سدیم: ۴۵ ثانیه	1^{d}	2,4-D= 1	3^{b}	Kin= ۲ NAA= 0.1	5^{b}	(1.2MS) + 0.01 IBA	2^{b}
هیپوکلریت سدیم: ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	2.75^{c}	2,4-D= 2	2^{b}	Kin= ۲ NAA= 0.3	4^{b-c}	(1.2MS) + 0.01 NAA	8.5^{a}
هیپوکلریت سدیم: ۲ دقیقه و ۱۵ ثانیه	5^{b}	2,4-D= 3	6.75^{a}	Kin= ۲ NAA= 0.5	4.75^{b}	(1.2MS) + 0.02 IBA	1.75^{b}
هیپوکلریت سدیم: ۳ دقیقه	8.25^{a}	2,4-D= 4	8.75^{a}	Kin= ۳ NAA= 0.1	9^{a}	(1.2MS) + 0.02 NAA	3^{b}
هیپوکلریت سدیم: ۳ دقیقه و ۴۵ ثانیه	4.75^{b-c}	2,4-D= 5	2.75^{b}	Kin= ۳ NAA= 0.3	5.25^{b}	(1.2 MS) + %2 NAA+ %2 IBA	2.25^{b}
هیپوکلریت سدیم: ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه	0.5^{d}	--------	--------	Kin= ۳ NAA= 0.5	3.25^{c}	--------	--------

با توجه به این که اثر متقابل A و B معنی‌دار شده است، از مقایسه میانگین اثرات اصلی اجتناب گردید (Yazdisamadi *et al.*, 1977). نتایج آزمون مقایسه میانگین دانکن، نشان داد که تیمار ۴ شامل ۳ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ۹ اختلاف معنی‌داری با بقیه تیمارها در سطح احتمال ۱٪ داشت (جدول ۴). در این تحقیق برای باززایی کالوس‌های حاصل تلفیقی از هورمون‌های اکسین و سیتوکینین مورد استفاده قرار گرفت. (Chawla, 2000)، به این نکته اشاره کرده است که کاهش اکسین و افزایش غلظت سیتوکینین برای تولید ساقه از بافت کالوس مرسوم است. در ارتباط با باززایی کالوس‌های حاصله، هر چند محیط MS تغییر یافته به‌عنوان محیط باززایی مناسب توسط بعضی محققان پیشنهاد گردیده است (Aftab *et al.*, 1996, Gandonou *et al.*, 2005). نتایج دیگر تحقیقات نشان داد، که تلفیق مناسبی از سیتوکینین‌ها و اکسین‌های متداول، در کنار محیط پایه نیز می‌تواند منجر به باززایی کالوس‌ها گردد. این نکته را نیز نباید از نظر دور داشت که ماده جهش‌زای به‌کار رفته بر روی کالوس‌ها، می‌تواند به شدت بر روی باززایی کالوس تأثیر گذار باشد و منجر به کاهش پتانسیل آن‌ها در باززایی گردد (Al-Qurarainy and Salim khan, 2009). به‌نظر می‌رسد کالوس‌هایی که در معرض مواد جهش‌زا قرار می‌گیرند جهت باززایی رضایت بخش نیاز به مقادیر بالاتری از سیتوکینین و مقادیر کم‌تری از اکسین دارند. نتایج تجزیه واریانس تیمارهای مختلف ریشه‌زایی، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بود (جدول ۳). نتایج حاصل از آزمون دانکن، نیز نشان داد که تیمار ۲ شامل محیط MS که با نصف غلظت نیترات کامل شده بود، به همراه NAA به میزان ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۸/۵ گیاهک ریشه‌دار شده بیشترین تأثیر را در ریشه‌زایی گیاهک‌های باززایی شده به همراه داشته است. در این تحقیق، جهت دست‌یابی به ریشه‌های توسعه یافته با تارهای کشنده کافی، محیط MS با ½ نیترات به عنوان محیط پایه استفاده گردید (جدول ۴) (Pierik, 1997).

کاهش غلظت مواد معدنی در محیط MS را به میزان نصف به‌عنوان محیط پایه برای ریشه‌زایی اکثر گونه‌های گیاهی مفید می‌داند. محققین نیز اشاره کرده‌اند، که دستیابی به ریشه با استفاده از محیط MS با ½ نیترات، واکنش مثبت نیشکر را به این محیط، جهت ریشه‌زایی به همراه دارد. اما در این تحقیق علاوه بر استفاده از محیط مذکور به‌عنوان محیط پایه، از هورمون‌های IBA و NAA نیز به‌طور جداگانه و یا ترکیبی برای القای ریشه‌زایی استفاده شد (Karim and Amin, 1994, Lal and Sing, 1994).

نتایج حاصل از تجزیه پروبیت پس از تبدیل درصد کالوس‌های کشته شده به پروبیت و تبدیل لگاریتمی مقادیر استفاده شده از سدیم آزاید، را ارائه نشان می‌دهد (جدول۵). همان‌گونه که از جدول مشخص است مدل رگرسیونی، عرض از مبداء و نیز شیب خط همگی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دارند.

جدول ۴- تجزیه پروبیت داده‌های حاصل از تیمار سدیم آزاید بر کالوس‌های نیشکر در واریته CP69-1062

Table 4. Probit analysis data of Sodium azide for sugar cane callus in CP69-1069 variety.

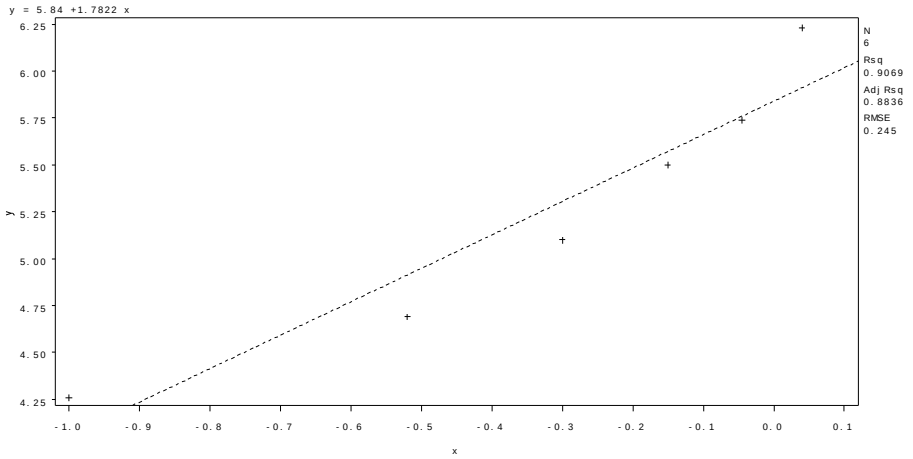
منابع تغییرات	DF	SS	F/t
مدل رگرسیونی	1	2.34	0.0034**
عرض از مبدأ	1	-------	42.55**
شیب خط	1	-------	6.24**
خطای آزمایشی	4	0.06	-------
کل تصحیح شده	5	0.52	-------

**معنی‌دار در سطح 1% R^2= %91 CV= 4.66

**significant at 1 percent probability CV=4.66 R^2=%91

معادله خط رگرسیونی پس از انجام تجزیه پروبیت و محاسبه عرض از مبداء و شیب خط رگرسیون به‌صورت Y=۵/۱+۸۴/۷۸X و برازش آن نشان داده شده است (شکل ۱). نقاط علامت گذاری شده بر روی نمودار، مقادیر واقعی مرگ و میر کالوس را پس از تبدیل لگاریتمی نشان می‌دهد.

در حالی که خط رگرسیونی برازش شده بیانگر مقادیر مورد انتظار است. همان‌گونه که از نتایج تجزیه پروبیت بر می‌آید با افزایش مدت زمان استفاده از سدیم آزاید، میزان مرگ و میر حاصل در کالوس‌های موجود نیز افزایش یافته است.



شکل ۱- برازش معادله رگرسیونی از تجزیه پروبیت داده‌های حاصل از تیمار سدیم آزاید بر کالوس‌های نیشکر واریته CP69-1062.

Figure 1. Regression equation fitted of probit analysis data from sodium azide treatment

محور افقی شامل دز استفاده شده (پس از تبدیل لگاریتمی) و محور عمودی مقدار مرگ و میر کالوس‌ها پس از تبدیل درصد کشته شده به پروبیت (شکل ۱).

محققین دیگری نیز نتایج مشابهی را گزارش داده‌اند. آن‌ها در این گزارش بیان کردند که استفاده از این ماده موتاژن با افزایش غلظت از ۱ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر (۰/۰۱۵ تا ۰/۰۸ میلی‌مولار) بر روی کالوس‌های بدست آمده از واریته CP77-400 منجر به افزایش مرگ و میر کالوس‌ها از ۸/۸ تا ۵۲/۳ درصد گردیده است (HoveizehSadat and Soltani, 2012). محققین، نیز گزارش مشابهی را در استفاده از اتیل متان سولفونات بر روی کالوس‌های حاصل از نیشکر دو واریته CP48-103 و CP59–614 ارائه نمودند. دلیل این مسأله آن است که هر چند سدیم آزاید با تولید متابولیت‌های ارگانیک از ترکیبات آزاید وارد هسته سلول گردیده سپس با DNA وارد واکنش شده و منجر به ایجاد موتاسیون‌های نقطه‌ای می‌گردد، لکن سمیت موجود و بیشتر اثرات فیزیولوژیک آن به دلیل اثرات بازدارنده آن بر روی آنزیم‌هایی است که دارای یون‌های دی والنت (۲ بار مثبت) نظیر آن‌هایی که در تنفس سلولی نقش دارند می‌باشد (Kleinhofs, *et al*., 1978; Amir *et al*., 2007).

سپاسگزاری

با تشکر و سپاس بی‌کران از خانم مهندس لعیا میر پناهی به خاطر تلاش بی‌پایان ایشان و همچنین دانشگاه ازاد اسلامی واحد اهواز که در این راه ما را با مساعدت‌های فراوان یاری نموده‌اند.

فهرست منابع References

صادق زاده حمایتی، س.، فتح اله طالقانی، د.، حمدی، ح.، آمیلی، ح.، ۱۳۹۰. سند ملی راهبردی تحقیقات نیشکر. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند. تهران: انتشارات روانشناسی و هنر. ۳۳۷ ص.

سیدطباطبایی، ب.، امیدی، م.، ۱۳۸۹. کشت بافت و سلول گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳٦۸ ص.

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

Ali A, Naz S, Alam S, Iqwal J. 2007. In vitro induced mutation for screening of red rot (*Colletotrichum falcatum*) resistance in sugarcan (*Saccharum officinarum*). Pakistan Journal of Botany 39 (6): 1979-1994.

Al-Qurarainy F, Salim khan. 2009. Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. World Applied Sciences Journal 6(12): 1589- 1601.

Behera K, Sahoo S. 2009. Rapid in vitro micro propagation of sugar cane (*Saccharum officinarum L.* cv-Nayana) through callus culture. Nature and Science, 7(4):1-10.

Chawla HS, 2002. Introduction to plant biotechnology. 2nd ed, Enfield, New Hampshire, 495 pp.

Daneshvar M. 2007. Modified surface sterilized explants and callus of sugar cane vegetative organs (*Saccharum officinarum*), Journal of Agricultural Sciences Iran, Vol. 38(2). 275-267.

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

Dhanayanth K.P.M, Reddy V. 2000. Cytogenic effect of gamma rays and ethyl methan sulphonate in chilli piper (*Capsicum annum*). Cytol, 65:129-133.

D'Hont A, Lu Y.h, Feldmann P, Glaszmann J.C. 1995. Cytoplasmic diversity in sugar cane revealed by heterologous probes. Sugarcane 1:12-15.

Franklin G, Arvinth S, Sheeba C. J, Kanchana M and N Subramonian. 2006. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugar cane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segment explants. Plant Growth Regul, 50:111–119.

Galiba G,1994. In vitro adaptation for drought and cold hardiness in wheat. In J. Janik (ed).*Plant Breeding. Rev*. 12:115-161.

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

Gichner T, Veleminsky J, 1977. The very low mutagenic activity of sodium azide in Arabidopsis thaliana. Biol. Plantarum, 19: 153-155.

Hoang Khai T, Thi Lang N. 2005. Using SSR marker to identify allele variation of somaclonal mutants in indica rice. Omonrice 13: 121-125.

Ikram U.H, Memon S, Gill N.P, Tahir Rajput M. 2011. Regeneration of plantlets under NaCl stress from NaN3 treated sugar cane explants. African Journal of Biotechnology. 10(72): 16152-15156.

Karim M.Z, Amin M.N, Hossain M.A, Islam S, Hossin F, and Alam R, 2002. Micropropagation of two Sugar cane (*Saccharum officinarum*) varieties from callus culture. J. Bio. Sci. 2(10): 682-685.

Karim MZ, Amin MN (2002). Micropropagation of two Sugar cane (*Saccharum officinarum*) varieties from callus culture. J. Biol. Sci., 2(10): 682-685.

Khamrit R, Jaisil P, Bunnag S. 2012. Callus induction, regeneration and transformation of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) with chitinase gene using particle bombardment. African Journal of Biotechnology. 11(24): 6612-6618.

Kleinhofs A, Owais W.M, Nilan R.A. 1978. Azide, Mutation Research, 55: 165- 195.

Krishnamurthi M. 1986. Sugar can improvement through tissue culture process. Am. Soc. Sugar cane Technol, 29: 23-28.

Lal N, Sing HN .1994. Rapid clonal multiplication of sugarcane through tissue culture. Plant Tissue culture, 4: 1-7.

Liu MC, Chen WH .1984. Tissue and cell culture, an aid to sugar cane breeding. High sucrose and vigorously growing cell clone 71-489. Taiwan Sugar, pp. 31-77.

Lopes T, Pinto G, Loureiro G, Costa A, Santos C. 2006. Determination of genetic stability in long-term somatic embryo genic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. Tree Physiology (26): 1145–1152.

Niaz F, Quraishi A .2002. Effect of growth regulators on the regeneration potential of two sugarcane cultivars SPF-213 and CPF- 237. J. Biol. Sci, 5(10): 1081-1083.

Maureen M, Fitch M, Moore H, 1993. Long-term culture of embryogenic sugar cane callus.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 335-343.

Owais W.M, Kleinhofs A, 1988. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. *Mutation Research* 197: 313–323.

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

Rahman M.H, Rajora O.P. 2001. Micrisatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen (*Populous tremuloids*). Plant Cell Rep (20): 531-536.

Sadat Sh, Soltani Hoveize M. 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.

Sadat Sh, Bihamta M.R, Emam S.E, 2008. Effect of plant growth regulators on callus induction and regeneration of sugar cane variety CP73-21. J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(5).

Siddiqui SH, Khatri A, Khan AI, Javed MA, Dhar NA, Nizamani GS.1994. In vitro culture a source of genetic variability and an aid to sugarcane improvement. Pak. J. Agric. Res, 15: 127-133.

Smiullah, Ahmad Khan F, Abdullah, Afzal A, Aslam Javed M, Iqbal Z, Iftikhar R and J .I Wattoo, **2001**. *In* vitro regeneration, detection of somaclonal variation and screening for mosaic virus in sugar cane (*Saccharum* spp.) somaclones. International Journal of the Physical Sciences, 11(48): 10841-10850.

Yazdisamadi B. Rezaee A. Valizadeh M. 1977. Statistical initiatives in agricultural research. Tehran University, 753 pp.

Induced mutagenesis using sodium azide (NAN3) on sugar cane regeneration from callus in variety CP69-1062

S. S. Sayahi[*1], L. Mirpanahi[2]

Received date: 4 Sep 2016
Accepted date: 13 Feb 2017

Abstract

In order to investigate the mutagenicity of mutagenic substances NAN3 CP69-1062 in sugarcane varieties in different amounts on the first round callus obtained from leaf meristem were applied. In the first six Sterilization treatment with four replications in a completely randomized design on the primary leaf explants derived from the meristem were applied. 5 treatments with 4 replications in a completely randomized design callus explants for callus induction from the primary leaves were studied. 2,4- D to a value of 4 and 3 mg resulted in callus were highest. For induction of mutation on differentiated cells obtained from primary leaves regression equation Y= 5.84+1.78 X presented. Using calculated equation, LD50 was calculated and as 0.34 mm was introduced as dose that resulted in %50 mortality of callus. Also, for callus regeneration, 6 treatments of regeneration were evaluated in factorial experiment based on completely randomized design with four replications. Kin hormone levels in the second and third levels of NAA in the above treatments formed. 3 milligrams per liter of Kin and 0.1 milligrams per liter of NAA were significant different from other treatments at α= 0.01. Rooting shoots in the basic MS medium with half the nitrate concentration of auxin IBA and NAA with different values of the two had been completed, was conducted. The results showed that the basic MS medium with half the concentration of nitrate was completed, along with NAA at a rate of 0.01 mg greatest impact on rooting germ have been regenerated.

Key words: Sugar cane, Mutation, Callus, Regeneration, Rhizogenesis.