مقاله پژوهشی

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال شانزدهم، شماره ۶۴، زمستان ۱۴۰۰ / صفحات: ۱۵۰-۱۴۱
Doi: 10.30495/iper.2021.686565 ***Dor: 20.1001.1.76712423.1400.16.63.10.2***

غربال ژنوتیپهای مختلف نیشکر (*Saccharum ssp* L.) مقاوم به سرما با استفاده از شاخص‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی

محمود فولادوند[۱]، آسا ابراهیمی[۱*]، مهدی رهایی[۲]، وحید شریعتی جونی[۳]

[۱]گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲]گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، ایران

[۳]گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲٤

چکیده

نیشکر گیاهی است که تا مدار حدود ۳۲ درجه شمالی و جنوبی در نقاط مختلف جهان کشت می‌گردد. مقاومت این گیاه نسبت به سرما پایین است. با توجه به حساسیت نیشکر به سرما، به منظور شناسایی مسیرها و ژنهای دارای بیان افتراقی در ارقام نیشکر در هنگام تنش سرما و استفاده از آنها در برنامه اصلاح نبات نیشکر، پس از وقوع سرمای C□۱/۲ زیر صفر در دیماه ۱۳۹٤، تعداد ٤٥٤ رقم نیشکر با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، در یکی از مزارع تحقیقاتی موسسه تحقیقات نیشکر خوزستان مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول با استفاده از شاخص‌های مورفولوژی، ارقام متحمل و حساس در برابر سرما انتخاب شدند. در مرحله دوم در سال ۱۳۹۵، پس از تنش سرما، شاخص‌های بیوشیمیایی از قبیل پرولین و مالون دی آلدئید، در ارقام متحمل(منتخب مرحله اول)، افزایش بیشتری پیدا کرد و بر اساس نتایج دو مرحله، دو رقم BR00-01 و TUC66-107 به‌ترتیب به‌عنوان متحمل‌ترین و حساسترین رقم نسبت به سرما شناسایی شدند. نتایج بررسی واکنش مورفولوژی و بیوشیمیایی ارقام نیشکر به تنش سرما نشان داد که ارقامی که طبق شاخص‌های مورفولوژیکی، میزان تحمل بیشتری به تنش سرما دارند، همین ارقام در مرحله بررسی بیوشیمیایی نیز از نظر میزان پرولین و مالون دی آلدئید در سطح بالاتری نسبت به ارقام حساس قرار دارند. همچنین همبستگی بالایی بین صفات مورفولوژیکی و شاخص‌های بیوشیمیایی از نظر میزان تحمل و مقاومت به سرما وجود داشت. بنابراین، با استفاده از اندازه‌گیری شاخص‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، می‌توان پیش از انجام بررسی مولکولی و بدون صرف هزینه های زیاد، نوع واکنش ارقام نیشکر به تنش سرما را بررسی نمود و در هنگام غربال کلون‌های نیشکر در مراحل مختلف اصلاحی، با اندازه‌گیری مقدار شاخص‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی نیشکر در هنگام تنش سرما، نسبت به غربال و انتخاب کلون‌های برتر اقدام نمود.

واژه‌های کلیدی: نیشکر، غربال مورفولوژیکی، تنش سرما، مقاومت به سرما، شاخص بیوشیمیایی

*نویسنده مسئول: dr.asaebrahimi@gmail.com

مقدمه

با توجه به اهمیت نیشکر (*Saccharum ssp* L.) در تولید قند و زراعت این محصول در نواحی جنوبی ایران، شناخت تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های زراعی جهت استفاده آنها در برنامه های به‌نژادی ضروری است. محدودیت‌ها و مشکلاتی نظیر تنش سرما، شوری اراضی تحت کشت، بالا بودن سطح آب زیر زمینی، بادهای داغ منطقه، کمبود آب و سایر عوامل باعث کاهش عملکرد در واحد سطح شده است. بنابراین لزوم جایگزینی واریته‌های موجود با ارقام اصلاحی جدید، اجتناب ناپذیر می‌باشد. بررسی وضعیت سرمازدگی مزارع نیشکر طی یک دوره ۳۸ ساله در هفت‌تپه نشان داد که در هنگاه کاهش دما تا حدود ۲ درجه سلسیوس، علائم ظاهری اثر سرما بر روی نیشکر با زائل شدن دانه‌های کلروفیل مشاهده می‌شود و در این‌صورت بخصوص برگ ارقام حساس به سرما به رنگ بنفش درآمده که دلیل بر ظاهر شدن مواد رنگی آنتوسیانین۱ می‌باشد. این علائم در حدود ۲ تا سه هفته بعد از وقوع سرما ظاهر می‌گردد و شبیه حالت اثر کمبود فسفر۲ در گیاه می‌باشد (Patrick et al., 2014). در بررسی‌های انجام شده، ارقامی که میانگره‌های بهم فشرده و همچنین غلاف چسبیده به ساقه داشتند نسبت به سرما مقاومتر بودند. در روند طبیعی سرما، صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی گیاه نیشکر به علت تنش سرما تغییر می‌کند. پرولین نقش مهمی در حفاظت ساختار سلولی، حمل و نقل و تنظیم اسمزی در سلول‌ها دارد. به همین دلیل در تقویت ظرفیت نگهداری آب گیاهان و محافظت از بافت گیاه در معرض آسیب‌های تنش کم دما کمک می‌کند (Park et al., 2015). مقدار زیادی از تجمع پرولین آزاد در گیاهان به منظور کمک به مقاومت در برابر تنش‌های محیطی یافت شده است (Kim et al., 2001). در این مطالعه محتوای پرولین در مرحله اول کاهش دما، در سطح پایینی قرار داشت اما بعد از کاهش درجه حرارت و تداوم آن، به شدت بالا رفت که این نشان دهنده واکنش گیاه جهت مقابله با سرماست. در ارگانیسم‌های گیاهی تحت شرایط تنش سرما، پیری یا هر اتفاق ناخوشایندی، وقتی که رادیکال اکسیژن فعال به سطح معینی در بافت گیاهی برسد، پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اتفاق می‌افتد. مالون‌دی‌آلدئید۳ یکی از محصولات پراکسیداسیون چربی غشایی است که محتوی آن می‌تواند درجه پراکسیداسیون چربی غشای سلولی و میزان آسیب در سلول را نشان دهد (Park et al., 2015). تحت تنش دمایی پایین، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیشتر از یک حد معین در نیشکر باعث پراکسیداسیون چربی غشایی می‌شود که آنهم باعث تجمع MDA می‌شود. زمانیکه درجه حرارت محیط کاهش پیدا می‌کند، پراکسیداسیون چربی غشایی در سلول‌های برگ نیشکر شدت پیدا می‌کند و باعث افزایش محتوای MDA می‌شود (Kim al., 2001). تاثیر دمای پایین در نیشکر پیچیده است، نه تنها در مورفولوژی بلکه در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی اثر گذار است. تنش سرما بر واکنشهای فیزیولوژیک و میزان بیان ژن‌ها در مسیرهای بیوسنتزی و متابولیسمی تأثیرگذار و شدت این واکنش‌ها در ارقام مقاوم و حساس متفاوت می‌باشد. مقاومت به سرما صفتی کمی بوده و شدیدا تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد و گزینش برای این صفت نیاز به شناسایی مسیرهای بیوسنتزی، متابولیکی و استفاده از ابزارهای مکملی مانند نشانگرهای مولکولی دارد. با توجه به اینکه در منابع مختلف بر موثر بودن اثرات افزایشی و غالبیت ژن‌ها در کنترل مقاومت به سرما

1. Anthocyanin
2. Phosphorus deficiency
3. MDA

اشاره شده است، بنابر این شناسایی QTLهایی با اثرهای افزایشی و غالبیت مرتبط با سرما و نشانگرهای مرتبط با این QTLها در برنامه گزینش و اصلاح برای این صفت می‌تواند راهگشا باشد. با توجه به وقوع سرمای زیر صفر درجه سانتیگراد در دیماه هر سال و ایجاد خسارات زیاد به ارقام حساس نیشکر و در راستای تولید و معرفی ارقام مناسب دشت خوزستان، بررسی عکس‌العمل ارقام مختلف نیشکر به سرما با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و تعیین همبستگی بین آنها جزء در دستور کار قرار گرفت. بر این اساس در دیماه سال ۱۳۹٤ و یک هفته بعد از وقوع سرمای ۱/۲- درجه سلسیوس، واکنش و میزان تحمل تعداد ٤٥٤ رقم نیشکر، به سرما با استفاده از صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی، مورد بررسی قرار گرفت. انجام تحقیق اخیر در مورد سایر تنش‌های محیطی شامل خشکی و شوری و شناسایی ژن‌های مشترک در این تنش‌ها نیز توصیه میشود.

مواد و روش‌ها

۱- مرحله اول: انتخاب ارقام و بررسی مورفولوژی: به منظور غربال اولیه و شناسایی مورفولوژیکی و ارائه روشی جهت تشخیص ارقام نیشکر متحمل به سرما، تعداد ٤٥٤ رقم نیشکر که از کشورهای کوبا، برزیل، هند، آمریکا، آرژانتین، آفریقای جنوبی و... جمع آوری و کشت شده بودند، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. اوایل دیماه ۱۳۹٤ تنش طبیعی سرما ۱/۲- درجه سلسیوس برای مدت زمان پنج ساعت در شب، اتفاق افتد. یک هفته بعد از وقوع سرما، کل ارقام ژرم‌پلاسم، مورد بررسی مورفولوژیکی از نظر صفات مرتبط با تحمل به سرما قرار گرفتند (Robert and Bewlery., 1980). در این مرحله میزان خسارت به مریستم انتهایی، میزان کاهش سبزی برگ، میزان خشکیدگی کانوپی، میزان خسارت جوانه‌ها، میزان توسعه مغز[1] بعد از تنش سرما در همه ارقام اندازه‌گیری شد. بسته به میزان بروز این تغییرات در هر رقم، نمره‌ای به هر یک از ارقام داده شد، بطوریکه به بروز حالت شدید، عدد ۳، حالت متوسط صفت، عدد ۲، حالت خفیف صفت، عدد ۱ و حالت بدون خسارت صفت، عدد صفر منتسب گردید. در ادامه نمرات کمی کسب شده توسط هر رقم در همه حالت‌ها با هم جمع و تحت عنوان " میزان تحمل سرما (C.T۲) "ثبت گردید. در این روش ارقامی که " میزان حساسیت به سرما " کمتری را بدست آوردند به عنوان ارقام متحمل و ارقامی که " میزان تحمل سرما " بیشتری را کسب کردند، به عنوان ارقام حساس تقسیم بندی شدند. بیشترین مقداری که در این روش ثبت گردید، عدد ۱۲ و کمترین مقدار، ۳/۸۵ بود که عدد ۱۲ به رقم BR00-01 و عدد ۳/۸۵ هم به رقم TUC66-107 منتسب گردید. لذا این اعداد به عنوان معیار مورفولوژیکی مقاومت یا حساسیت به سرما، انتخاب و بقیه اعداد نسبت به آنها سنجیده و مرتب شدند. شیوه اندازه‌گیری صفات فوق طبق نتایج نهایی پروژه سرما در موسسه تحقیقات نیشکر (۲۰۱۰) بصورت نمره دهی کیفی در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

در ابتدا با استفاده از آزمون t، داده‌های حاصل از میانگین صفت "میزان تحمل سرما (C.T.) "درکل ارقام، آنالیز و بر اساس آن، تعداد ٥٤ رقم به‌عنوان ارقام مقاوم و ٤۰۰ رقم به‌عنوان ارقام نیمه حساس و حساس در مقابل تنش سرما ، مشخص شد.

٥٤ رقم مقاوم در شهریورماه ۱۳۹٥ در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی کشت شدند. در دیماه همان سال مجددا همین ٥٤ رقم از نظر صفت "میزان تحمل سرما (C.T.) " و طبق دستورالعمل مذکور در قدم نخست، مورد بررسی، و داده ها با استفاده از نرم‌افزار

1. Pith
2. Cold tolerance (C.T)

SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و از بین آنها، تعداد ۵ رقم مقاوم انتخاب شدند. از بین ٤٠٠ رقم حساس و نیمه حساس هم تعداد ۵ رقم خیلی حساس انتخاب شدند (جدول ۲). در مرحله دوم، در سال ۱۳۹۵، در سه تاریخ ١٤ آبان، ٢٦ آذر و ١٧ دیماه، مقدار شاخصهای بیوشیمیایی شامل پرولین و مالون دی‌آلدئید، در۱۰ رقم منتخب مرحله قبل (۵ رقم مقاوم و ۵ رقم حساس) بر اساس دستورالعمل‌های موجود اندازه گیری شد.

جدول ۱: نمره دهی صفات مورد بررسی در مرحله بررسی مورفولوژیکی

نمره کمی	عبارت توصیفی نشاندهنده وضعیت صفت (نمره کیفی)	صفت مورفولوژی مورد اندازه‌گیری
3	بدون خسارت	میزان خسارت مریستم انتهایی
2	خفیف	
1	متوسط	
0	شدید	
3	زیاد	درصد سبزینگی کانوپی
2	متوسط	
1	کم	
0	خشکیدگی کامل	
3	بدون خسارت	میزان خسارت جوانه های ساقه
2	خفیف	
1	متوسط	
0	شدید	
3	بدون توسعه یافتگی	نسبت توسعه مغز
2	توسعه یافته کم	
1	توسعه یافته متوسط	
0	توسعه یافته زیاد	

۲- مرحله دوم : بررسی بیوشیمیایی ارقام منتخب: در این مرحله اندازه گیری پرولین و مالون دی آلدئید بشرح زیر انجام گرفت.

پرولین: جهت اندازه‌گیری پرولین از روش بیتز و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد و محتوی اسید آمینه پرولین با استفاده از روش رنگ سنجی نین هیدرین اندازه گیری شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، میزان پرولین هر نمونه محاسبه و بر حسب میکرومول در گرم وزن تر گیاه بیان شد.

مالون دی آلدئید: جهت اندازه گیری MDA از روش والنتوویک و همکاران (Valentovic et al., 2006) استفاده شد. به منظور تعیین غلظت مالون دی آلدهید در برگ، ابتدا نیم گرم برگ تازه را در محلول ۲۰ درصد تیوکلرو استیک اسید[1] (TCA) که حاوی ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید[2] بود کاملاً پودر کرده و آنگاه این مخلوط به‌مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در حمام بن ماری حرارت داده شد. سپس این مخلوط را در حمام یخ سرد کرده و طبق روش والنتوویک و همکارانش غلظت مالون دی آلدئید در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری شد.

1. Tiocloro Acetic Acid
2. Barbituric Acid

پس از آنالیز داده‌های بیوشیمیایی، از بین ۱۰ رقم مرحله قبل تعداد ۲ رقم شامل یک رقم به‌عنوان مقاومترین (BR00-01) و یک رقم هم به‌عنوان حساسترین (TUC66-107) رقم به تنش سرما انتخاب شدند.

ضمن بررسی صفات فوق از هر رقم یک نمونه ۱۰ ساقه‌ای جهت بررسی صفات کیفی، شامل: درصد مواد جامد محلول در شربت[1] درصد قند موجود در شربت[2]، درصد خلوص شربت[3] گرفته شد، تا از آن بتوان جهت انجام آنالیز این صفات از نظر ثبات کیفیت شربت آنها پس از وقوع سرما و ارتباط آنها با تنش سرما استفاده نمود. درصد مواد جامد محلول در شربت توسط دستگاه آلمانی بریکس سنج[4] مدل SUMA، درصد قند موجود در شربت هم توسط دستگاه آلمانی پل سنج[5] مدل SUMA و درصد خلوص شربت از فرمول زیر محاسبه گردید.

PTY= %POL / % Brix *100

نتایج

نتایج اندازه گیری صفات "میزان حساسیت به سرما"، " درصد خلوص شربت" و" درصد قند " در جدول شماره ۳ آورده شده است. آنالیز واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات مذکور با استفاده از نرم افزار SAS و آزمون مقایسه میانگین دانکن انجام شد (جداول ٤ و ٥). بررسی جدول تجزیه واریانس نشان داد که بین ارقام نیشکر مورد بررسی از نظر این صفات اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. به علت زیاد بودن تعداد داده، در این مرحله از آوردن جدول مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده همه ارقام مورد بررسی صرفنظر شده و تنها به ذکر بالاترین ارقام از نظر صفات مذکور اکتفا شده است. مقایسه میانگین صفت درصد خلوص شربت در ارقام مورد بررسی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، نشان داد که ارقام CP50-28 و BR00-01 به‌ترتیب با ۸۸/۷٦ و ۸۸/۵۵ در گروه اول، ارقام C88-356 و BJ97-19 به‌ترتیب با ۸۸/٥٤ و ۸۸/۳ در گروه سوم و رقم L61-67 با ۸۷/۲۷ درصد در گروه چهارم قرار می‌گیرند. این بررسی همچنین نشان داد که ارقام با بالاترین درجه تحمل به سرما از نظر درصد خلوص شربت نیز جزو ارقام برتر هستند و کیفیت شربت خود را پس از سرما به‌مدت بیشتری نسبت به ارقام حساس نگهداری می‌کنند.

این بررسی همچنین نشان داد که صفت "میزان حساسیت به سرما " و درصد قند ارتباط معنی‌داری با هم ندارند. نتیجه بررسی‌های مرحله اول نشان داد که از بین ٤٥٤ رقم مورد بررسی، تعداد ٥٤ رقم در محدوده ارقام متحمل و حساس به سرما قرار می‌گیرند. محتوای پرولین و مالون دی‌آلدهید (MDA) در سه تاریخ ١٤ آبانماه، ٢٦ آذرماه و ١٧ دیماه ١٣٩٥، بر اساس دستور العمل‌های موجود اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که محتوای این سه شاخص، در ارقام BR00-01، C88-356، BJ97-19، L61-67 و CP50-28، بالاتر از ارقام DB96-144، B04-111، B01-343، TUC66-107 و TRITON می‌باشد. در شکل‌های ۱ و ۲ به‌ترتیب محتوای پرولین و مالون دی آلدهید (MDA) در ارقام مورد بررسی و در سه تاریخ مذکور مشاهده می‌شود. در جدول ٤ ضریب همبستگی پیرسون (r) بین "میزان تحمل سرما" با محتوای پرولین و مالون دی آدئید با استفاده از نرم افزار SPSS محاسبه شده است. همانطوریکه در جدول آمده است همبستگی بالایی بین "میزان تحمل سرما" و شاخص‌های بیوشیمیایی وجود دارد.

1. Brix
2. POL
3. PTY
4. Brixometer
5. Sacchaimeter

جدول ۲: ارقام حساس و متحمل به سرما در بررسی بیوشیمیایی

منشاء	نام رقم	عکس‌العمل به سرما
Barbados	DB96144	گروه حساس
India	B04111	
India	B01343	
Argentina	TUC66-107	
Unknown	TRITON	
Cuba	C88-356	گروه مقاوم
Barbados	BR00-01	
Barbados	BJ97-19	
Louisiana	L61-67	
Florida	CP50-28	

جدول ۳: نتایج اندازه گیری صفات "میزان تحمل سرما" و "درصد خلوص شربت "

درصد خلوص شربت	میزان تحمل سرما	نام رقم	ردیف	نوع عکس العمل
89.12	11.35	C88-356	1	گروه مقاوم
88.94	11.2	BR00-01	2	
89.02	11.1	BJ97-19	3	
87.53	12	L61-67	4	
88.56	10.65	CP50-28	5	
83.14	4.15	DB96144	1	گروه حساس
83.11	4.12	B04111	2	
83.45	4.35	B01343	3	
78.35	3.85	TUC66-107	4	
84.36	5.32	TRITON	5	

جدول٤: همبستگی بین میزان تحمل سرما و محتوای پرولین

محتوای پرولین	محتوای مالون دی آلدئید		
.823**	.813*	ضریب همبستگی پیرسون	میزان حساسیت به سرما
۰/۰۰۳	۰/۰٤	سطح معنی داری	
10	10	تعداد	

** and * = Significant l at 1% and 5% Level

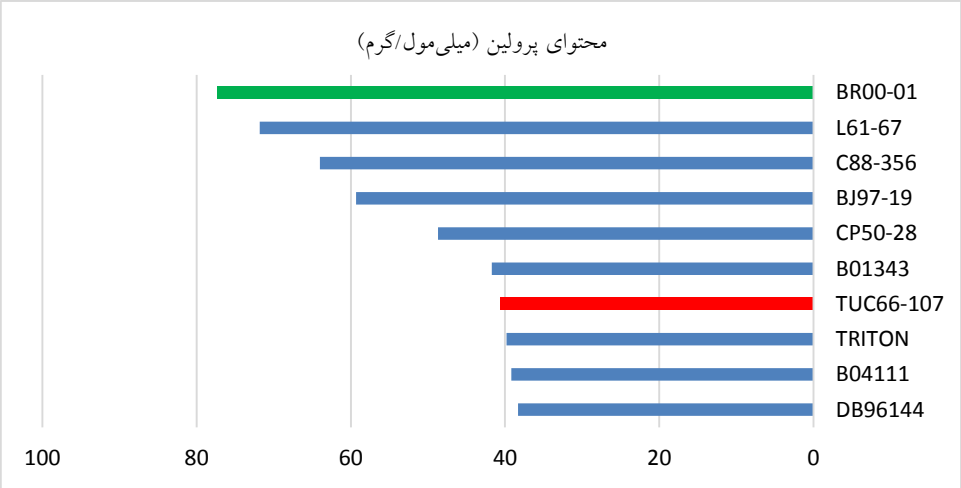
جدول ۵: مقایسه میانگین صفات مرتبط با تنش سرما در ارقام نیشکر

درصد قند (POL)			درصد خلوص شربت (PTY)		
نام رقم	متوسط	گروه دانکن	نام رقم	متوسط	گروه دانکن
SP70-1143	17.33	A	C88-356	88.89	A
C90-469	17.20	A	L61-67	88.84	A
CO-285	17.14	A	BJ97-19	87.76	A
FG03104	17.00	A	BR00-01	86.70	A
CP04-1935	16.07	A	CP50-28	86.32	A

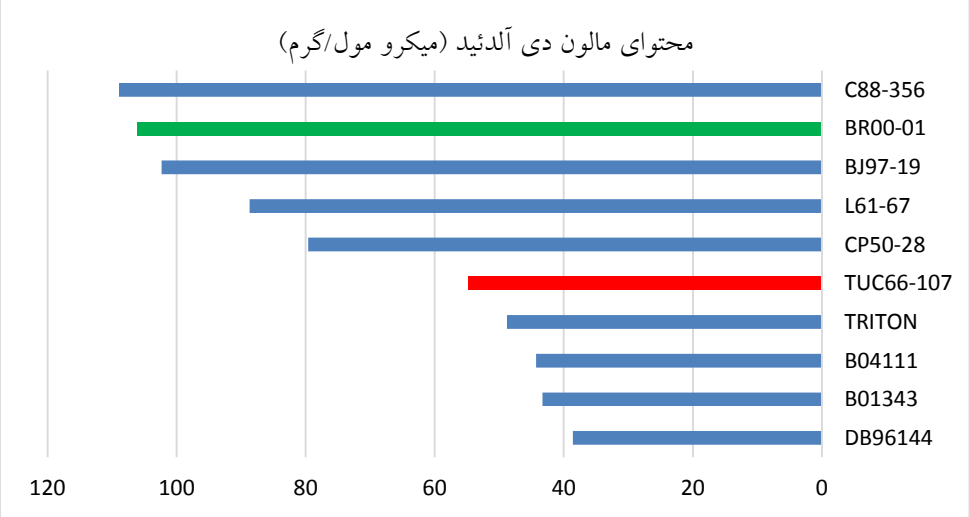
جدول ٦: تجزیه واریانس صفات مرتبط با تنش سرما در ارقام نیشکر

میانگین مربعات POL	میانگین مربعات PTY	میانگین مربعات C.T	درجه آزادی	منبع تغییرات
1.91	14.41	0.52	2	نکرار
3.53ns	89.26**	17.87**	53	تیمار
2.65	0.255	0.16	106	خطا

**= Significant l at 1% Level ns= non-Significant



شکل ۱: محتوای پرولین در ارقام مورد مطالعه.



شکل ۲: محتوای مالون دی آلدهید (MDA) در ارقام مورد مطالعه

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که روش غربال مورفولوژیکی ارقام نیشکر نسبت به سرما می‌تواند به عنوان یک روش جهت بررسی اولیه عکس‌العمل ارقام نیشکر به سرما معرفی شود. به عبارتی با استفاده از این روش می‌توان تعداد زیادی ژنوتیپ نیشکر را بعد از وقوع سرما مورد بررسی و مطالعه قرار داد و با این کار در وقت و هزینه صرفه جویی نمود. این روش همچنین می‌تواند به عنوان یک روش قبل از انجام بررسی مولکولی ارقام نیشکر از نظر میزان تحمل به سرما استفاده شود. بررسی‌های مرحله اول نشان داد ارقامی که از نظر مقاومت به سرما بالاتر از بقیه ارقام قرار می‌گیرند، خلوص شربت خود را مدت بیشتری نگه می‌دارند. این بررسی همچنین نشان داد که صفت مقاومت به سرما و درصد قند همبستگی معنی‌داری با هم ندارند.

با کاهش درجه حرارت، محتوای پرولین در ارقام نیشکر، روند صعودی بخود می‌گیرد، که در ماه ژانویه با کاهش طبیعی دما، به بیشترین مقدار خود میرسید (شکل۲). پرولین نقش مهمی در حفاظت ساختار

سلولی، حمل و نقل و تنظیم اسمزی در سلول‌ها دارد. به همین دلیل در تقویت ظرفیت نگهداری آب گیاهان و محافظت از بافت گیاه در معرض آسیب‌های تنش کم دما کمک می‌کند. مقدار زیادی از تجمع پرولین آزاد در گیاهان به منظور کمک به گیاهان برای مقاومت در برابر تنش‌های محیطی یافت شد (Jiang, M.Y et al. 1997). افزایش محتوای پرولین در برگ های نیشکر می تواند توانایی تنظیم اسمزی سلول ها را بهبود بخشد، بنابراین برای محافظت از بافت‌های گیاهی، از آسیب های دمای پایین، مناسب است (Rafaela et al., 2011). در این بررسی، محتوای اسید آمینه آزاد و پرولین در مرحله اول کاهش دما، در سطح پایینی قرار داشت، اما بعد از کاهش درجه حرارت و تداوم آن، محتوی اسید آمینه آزاد و پرولین در برگ‌ها به شدت بالا رفت، که این نشان دهنده استراتژی گیاه جهت مقابله با سرماست. محتوای پرولین در ارقام مورد مطالعه متفاوت و در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس، در هرسه تاریخ نمونه‌برداری، بیشتر بود. افزایش محتوای پرولین در برگ های نیشکر می تواند توانایی تنظیم اسمزی سلول ها را بهبود بخشد، بنابراین برای محافظت از بافت‌های گیاهی، از آسیب های دمای پایین، مناسب است (Rafaela et al., 2011).

داده‌ها همچنین نشان داد که محتوای MDA در برگ ارقام مورد مطالعه از زمان شروع سرد شدن هوا، افزایش می‌یابد (شکل ۳) و با کاهش دما این افزایش هم بیشتر می‌شود. با این حال، ارقام مورد مطالعه در سطح MDA با هم تفاوت داشتند. به نظر می‌رسد که تمام انواع نیشکر به طور جدی در اوایل شروع سرما، صدمه ندیده و می‌توانند در برابر استرس‌های کوتاه مدت سرما، مقاومت نمایند. اما از نظر مقاومت در برابر دمای شدید، تفاوت‌های متنوعی بین ارقام وجود دارد. بر اساس نتایج حاصل، همبستگی بالایی بین میزان مقاومت به سرما و شاخص‌های بیوشیمیایی وجود دارد. در روند طبیعی سرما، صفات مورفولوژیکی و شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه نیشکر، به علت تنش دمایی پایین، تغییر می‌کند. در سیستم نمره‌دهی صفات مورفولوژیکی، ارقام متحمل و حساس به‌ترتیب بالاترین و پایین‌ترین مقدار را بخود اختصاص دادند.

در ارگانیسم‌های گیاهی تحت شرایط تنش سرما، پیری یا هر اتفاق ناخوشایند دیگر، وقتی که رادیکال اکسیژن فعال به سطح معینی در بافت گیاهی برسد، پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اتفاق می‌افتد. MDA یکی از محصولات پراکسیداسیون چربی غشایی است که محتوی آن می‌تواند درجه پراکسیداسیون چربی غشای سلولی و میزان آسیب در سلول را نشان دهد. تحت تنش دمایی پایین، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیشتر از یک حد معین در نیشکر باعث پراکسیداسیون چربی غشایی می‌شود که آنهم باعث تجمع MDA می‌شود (Rafaela et al., 2011).

در این مطالعه که روند کاهش دما از اواسط آبانماه شروع گردید، نیز در ابتدا، مقدار MDA در واریته‌های نیشکر در سطح پایینی قرار داشت. اما مقدار آن بعد از کاهش دمای محیط، افزایش یافت. بنابراین می‌توان گفت که تحمل گیاهان نیشکر در دماهای پایین در یک محدوده خاصی تحقق می یابد و خارج از آن را تحمل نمی‌کنند. زمانیکه درجه حرارت محیط به نزدیک صفر کاهش پیدا می‌کند، پراکسیداسیون چربی غشایی در سلول‌های برگ نیشکر شدت پیدا می‌کند و باعث افزایش محتوای MDA می‌شود (Huang et al., 2010). تاثیر دمای پایین در نیشکر پیچیده است، نه تنها در مورفولوژی بلکه در فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نیز اثر گذار است (Chen et al., 2012). واریته‌های مختلف نیشکر ظرفیت سازگاری متنوعی

به دمای پایین دارند. بنابراین سنجش میزان مقاومت واریته‌های مختلف نیشکر با استفاده از یک شاخص فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بسیار سخت است. ارزیابی جامع با استفاده از شاخص‌های چندگانه روش تابع عضویت در انگور (Zhang et al.,1999)، ذرت (Huang et al., 2010) و گندم (Chen et al., 2012) و سایر محصولات و قابلیت اطمینان غربالگری ثابت شده است. بر اساس گزارش‌های موجود در مورد سایر محصولات، تجزیه و تحلیل تابع عضویت با استفاده از شاخص‌های فیزیولوژیکی متعدد به کار برده شده است. در مطالعه حاضر نیز به منظور بهبود صحت ارزیابی، بررسی مقاومت به سرما در واریته‌های مختلف نیشکر، به طور جامع صورت گرفت. این امر می‌تواند مرجعی برای تحقیقات بیشتر و ارزیابی تنوع در اصلاح و تولید واریته‌های جدید نیشکر باشد. همانطوریکه در جداول ٤ و ٥ ملاحظه میشود، همبستگی بالایی بین صفات مورفولوژیکی و شاخص‌های بیوشیمیایی دیده می‌شود. این موضوع بیان کننده همبستگی بین این صفات بوده و نشان میدهد که با کاهش دما مقدار شاخص‌های بیوشیمیایی افزایش یافته و ارقام تحت تنش دچار تغییرات مورفولوژیک می‌شوند. بنابراین با اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی مورد استفاده در این پژوهش و استفاده از شاخص‌های بیوشیمیایی می‌توان تعداد زیادی از ارقام و ژنوتیپهای نیشکر متحمل و حساس به سرما را بررسی و در وقت و هزینه صرف جویی نمود.

نتیجه گیری نهایی

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که تنش سرما بر واکنش‌های فیزیولوژیک و مقدار تولید شاخص‌های بیوشیمیایی تأثیرگذار بوده و شدت این واکنش‌ها در ارقام مقاوم و حساس متفاوت می‌باشد. در روند طبیعی سرما، صفات مورفولوژیکی و شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه نیشکر، به علت تنش سرما، دستخوش تغییر می‌شوند. در پژوهش حاضر با کاهش دما، محتوای پرولین و مالون دی آلدئید در دو رقم مقاوم و حساس، شیب افزایشی داشت، با این تفاوت که مقدار این شیب در رقم مقاوم بیشتر از حساس بود. بنابراین گیاه نیشکر نیز مانند سایر گیاهان از این پتانسیل در جهت تحمل بیشتر سرما استفاده می‌نماید. و با سنجش مقادیر این شاخصها در کلونهای در حال بررسی در برنامه اصلاحی نیشکر به غربال و شناسایی کلونهای مقاوم و حساس به تنش سرما کمک خواهد نمود. انجام تحقیق اخیر در مورد سایر تنش‌های محیطی شامل خشکی و شوری و شناسایی صفات مورفولوژیک مرتبط با این تنش‌ها در نیشکر نیز توصیه می‌شود.

References

A group of researchers (2010). Final report of the cold project in sugarcane, Sugarcane Research and Training Institute of Khuzestan.

Bates, L.S., Waldern, R.P and Tear, ID. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205-207

Chen, L., Zhang, Y., Ren, Y., Xu, J., Zhang, Z., and Wang, Y. (2012). Genome-wide identification of cold-responsive and new microRNAs in Populus tomentosa by high-throughput sequencing. Biochem Biophys Res Commun Journal, 417: 892–896.

Gururaj, Hansigi. (2001). "Sugarcane Agriculture", Translated by Bahram Mirashkari, Tabriz, Islamic Azad University, Tabriz Branch.

Heinz, Don J. (1987). Sugarcane Improvement through Breeding, Hawaiian sugar planters Association New York, Amsterdam, Elsevier Publications

Huang, SQ., Xiang, AL., Che, LL., Chen, S., Li, H., Song, JB. and Yang, ZM. (2010). A set of miRNAs from Brassica

napus in response to sulphate deficiency and cadmium stress. Plant Biotechnol Journal, 8: 887–899.

Jiang, M.Y., Guo, S.Q. and Zhang, X.M. (1997). Proline accumulation in rice seedlings exposed to oxidative stress in relation to autoxidation. Acta Phytophysiolica Sinica Journal, 23(4): 347–352.

Kim, J.C., Lee, S.H., Cheong, Y.H., Yoo, C-M., Lee, S.I., Chun, H.J., Yun, D-J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Lim, CO. (2001). A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. Plant Journal 25 : 247–259.

Li, B., Duan, H., Li, J., Deng, XW., Yin, W. and Xia, X. (2013). Global identification of miRNAs and targets in Populus euphratica under salt stress. Plant Mol Biol Journal, 81(6): 525–539.

Mantri, N.L., Ford, R., Coram, T.E and Pang, E.C.K. (2007). Transcriptional profiling of chickpea genes, BMC Genomics Journal, 8:303-307

Park, J-W., Benatti, T.R., Marconi, T., Yu, Q., Solis-Gracia, N. and Mora, V. (2015). Cold Responsive Gene Expression Profiling of Sugarcane and *Saccharum spontaneum* with Functional Analysis of a Cold Inducible Saccharum Homolog of NOD26- Like Intrinsic Protein to Salt and Water Stress. PloS ONE 10(5): 125- 132

Patrick, F., Murilo, P., Florian, B., Daniel, Johnson and Rowan, S. (2014). Chilling and frost tolerance in Miscanthus and Saccharum genotypes bred for cool temperate climates. Journal of Experimental Botany, 13: 3749–3758

Rafaela, Queiroz., Maria, Durvalina., Sergio, Antonio., Domingues, Samira., Marcelo, Carlin. (2011). Biochemical and physiological responses of sugarcane cultivars to soil water deficiencies, Sci. Agric Journal. (Piracicaba, Braz.), 4: 469-476.

Rahimizadeh, M., Habibi, D., Madani, H., Mohammadi, H., Mehraban, A. and Sabet, A.M. (2007). The effect of micronutrients on antioxidant enzymes metabolism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. Helia Journal, 47: 167-174.

Reinhart, BJ., Weinstein, EG., Rhoades, MW., Bartel, B. and Bartel, DP. (2002). MicroRNAs in plants. Genes Dev 16: 1616–1626.

Robert, RC. and Bewlery, JD. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiology Journal, 65: 245–248.

Teulate, B., Monneveux, P.J., Borrieres, C., Souyrus, I., Charri, A. and This, D. (1997). Relationshipes between relative water content and growth parameters and water stress in barley, a QTL study. New Physiology Journal, 137: 99-107.

Valentovic, P., M, Luxova., L, Kolarovi and O, Gasparikora. (2006). Effect of osmotic stress on compatible solutes content, memberane stability and water relation in two maizes. Plant Soil Environment Journal. 52 (4):186-191.

Zhang, M.Q., Chen, RK and Lu, J.L. (1999). Effects of low temperature stress on the chlorophyll a fluorescence induction kinetics in the seedling of sugarcane. Fujian Agricultural University Journal, (Science & Technology Edition) 28(1): 1–7.

Zhou, SM., Kong, XZ., Kang, HH., Sun, X-D. and Wang, W. (2015). The Involvement of Wheat F-box Protein Gene TaFBA1 in the Oxidative Stress Tolerance of Plants. PLoS ONE Journal, 10(4): 117-127.

Journal of Plant Environmental Physiology, Serial 64, 16th year, Number 4, Winter 2022
Doi: 10.30495/iper.2021.686565
Dor: 20.1001.1.76712423.1400.16.63.10.2

Screening different cold-resistant sugarcane (*Saccharum ssp* L.) genotypes using morphological and biochemical indices

Mahmoud Fouladvand[1], Asa Ebrahimi[1]*, Mahdi Rahaie [2], Vahid Shariati Joni[3]
[1]Department of Biotechnology and Plant Breeding, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[2]Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Postal Code: 1439957131, Iran
[3]Department of Plant Molecular Biotechnology, National Research Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Received date: 2020/12/14 Accepted date: 2021/03/14

Abstract

Sugarcane is cultivated in different parts of the world up to a latitude of about 32 degrees north and south. The resistance of this plant to cold is low. Considering the sensitivity of sugarcane to cold, in order to identify the pathways and genes by differential expression in sugarcane cultivars during cold stress and employ them in sugarcane plant breeding programs, 454 sugarcanes were investigated using morphological and biochemical indices, in the Research Farm of Khuzestan Sugarcane Research Institute following the incidence of -1.2 ℃ temperature in the region in December 2015. In the first stage, the cold-tolerant or sensitive cultivars were selected using morphological indices. In the second stage, biochemical indices such as proline and malondialdehyde were measured in the tolerant cultivars (selected at the first stage) after a cold stress period in 2016, which showed increases in comparison with susceptible cultivars. According to the data obtained at the two stages, two cultivars, namely BR00-01 and TUC66-107, were identified as the most tolerant and sensitive to cold, respectively. Based on the results of morphological studies, the cultivars with a higher tolerance to cold stress were also hose with higher proline and MDA levels in the biochemical study stage compared with the sensitive cultivars. There was also a high correlation between morphological traits and biochemical indicators in terms of cold resistance. Therefore, by measuring morphological and biochemical indices, it is possible to determine to a large extent the type of reaction of a sugarcane cultivar to cold stress before doing molecular analysis and spending huge sums of money, and to select superior clones when sifting sugarcane clones at different breeding stages.

Keywords: Biochemical index, Cold resistance, Cold stress, Morphological screening, Sugarcane

*Corresponding author; Dr.asaebrahimi@gmail.com