فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد نوزدهم/ شمارهٔ دوم/ صفحات ۲۲۳-۲۱۱/ پاییز و زمستان ۹۸
DOI: 10.22084/ppt.2019.15173.1794

بهینه‌سازی تهیه و سترون کردن محیط‌کشت برای تکثیر پینه و باززایی گیاه در سه رقم نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) تجاری ایران

Optimization of Preparation and Sterilization of Culture Medium for Callus Proliferation and Plant Regeneration in Three Iranian Commercial Cultivars of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)

سحرشامنصوری[۱]، محمود شمیلی[۲] و مهرآنا کوهی دهکردی[۳*]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵
(مقاله پژوهشی)

چکیده

آلودگی میکروبی (قارچی و باکتریایی) محیط‌کشت یکی از مشکلات شایع در ریزازدیادی درون شیشه ای گیاهان است. در پژوهش حاضر دستیابی به بهترین روش سترون‌سازی و بهینه‌سازی تهیه محیط‌کشت برای تکثیر پینه و باززایی گیاه در سه رقم تجاری نیشکر ایران (CP48-103، CP69-1062 و CP57-164) موردمطالعه قرار گرفت. به‌منظور سترون‌سازی محیط‌کشت، ۱۲ تیمار در ۱۲ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی برای هر رقم به‌طور جداگانه بررسی شد. به‌منظور گزینش بهترین محیط‌کشت تکثیر پینه، ۵ تیمار شامل (2 mg l^{-1}) 2,4-D به‌همراه سطوح مختلف BAP در ۱۰ تکرار و برای دستیابی به بهترین محیط‌کشت باززایی، ۱۵ تیمار در ۱۰ تکرار شامل سطوح متفاوت اکسین و سیتوکنین در طرح کاملاً تصادفی موردبررسی قرار گرفت. تیمار حاوی کاربندازیم دو در هزار (۱۵ دقیقه)، اتانول ۷۰ درصد (۵۰ ثانیه)، هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد (حاوی پنج درصد کلر فعال) به همراه توئین ۲۰ (۱۵ دقیقه) و محیط‌کشت حاوی سفوتاکسیم (۲۰۰ پی‌پی‌ام) و جنتامایسین (پنج پی‌پی‌ام) با عدم آلودگی در ارقام CP69-1062 و CP57-164 و کم‌ترین درصد آلودگی برای رقم CP48-103 بهترین نتیجه را در سترون‌سازی به‌همراه داشت. در بررسی رشد پینه‌ها، تیمار TC_5 شامل (2 mg l^{-1}) 2,4-D + (0.5 mg l^{-1}) MS + BAP بیش‌ترین رشد و تکثیر پینه را نشان داد. پس از گذشت ۴۵-۳۰ روز از کشت پینه‌ها روی محیط باززایی، تیمارهای (0.5 mg l^{-1} Kinetin و 0.5 mg l^{-1} BAP)، (3 mg l^{-1} Kinetin و 0.5 mg l^{-1} NAA) و (3 mg l^{-1} Kinetin و 0.1 mg l^{-1} NAA) به‌ترتیب در رقم‌های CP48-103، CP57-164 و CP69-1062 با میانگین ۷۰، ۶۰ و ۵۰ درصد بالاترین درصد باززایی گیاه را به‌همراه داشتند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، سیتوکینین، کاربندازیم، توئین ۲۰، سفوتاکسیم، جنتامایسین

۱ و ۳. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استادیار پژوهشی، موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان، اهواز، ایران
*: نویسنده مسئول Email: m.koohi@gmail.com
این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده اول به‌راهنمایی مهرآنا کوهی دهکردی است.

مقدمه

نیشکر با نام علمی (*Saccharum oficinarum*) گیاهی دائمی از قبیله آندروپوگونه، خانواده پوآسه، زیرخانواده پانیکوئیده و متعلق به جنس ساکاروم می‌باشد این گیاه ازجمله گیاهان مهم صنعتی چندساله است و جزء ده محصول استراتژیک دنیا به حساب می‌آید (حمودی و همکاران، ۱۳۹۲). در حال حاضر نیشکر در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری به‌عنوان گیاه زراعی اصلی تأمین‌کننده شکر مصرفی مردم کشت می‌گردد (بهمنی، ۱۳۹۰). اصلی‌ترین محصولی که از نیشکر استحصال می‌شود، شکر است. مقدار شکر استحصال شده برای هر رقم با شرایط جغرافیایی و اقلیمی متفاوت می‌باشد. اما معمولاً بین ۱۰ تا ۱۲ درصد برای هر تن نی متفاوت است. از هر هکتار به‌طور متوسط ۹ تا ۱۲ تن شکر به‌دست می‌آید، هم‌چنین بعد از استخراج قند، ملاس و تفاله آن محصول جانبی هستند که از آن‌ها به‌ترتیب در تهیه الکل و تغذیه دام استفاده می‌شود (موذن رضا محله و همکاران، ۱۳۹۲). نئوپان، فورفورال، خمیرمایه، صمغ، ملامین، پارچه، کاغذ، سرکه و انواع مواد شیمیایی و دارویی متنوع دیگر نیز از این محصول به‌دست می‌آید (برات شوشتری و همکاران، ۱۳۸۷). کلیه ارقام زراعی نیشکر از جنس و گونه *S. officinunarum* می‌باشند و از مشخصات مهم این گونه می‌توان به بالا بودن درصد قند، برگ‌های پهن، پایین بودن درصد مواد خشبی و ضخیم بودن ساقه اشاره نمود. مقدار قند ذخیره شده در ساقه نیشکر در ارقام مختلف حدود ۱۴ تا ۱۶ درصد است و گاهی اوقات به ۱۸ درصد نیز می‌رسد (افکاری، ۱۳۸۸).

افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فرآورده‌های گیاهی و دامی در جهان یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را در دهه‌های اخیر به این فکر ترغیب نموده تا با استفاده از شیوه‌های جدید در حفظ محیط‌زیست و عدم‌تغییر بنیادی در طبیعت، دست به تولید بهتر و بیش‌تر محصولات گیاهی بزنند. یکی از این روش‌های مدرن، استفاده از فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی است که از این طریق می‌توان نسبت به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی، دارویی، مرتعی و کشاورزی اقدام نمود (شاه‌پیری و همکاران، ۱۳۸۳) از طرف دیگر این امکان فراهم آمده است تا با کاربرد این روش بتوان گیاهان متحمل به عوامل نامساعد محیطی مختلف ازجمله خشکی، شوری و فلزات سنگین را انتخاب و تکثیر نمود (*قاسمی بزدی و احمدی*[1]، 2010). کشت سلول و بافت گیاهی که با عنوان‌های کشت این‌ویترو و یا کشت استریل نیز مطرح می‌شود (*تورز*[2]، 1998)، ابزاری مهم در مطالعات پایه و کاربردی و دارای کاربردهای تجاری است. تهیه کشت‌های سترون (بدون آلودگی) در بعضی مواد گیاهی ازجمله ریزنمونه‌های گیاه نیشکر یکی از چالش‌های عمده در کشت بافت می‌باشد (اسمیت[3]، 2002). از این‌رو حذف آلودگی‌های قارچی و باکتریایی مهم‌ترین مرحله در ریزازدیادی به شمار می‌رود. آلودگی ممکن است بر روی سطح گیاه، بین سلول‌ها و یا در داخل سلول‌های گیاهی باشد. دستیابی به مواد گیاهی سترون مشکل است و با وجود احتیاط‌های لازم، ۹۵ درصد از کشت‌ها در صورتی‌که ریزنمونه به‌خوبی گندزدایی نشده باشد به آلودگی می‌انجامد. بنابراین اندام‌ها و بافت‌های گیاهی را توسط تیمارهایی با مواد گندزدا سترون می‌کنند و محلول‌های مورداستفاده برای سترون کردن ریزنمونه‌ها می‌بایستی به بافت گیاهی آسیب نرساند اما در همین حال هر آلودگی قارچی یا باکتریایی را از میان ببرد (*تورز*، 1998). بافت‌های گیاهی را می‌توان با انواع مختلفی از مواد شیمیایی استریل نمود. نوع و غلظت ماده استریل‌کننده مورد استفاده و مدت زمان تماس آن با نمونه گیاهی، به‌طور تجربی بایستی تعیین شود (*چاولا*[4]، 2000).

مطالعات متعددی در ارقام مختلف نیشکر به‌منظور بهینه نمودن سترون‌سازی و بازایی پینه انجام شده است که به موارد ذیل اشاره می‌شود: سادات و همکاران (۱۳۸۷) و *نیاز و قریشی*[5] (2002) از تیمار سترون‌سازی هیپوکلریت سدیم به‌ترتیب در مقادیر ۲۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و پنج درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه برای ارقام مختلف نیشکر استفاده کردند. محققان برای افزایش خاصیت میکروب‌کشی هیپوکلریت سدیم از ترکیبات مختلفی استفاده می‌کنند. *کمریت*[6] و همکاران (2012) از الکل ۷۰ درصد به‌مدت سه دقیقه در کنار هیپوکلریت سدیم استفاده نمودند. *بیرادار*[7] و همکاران (2007) برای سترون‌سازی محیط‌کشت بافت نیشکر، قارچ‌کش (کاربندازیم[8] ۰/۱ درصد) و باکتری‌کش (استرپتومایسین[9] ۰/۱ درصد) را به‌مدت ۱ دقیقه به‌کار بردند. *خان*[10] و همکاران (2007) از آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم[11] در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم به‌همراه هیپوکلریت سدیم در تحقیق خود استفاده کرده و گزارش دادند تیمار هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه همراه با ۵۰۰

1. Ghasemi Bezdi and Ahmadi

2. Torres
3. Smith
4. Chawla
5. Niaz and Quraishi
6. Khamrit
7. Biradar
8. Carbendazim
9. Streptomycin
10. Khan
11. Cefotaxime

میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به‌ترتیب ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درصد آلودگی را در ارقام HSF-240، CP77-400 و CPF-237 کنترل کرده است. *سانی*[1] و همکاران (2010) پینه‌های به‌دست‌آمده را به‌منظور گسترش و تکثیر بهتر پینه به محیط‌کشت تازه حاوی 2,4-D[2] انتقال دادند. *صدیقی*[3] (1993) نیز گزارش داد کاهش 2,4-D، باعث رشد و تکثیر بهتر پینه گردیده است. *فرانکلین*[4] و همکاران (2006) محیط پایه MS[5] که با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA[6] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA[7] تکمیل شده بود را به‌عنوان بهترین تیمار باززایی معرفی کردند. استفاده از هورمون‌های Kinetin و NAA برای باززایی پیش‌تر توسط *اسمیولا*[8] و همکاران (2013) پیشنهاد شده بود. آن‌ها با تلفیق این دو هورمون موفق به باززایی سه واریته نیشکر به نام‌های Hsf-240، S-2000-us-359 و S-2003-us-704 شدند. سیاحی و میرپناهی (۱۳۹۵) نیز برای باززایی نیشکر رقم CP69-1062 از ترکیب Kinetin و NAA استفاده نمود.

در تحقیق حاضر سه رقم تجاری نیشکر مورداستفاده قرار گرفت، از اهمیت این ارقام می‌توان اشاره نمود که رقم CP48-103 فیبر کمی داشته و از عملکرد بالا و قدرت بازرویی بالایی برخوردار است، به اغلب بیماری‌های منطقه مقاوم، به آفت کرم ساقه‌خوار نیشکر متحمل ولی به وزش بادهای گرم حساس می‌باشد. این رقم از مهم‌ترین ارقام شکرساز به‌ویژه در کشت و صنعت‌های نیشکری شمال خوزستان به‌شمار می‌رود و امروزه این رقم حدود ۲۶ درصد سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است. رقم CP69-1062 رقمی میان‌رس متمایل به زودرس است که از قند و عملکرد خوبی برخوردار است. میزان فیبر آن کم بوده و مورد علاقه اغلب کشت و صنعت‌ها به‌ویژه در فصل رسیدگی کامل آن می‌باشد. در شرایط وزش بادهای موسمی گرم خوزستان سبزینگی برگ‌های خود را حفظ نموده و به غالب بیماری‌های منطقه مقاوم است. نسبت به سایر ارقام تجاری به آفت ساقه خوار نیشکر تا حدودی حساسیت بیش‌تری نشان می‌دهد. در حال حاضر این رقم حدود ۴۲ درصد اراضی زیر کشت را به خود اختصاص داده است. در نهایت رقم CP57-614 رقمی بسیار زودرس است و از قند بالایی برخوردار می‌باشد. فیبر آن نسبتاً زیاد بوده و به‌هنگام رشد مناسب در سال اول معمولاً دچار خوابیدگی ساقه می‌شود. این رقم از قابلیت بازرویی مناسبی برخوردار نمی‌باشد. به بادزدگی تابستان حساس بوده ولی به ساقه‌خوران نیشکر نسبتاً مقاوم است. در حال حاضر حدود ۲۰ درصد از اراضی زیر کشت نیشکر در خوزستان به این رقم اختصاص یافته است (پرویزی آلمانی و همکاران، ۱۳۹۰).

نظر به این‌که این ارقام سطح کشت نسبتاً وسیعی به خود اختصاص داده و از طریق قلمه‌های ساقه تکثیر می‌شوند که با مشکل اختلاط ارقام در مزارع روبه‌رو می‌باشد و این امر تأثیر منفی بر استحصال قند دارد لذا سالم‌سازی و ریزازدیادی این ارقام موردتوجه قرار گرفته است تا از یک طرف از اختلاط ارقام جلوگیری شود و از طرف دیگر امکان استفاده از پینه‌های تولیدی برای مطالعات تنوع سوماکلونال به‌منظور تولید ارقام متحمل به تنش‌های محیطی فراهم شود. از این‌رو با توجه به وقوع آلودگی بالای قارچی در ریزنمونه‌های نیشکر و از طرف دیگر نبود یک پروتکل واحد برای این گیاه، در تحقیق حاضر، تعیین بهترین تیمار ضدعفونی برای مهار آلودگی‌های قارچی و باکتریایی در ارقام تجاری موردمطالعه و دستیابی به بهترین تیمار واکشت پینه برای رشد و تکثیر بهتر پینه و مناسب‌ترین نسبت هورمونی برای باززایی پینه موردنظر قرار گرفت و تیمارهای مختلف سترون‌سازی شامل مواد ضدعفونی‌کننده مختلف در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف، هم‌چنین ترکیب تنظیم‌کننده‌های مختلف اکسین و سیتوکنین برای محیط تکثیر و باززایی پینه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

سترون‌سازی مواد گیاهی

سرشاخه حاوی برگ‌های جوان (دارای مریستم انتهایی) سه رقم تجاری نیشکر استان خوزستان CP48-103، CP69-1062 و CP57-614 از مزارع کشت و صنعت کارون شوشتر تهیه گردید. ابتدا ساقه‌های نیشکر ارقام موردنظر از نظر مورفولوژیکی، شاخ و برگ بررسی و قسمت سر نی ساقه‌های سالم پس از انتقال به آزمایشگاه جدا شد. به‌منظور کاهش آلودگی‌های سطحی در نمونه‌های تهیه شده، قطعات حدود ۱۰ سانتی‌متری از قسمت مریستمی ساقه جدا شده و به‌ترتیب با مواد شوینده و قرار گرفتن در زیر آب جاری به‌مدت یک ساعت شستشو داده شدند. در حین انجام کار یکی دو برگ اول چسبیده به نمونه که به‌علت بیش‌ترین تماس با عوامل بیماری‌زای خارجی دارای بیش‌ترین میزان آلودگی بودند حذف گردید تا سترون‌سازی با درجه اطمینان بیش‌تری صورت گیرد پس از شستشوی اولیه، ریزنمونه‌ها به زیر هود انتقال یافتند و مراحل اصلی سترون‌سازی در زیر هود لامینار انجام گرفت.

1. Sani
2. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
3. Siddiqui
4. Franklin
5. Murashige and Skoog
6. N_6-Benzyladenine
7. 1-Naphthyl acetic acid
8. Smiulla

۱۲ تیمار سترون‌سازی برای هر کدام از ارقام نیشکر مورد آزمایش در نظر گرفته شد. این تیمارها شامل موارد ذیل بودند:

S_1: اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۴۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۰ درصد) به‌مدت ۱۰ دقیقه

S_2: اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۰ درصد) به‌مدت ۱۰ دقیقه

S_3: اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۰ درصد) به‌مدت ۱۰ دقیقه

S_4: کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۰ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) به‌مدت ۱۰ دقیقه، محیط‌کشت حاوی ۲۵۰ پی‌پی‌ام سفوتاکس می‌باشد.

S_5: کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۰ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) به‌مدت ۱۰ دقیقه، محیط‌کشت حاوی ۲۵۰ پی‌پی‌ام سفوتاکس می‌باشد.

S_6: شستشو با چند قطره توئین ۲۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه، کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۰ دقیقه، اتانول ۷۰درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) به‌مدت ۱۰ دقیقه، محیط‌کشت حاوی ۲۵۰ پی‌پی‌ام سفوتاکس می‌باشد.

S_7: کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۰ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) همراه توئین ۲۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه، محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام سفوتاکسیم و پنج پی‌پی‌ام جنتامایسین می‌باشد.

S_8: کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) به‌همراه توئین ۲۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه، محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام سفوتاکسیم و پنج پی‌پی‌ام جنتامایسین می‌باشد.

S_9: کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) به‌همراه توئین ۲۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه، محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام سفوتاکسیم و پنج پی‌پی‌ام جنتامایسین می‌باشد.

S_{10}: کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) به‌همراه توئین ۲۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه محیط‌کشت حاوی ۳۰۰ پی‌پی‌ام سفوتاکسیم و ۵ پی‌پی‌ام جنتامایسین می‌باشد.

S_{11}: کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) به‌همراه توئین ۲۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه، غوطه‌وری در جنتامایسین (پنج میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۵ دقیقه، محیط‌کشت حاوی ۴۰۰ پی‌پی‌ام سفوتاکسیم می‌باشد.

S_{12}: کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۰ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم (۲۵ درصد) به‌همراه توئین ۲۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه، غوطه‌وری در جنتامایسین (پنج میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) به‌مدت ۲۵ دقیقه، محیط‌کشت حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر جنتامایسین می‌باشد.

پس از هر بار استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده سه الی چهار بار و هر بار به‌مدت سه الی پنج دقیقه ریزنمونه‌های گیاهی با آب مقطر استریل دیونیزه شستشو شدند. در برخی تیمارها برای افزایش نفوذپذیری از ماده مرطوب‌کننده نظیر توئین ۲۰ استفاده شد بدین صورت که یک تا دو قطره از ماده مرطوب‌کننده در ۱۰۰ میلی‌لیتر ماده ضدعفونی‌کننده افزوده شد. برای تیمار ضدعفونی هیپوکلریت سدیم از محلول سفیدکننده مورداستفاده در منازل که تقریباً یک محلول پنج درصد (حجمی به حجمی) است استفاده شد. تیمارهای سترون‌سازی در ۱۲ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی برای هر رقم به‌طور جداگانه موردبررسی قرار گرفتند. هر تکرار عبارت بود از یک پتری‌دیش محتوی کشت پایه MS (*مورشیک و اسکوگ*، 1962) که در آن پنج ریزنمونه (برگ اولیه) قرار داشت. اندازه برگ‌های اولیه بر روی محیط‌کشت، دو الی سه سانتی‌متر بود و برای افزایش میزان پینه‌زایی با اسکالپل زخم‌های متعددی به ریزنمونه‌ها وارد گردید. محیط‌کشت اولیه فاقد هرگونه تنظیم‌کننده رشد گیاهی بود، تا پس از مشخص نمودن بهترین تیمارهای سترون‌سازی، برای انتقال به محیط‌های کشت پینه‌زایی از ریزنمونه‌هایی استفاده گردد که کاملاً سالم و فاقد هرگونه عوامل بیماری‌زا باشند. پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط‌کشت MS، انتقال به تاریکی و انکوباسیون در محدوده دمایی ۱ ± ۲۵ در انکوباتور انجام گرفت. علت انتخاب محل تاریک در این مرحله جلوگیری از احتمال ظهور ترکیبات فنولی از بافت‌های زخمی شده توسط اسکالپل بود که می‌توانست برای سلول‌های ریزنمونه سمیت زیادی به‌همراه داشته باشد. پس از گذشت ۲۰-۱۰ روز، تعداد ریزنمونه‌های فاقد آلودگی در هر پتری‌دیش شمارش و تجزیه واریانس داده‌ها برای بررسی اثرات تیمارهای سترون‌سازی انجام گرفت.

بهینه‌سازی محیط رشد و تکثیر پینه

ریزنمونه‌های حاصل از سه رقم نیشکر مورد آزمایش پس از دستیابی به یک پروتکل مؤثر برای سترون‌سازی، به محیط‌کشت پینه‌زایی (MS + 3 mgl^{-1} 2-4-D) انتقال یافتند و در محدوده دمایی ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی

هشت هفته را سپری کردند. پس از طی این دوره برای انتخاب بهترین محیط تکثیر، پینه‌ها (۵ قطعه پینه با اندازه ۱ الی ۱/۵ سانتی‌مترمربع در هر پتری‌دیش قرار گرفت) به محیط‌کشت پینه‌زایی، محیط MS حاوی 2 mgl^{-1} هورمون 2-4-D به‌همراه هورمون BAP در پنج غلظت به شرح، TC_1: (BAP (0.1 mgl^{-1}، TC_2: (BAP (0.2 mgl^{-1}، TC_3: (BAP (0.3 mgl^{-1}، TC_4: (BAP (0.4 mgl^{-1})، TC_5: (BAP (0.5 mgl^{-1}، انتقال یافتند و شش هفته را در تاریکی سپری کردند. رشد پینه با استفاده از کاغذ شطرنجی اندازه‌گیری شد و نتایج در یک طرح کاملاً تصادفی (۵ تیمار در ۱۰ تکرار) مورد تجزیه آماری قرار گرفتند.

بهینه‌سازی محیط باززایی پینه

برای دستیابی به بهترین محیط باززایی، ۱۵ تیمار در ۱۰ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی موردبررسی قرار گرفت. سطوح متفاوت از اکسین و سیتوکنین به محیط‌کشت پایه MS افزوده شد و باززایی پینه‌ها (تعداد گیاهچه تولیدی از پینه) بررسی گردید. این تیمارها به‌ترتیب عبارت بودند از:

TR_1: Kinetin (0.5 mgl^{-1}) + BAP (0.5 mgl^{-1})

TR_2: Kinetin (0.5 mgl^{-1}) + BAP (0.5 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1})

TR_3: Kinetin (0.5 mgl^{-1}) + BAP (0.5 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1}) + GA_3 (1 mgl^{-1})

TR_4: Kinetin (1 mgl^{-1}) + BAP (1 mgl^{-1})

TR5: Kinetin (1 mgl^{-1}) + BAP (1 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1})

TR_6: Kinetin (1 mgl^{-1}) + BAP (1 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mg l^{-1}) + GA_3 (1 mgl^{-1})

TR_7: Kinetin (1 mgl^{-1}) + BAP (1 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1}) + GA_3 (0.5 mgl^{-1})

TR_8: BAP (1 mgl^{-1}) + Kinetin (0.5 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1}) + GA_3 (0.5 mgl^{-1})

TR_9: Kinetin (2 mgl^{-1}) + NAA (0.1 mgl^{-1})

TR_{10}: Kinetin (2 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1})

TR_{11}: BAP (2 mgl^{-1}) + NAA (0.1 mgl^{-1})

TR_{12}: BAP (2 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1})

TR_{13}: Kinetin (3 mgl^{-1}) + NAA (0.1 mgl^{-1})

TR_{14}: Kinetin (3 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1})

TR_{15}: شاهد بدون تنظیم‌کننده رشد

پس از گذشت ۴۵-۳۰ روز تعداد پینه‌های باززایی شده در هر سه رقم بر مبنای تعداد گیاهچه تولیدی شمارش شد و داده‌ها مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت و هر رقم در بهترین سطوح هورمونی واکشت گردید.

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر تیمارهای سترون‌سازی بر درصد آلودگی پینه، هر رقم به‌طور جداگانه تجزیه واریانس شده است

Table 1: Analysis of variance of sterilization treatments, each cultivar has been analyzed separately

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Df	رقم Cultivar		
		CP57-614	CP48-103	CP69-1062
تیمار Treatment	11	2.38**	2.75**	3.49**
خطای آزمایش Error	108	0.09	0.11	0.02
ضریب تغییرات CV		4.09	5.11	4.32

**: اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد آماری

**: Significantly different at a=0.01 probability level

جدول ۲: تأثیر تیمارهای مختلف سترون‌سازی بر درصد آلودگی پینه رقم‌های مختلف نیشکر

Table 2: The effects of different sterilization treatments on callus contamination percentage in different cultivars of sugarcane

رقم Cultivar			تیمار Treatment
CP69-1062	CP57-614	CP48-103	
77.5^{e}	90.0^{gf}	85.0^{d}	T1
65.0^{d}	85.0^{f}	87.5^{d}	T2
62.5^{d}	82.5^{f}	85.0^{d}	T3
17.5^{bc}	50.0^{e}	75.0^{c}	T4
15.0^{b}	37.5^{d}	72.5^{c}	T5
15.0^{b}	45.0^{de}	70.0^{c}	T6
08.3^{ab}	25.0^{c}	75.0^{c}	T7
00.0^{a}	16.6^{b}	83.3^{d}	T8
00.0^{a}	00.0^{a}	41.7^{a}	T9
08.3^{ab}	00.0^{a}	53.1^{b}	T10
25.0^{c}	25.0^{c}	50.0^{ab}	T11
83.3^{ef}	91.6^{g}	100^{e}	T12
6.2	6.1	7.5	ضریب تغییرات CV

میانگین‌های هر ستون که دارای حروف یکسان هستند با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند (P<0.05)

Values in each column followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)

جدول ۳: تجزیه واریانس اثر تیمارهای محیط رشد پینه بر درصد رشد پینه، هر رقم به‌طور جداگانه تجزیه واریانس شده است

Table 3: ANOVA of the effect of callus proliferation treatments on the callus growth percentage. Each cultivar has been analysed separately

رقم Cultivar			درجه آزادی Df	منابع تغییرات Source of variations
CP69-1062	CP48-103	CP57-614		
1.63**	2.09*	1.51*	4	تیمار Treatment
0.02	0.01	0.03	45	خطای آزمایش Error
5.54	4.15	4.22		ضریب تغییرات CV

** و *: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد آماری

** and *: Significantly different at a=0.05 and a=0.01 probability levels, respectively

جدول ۴: اثر محیط رشد بر درصد رشد پینه رقم‌های مطالعه شده نیشکر*

Table 4: Effect of growth medium on callus growth percentage in the studied sugarcane cultivars

رقم Cultivar			تیمار Treatment
CP69-1062	CP57-614	CP48-103	
45.0^{c}	35.0^{d}	25.0^{e}	T1
60.0^{b}	40.0^{d}	37.5^{d}	T2
67.5^{b}	57.5^{c}	50.0^{c}	T3
92.5^{a}	90.0^{ab}	80.0^{b}	T4
97.5^{a}	100^{a}	92.5^{a}	T5
6.4	6.3	7.2	ضریب تغییرات CV

میانگین‌های هر ستون که دارای حروف یکسان هستند با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند (P<0.05)

Values in each column followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)

جدول ۵: تجزیه واریانس اثر محیط‌کشت بر باززایی پینه گیاه، هر رقم به‌طور جداگانه تجزیه واریانس شده است

Table 5: ANOVA of the effect of culture media on plant regeneration, each cultivar has been analyzed separately

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی Df	CP57-614	CP48-103	CP69-1062
تیمار Treatment	14	3.44**	2.08**	3.82**
خطای آزمایش Error	135	0.01	0.02	0.01
ضریب تغییرات CV		5.01	4.42	5.30

**: اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد

**: Significant at the 1% probability level

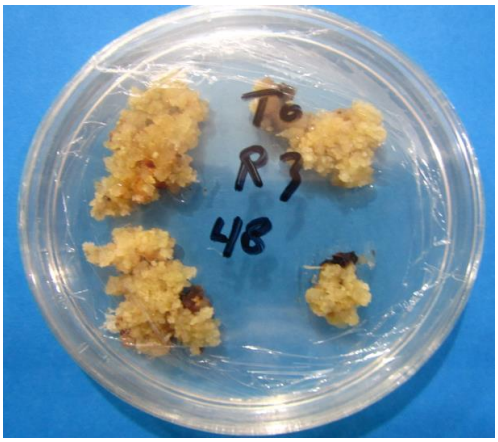
جدول ۶: درصد باززایی گیاه در رقم‌های مختلف نیشکر در محیط‌های متفاوت باززایی

Table 6: Plant regeneration rate in different cultivars of sugarcane on different regeneration media

تیمار Treatment	رقم Cultivar		
	CP48-103	CP57-614	CP69-1062
T1	70[a]	50[ab]	30[b]
T2	40[b]	30[c]	30[b]
T3	50[b]	30[c]	20[c]
T4	50[b]	20[de]	30[b]
T5	30[c]	20[de]	30[b]
T6	10[d]	30[c]	0[e]
T7	30[c]	10[e]	30[b]
T8	30[c]	20[de]	20[c]
T9	20[cd]	20[de]	20[c]
T10	40[b]	20[de]	10[d]
T11	40[b]	0[f]	10[d]
T12	20[cd]	10[e]	10[d]
T13	30[c]	50[ab]	50[a]
T14	40[b]	60[a]	40[ab]
T15	10[d]	0[f]	0[e]
ضریب تغییرات CV	9.3	8.5	9.1

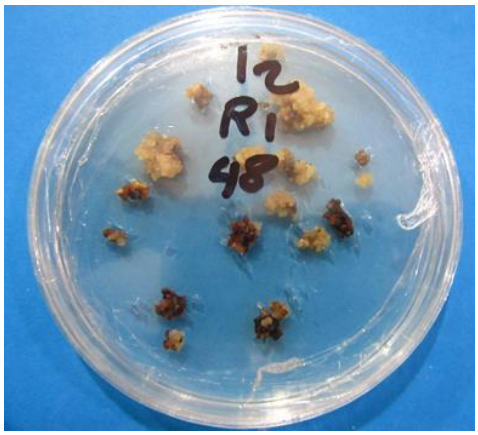
میانگین‌های هر ستون که دارای حروف یکسان هستند با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند (P<0.05)

Values in each column followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)



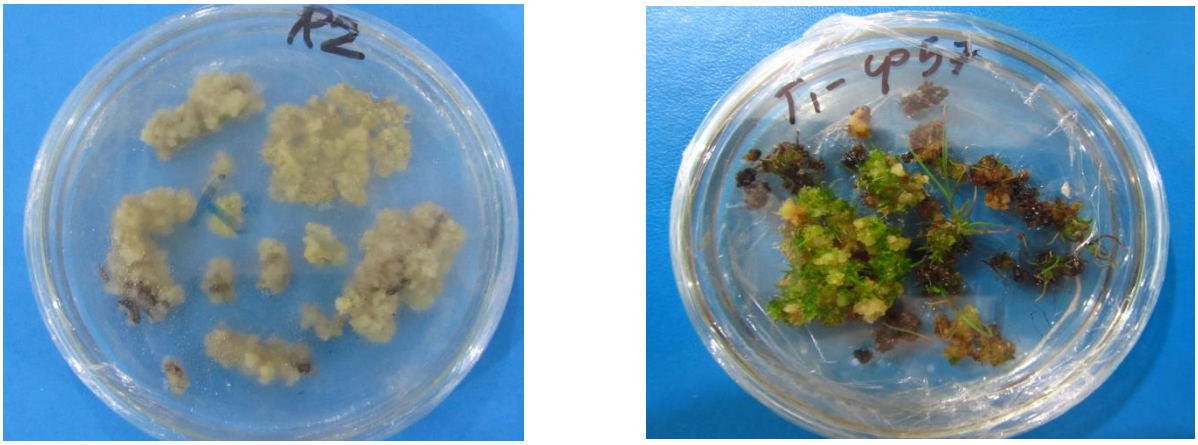
شکل ۱: پینه رقم CP48-103 در محیط‌کشت پنج (TC_5) دارای حداکثر رشد

Fig. 1: Callus of CP48-103 cultivar on TC_5 culture medium with maximum growth



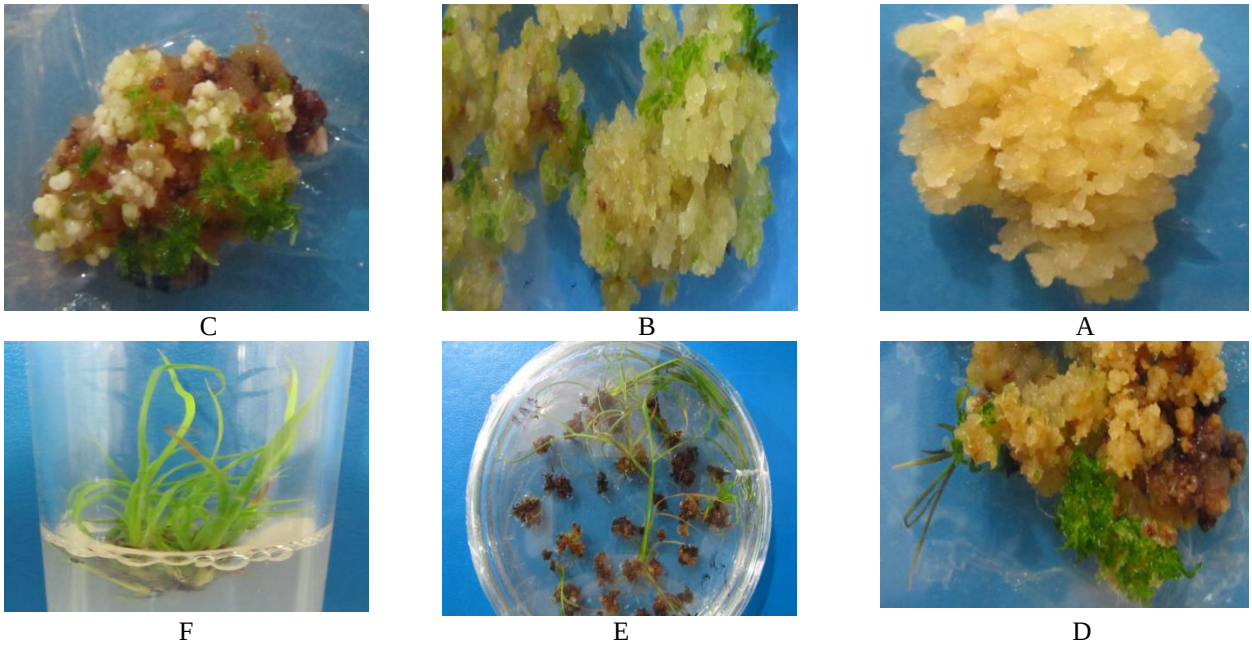
شکل ۲: پینه رقم CP48-103 در محیط‌کشت یک (TC_1) دارای حداقل رشد

Fig. 2: Callus growth of CP48-103 cultivar on TC_1 culture medium with minimum growth



شکل ۳: حداکثر باززایی (سمت راست) و حداقل باززایی (سمت چپ) گیاه در رقم CP57-614 به‌ترتیب در تیمارهای بازازیی T14 و T15

Fig. 3: Maximum (right) and minimum (left) plant regeneration in CP57-614 cultivar on T14 and T15 medium, respectively



شکل ۴: مراحل باززایی پینه. A: تشکیل توده پینه در محیط حاوی۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، B: تغییر رنگ پینه پس از قرارگیری در محیط باززایی تحت شرایط روشنایی، C: باززایی CP48-103، D: باززایی CP69-1062، E: باززایی CP57-614 ، F: تکثیر گیاهک

Fig. 4: Plant regeneration in sugarcane. A: Callus induction in a medium containing 3mgl^{-1} 2,4-D, B: Color changes in callus after exposure to regeneration media under light conditions, C: regeneration of CP48-103, D: regeneration of CP69-1062, E: Reproduction of CP57-614, F: Plantlet propagation.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش محیط‌های مختلف سترون‌سازی برای سه رقم تجاری موردمطالعه نشان داد نوع محیط تأثیر زیادی در میزان آلودگی هر رقم داشته است. این اختلاف بین تیمارهای سترون‌سازی کاملاً معنی‌دار بود (جدول ۱). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده (جدول ۲)، تیمار نه شامل کاربندازیم دو در هزار به‌مدت ۱۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۵۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به همراه توئین ۲۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه و محیط‌کشت حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام سفوتاکسیم و پنج پی‌پی‌ام جنتامایسین بهترین نتیجه را در سترون‌سازی ریزنمونه‌های رقم‌های CP48-103 با کم‌ترین درصد آلودگی (۴۱٫۷ درصد) و عدم آلودگی در CP69-1062 و CP57-164 نشان داد. برای این رقم‌ها تیمارهای یک، دو، سه و ۱۲ به‌دلیل حضور بیش‌ترین درصد آلودگی، اصلاً توصیه نمی‌شود. در رقم CP69-1062 تیمارهای هشت و نه و برای رقم CP57-164 تیمارهای نه و ۱۰ بهترین نتیجه را در سترون‌سازی به‌همراه داشتند. در تحقیق حاضر، از برگ‌های پریموردیای اطراف مریستم انتهایی ساقه استفاده شد زیرا این برگ‌ها به‌علت

جوانی سلول‌ها از پتانسیل بسیار بالایی برای تقسیمات میتوزی برخوردارند (*چاولا*، 2000). استفاده از برگ‌های پریموردیا برای پینه‌زایی توسط (سادات و همکاران، ۱۳۸۷؛ سیاحی و میرپناهی، ۱۳۹۵؛ *بهارا* و *ساهو*[1]، 2012) نیز پیش‌تر گزارش شده بود. بر اساس تجارب به‌دست‌آمده در این تحقیق، هیپوکلریت سدیم به‌عنوان یک ماده سترون‌ساز ریزنمونه‌های نیشکر کارآمدی بالایی دارد. هم‌چنین تهیه این ماده نیز به‌علت وفور آن در بازار به‌راحتی امکان‌پذیر است و رقیق‌سازی این ماده به سهولت انجام شده و سمیت آن در مقایسه با مواد سترون‌کننده دیگر نظیر کلرورمرکوریک بسیار کم‌تر است. به‌منظور افزایش خاصیت میکروب‌کشی هیپوکلریت سدیم از ترکیبات مختلفی استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به کاربرد الکل ۷۰ درصد به‌مدت سه دقیقه در کنار هیپوکلریت‌سدیم اشاره نمود (*کمریت* و همکاران، 2012). با این‌حال در گزارش‌های متعددی نیز اشاره شده است که الکل از کارآمدی لازم به‌منظور سترون‌سازی ریزنمونه‌های نیشکر برخوردار نیست لذا از میکروب‌کش‌های دیگر باید استفاده شود.

در صورت عدم‌وجود خاصیت سمی کلرومرکوریک، این ماده می‌توانست به‌عنوان ماده تکمیلی بسیار ایده‌ال مورداستفاده قرار گیرد ضمن این‌که کاربرد این ماده برای بیش از دو تا سه دقیقه سلول را دچار پلاسمولیز کرده و از بین خواهد برد. در تحقیق حاضر، با حذف کلرورمرکوریک و اعمال بهینه‌سازی در انتخاب زمان و غلظت مناسب از هیپوکلریت سدیم و اتانول ۷۰ درصد، قارچ‌کش کاربندازیم، آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم و جنتامایسین و هم‌چنین توئین ۲۰ برای سترون‌سازی مؤثرتر استفاده گردید. در مطالعات قبلی برای سترون‌سازی محیط‌کشت بافت نیشکر، قارچ‌کش (کاربندازیم ۰/۱ درصد) و باکتری‌کش (استرپتومایسین ۰/۱ درصد) استفاده شده بود (*بیرادار* و همکاران،2007). کاربرد قارچ‌کش‌های مختلفی نظیر بنومیل و کاپتان، آنتی‌بیوتیک برای کنترل آلودگی باکتریایی و تیپول (مایع صابونی یا دترجنت) ۰/۰۵ درصد برای افزایش سطح نفوذپذیری ریزنمونه گیاهی در مطالعه (*مانگومبا*[2] و همکاران، 2012) گزارش شده است. استفاده از کاربندازیم ۰/۲ درصد و کلرید جیوه ۰/۱ درصد توسط (*گارگ*[3] و همکاران، 2014) گزارش شده است. *خان* و همکاران (2007) تایید کردند تیمار هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به‌ترتیب ۹۰ درصد، ۸۰ درصد و ۷۰ درصد آلودگی را در ارقام HSF-240، CP77-400 و CPF-237 کنترل کرده است. *پاناتولا*[4] و همکاران (2014) تیمار سترون‌سازی سفوتاکسیم با غلظت ۱۰۰ µM/L و کانامایسین با غلظت ۸۰µM/L را موفقیت‌آمیز بیان کرده‌اند. *میتال*[5] و همکاران (2009) به‌کارگیری تیمار سفوتاکسیم با غلظت ۵۰۰ mgl^{-1} در سترون‌سازی نیشکر برای جنین‌زایی سوماتیکی را موفقیت‌آمیز گزارش نمودند.

نکته مهمی که می‌بایست به آن اشاره گردد آن است که تفاوت‌های قابل ملاحظه در استفاده از نوع مواد سترون‌ساز و غلظت‌های مورداستفاده در گزارشات متفاوت پیشین ناشی از عوامل مختلفی است که سترون‌سازی را برای ریزنمونه‌های هر ژنوتیپ گیاهی و حتی اکوتیپ‌های خاص یک منطقه منحصر به‌فرد می‌سازد. حتی در یک اکوتیپ نیز سترون‌سازی بافت‌های مختلف، به‌علت برخورداری متفاوت از نوع و مقدار آلودگی در آن‌ها می‌تواند تیمارهای سترون‌سازی متفاوتی را برای بافت‌های مختلف پیشنهاد نماید. فصلی که ریزنمونه از بافت مادری جداسازی گردیده و به آزمایشگاه منتقل می‌شود نیز تأثیر به‌سزایی در استفاده از نوع و غلظت مواد سترون‌ساز خواهد داشت(*چاولا*، 2000). در نهایت در این تحقیق مشاهده شد کاربرد هم‌زمان دو نوع آنتی‌بیوتیک در محیط‌کشت تأثیر بسیار کارآمدی در کنترل آلودگی به‌همراه داشته است و هم‌چنین استفاده از قارچ‌کش کاربندازیم به میزان چشمگیری (بالای ۸۰ درصد) در کنترل آلودگی قارچی مؤثر بود. کاربرد محلول‌های ضدعفونی‌کننده مختلف مانند هیپوکلریت سدیم و اتانول در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف در حذف آلودگی میکروبی نمونه‌ها به‌تنهایی مؤثر نبوده و استفاده از قارچ‌کش و آنتی‌بیوتیک تأثیر به‌سزایی داشته و در این تحقیق لزوم کاربرد این دو ماده به اثبات رسیده است.

نتایج آزمایش محیط‌های مختلف رشد پینه برای سه رقم تجاری مطالعه نشان داد که نوع محیط تأثیر زیادی در میزان رشد پینه هر رقم داشت. این اختلاف بین تیمارهای مورداستفاده معنی‌داری بود(جدول ۳). نتایج نشان داد تیمار پنج در رقم CP48-103 با میانگین ۹۲/۵ درصد (شکل ۱)، در رقم CP57-614 با ۱۰۰ درصد و در رقم CP69-1062 با میانگین رشد پینه ۹۷/۵ درصد بهترین نتیجه را به‌همراه داشته است و تیمار یک و دو به‌ترتیب شامل (2,4-D $2\ mgl^{-1}$ و BAP $0.1\ mgl^{-1}$) و (2,4-D $2\ mgl^{-1}$ و BAP $0.2\ mgl^{-1}$) در رقم‌های CP48-103 (شکل ۲) و CP57-614 و تیمار یک در رقم CP69-1062 تأثیر معنی‌داری در رشد پینه نشان ندادند (جدول ۴). لذا برای هر سه رقم تیمار پنج (2,4-D $2\ mgl^{-1}$ و BAP $0.5\ mgl^{-1}$) بهترین نتیجه را در

1. Behera and Sahoo
2. Mng'omba
3. Garg
4. Panathula
5. Mittal

پی داشت و برگزیده شد. مشابه نتایج مطالعه حاضر، *رشید* و همکاران (2009) نیز پینه‌های کشت شده را برای تکثیر و نگهداری به محیط MS حاوی 2,4-D (2 mgl^{-1}) انتقال دادند. *سانی* و همکاران (2010) پینه‌های حاصل شده را برای گسترش و تکثیر بهتر پینه به محیط‌کشت حاوی 2,4-D انتقال دادند. *صدیق* (1993) نیز گزارش داد کاهش 2,4-D، باعث رشد و تکثیر بهتر پینه گردیده است.

نتایج آزمایش محیط‌های مختلف باززایی پینه برای سه رقم تجاری موردمطالعه نشان داد که نوع محیط تأثیر زیادی بر وضعیت باززایی پینه هر رقم داشت. این اختلاف بین تیمارهای مورداستفاده معنی‌داری بود (جدول ۵). طبق جدول ۶، بالاترین درصد باززایی در رقم‌های CP48-103، CP57-614 و CP69-1062 به‌ترتیب با میانگین ۷۰ درصد، ۶۰ درصد و ۵۰ درصد در تیمارهای یک، ۱۴ و ۱۳ مشاهده شد (شکل ۳). تیمار شش و ۱۵ با میانگین ۱۰ درصد باززایی و عدم باززایی به‌ترتیب در CP48-103 و CP69-1062، تیمار ۱۱ و ۱۵ با عدم باززایی در CP57-614 تأثیر معنی‌دار در باززایی پینه نداشتند (شکل ۳). در این تحقیق برای باززایی پینه‌های حاصل، تلفیقی از هورمون‌های اکسین و سیتوکنین مورداستفاده قرار گرفت و مشابه نتایج مطالعه حاضر، *چاولا* (2000) نیز به این نکته اشاره نموده است که کاهش اکسین و افزایش غلظت سیتوکنین برای تولید ساقه از بافت پینه مرسوم است. در ارتباط با باززایی پینه‌های حاصله، هرچند محیط MS تغییر یافته به‌عنوان محیط باززایی مناسب توسط بعضی محققان پیشنهاد گردیده است (*آفتاب*[1] و همکاران، 1996؛ *گاندانو*[2] و همکاران، 2005)، لکن نتایج دیگر تحقیقات نشان داد تلفیق مناسبی از سیتوکنین‌ها و اکسین‌های متداول، در کنار محیط پایه نیز می‌تواند منجر به باززایی پینه‌ها گردد. استفاده از هورمون‌های BAP و NAA پیشتر توسط *بهرا* و *ساهو* (2009)، سادات و همکاران (۱۳۸۷) و *فرانکلین* و همکاران (2006)، پیشنهاد شده بود. *بهرا* و *ساهو* (2009) بهترین تیمار باززایی را دو میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA معرفی کردند. سادات و همکاران (۱۳۸۶) نیز گزارش دادند که محیط MS تغییر یافته (حاوی کازئین هیدرولیزات) فاقد هورمون و نیز محیط MS تغییر یافته همراه با یک میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین تأثیر را در باززایی به‌همراه داشتند. *فرانکلین* و همکاران (2006)، محیط پایه MS که با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA تکمیل شده بود را به‌عنوان بهترین تیمار باززایی معرفی کردند. نتایج این گزارشات نشان‌دهنده باززایی رضایت بخش پینه‌های برخی از ارقام نیشکر از ترکیب دو هورمون BAP و NAA می‌باشد که نتایج به‌دست‌آمده از این گزارشات با نتایج این تحقیق در مورد رقم CP48-103 هم‌سویی دارد. در این تحقیق استفاده از تلفیق این دو هورمون برای رقم CP48-103 مؤثر واقع شد و منجر به باززایی پینه‌های حاصله گردید (شکل ۴). این امر می‌تواند به نوع ژنوتیپ به‌کار رفته که از نظر مقدار هورمون‌های درون‌زا با ژنوتیپ‌های دیگر متفاوت است بستگی داشته باشد. نمودار مقایسه میانگین نیز این مسأله را به‌خوبی نشان می‌دهد که بالاترین مقدار از سیتوکنین (Kinetin = 3) و کم‌ترین مقدار از اکسین (NAA = 0.1) در رقم CP69-1062 و (Kinetin = 3) و (NAA = 0.5) در رقم CP57-614 در نهایت منجر به بیش‌ترین مقدار باززایی از پینه‌ها گردیده است (جدول ۶، شکل ۴). استفاده از هورمون‌های Kinetin و NAA برای باززایی پیش‌تر توسط *اسمیولا* و همکاران (2013) پیشنهاد شده بود. آن‌ها با تلفیق این دو هورمون موفق به باززایی سه رقم نیشکر به نام های Hsf-240، S-2000-us-359 و S-2003-us-704 شدند. سیاحی و میرپناهی (۱۳۹۵) نیز برای باززایی نیشکر رقم CP69-1062 از ترکیب Kinetin و NAA استفاده نمود. گزارشات پیشین نیز دلالت به این داشته است که Kinetin هورمونی است که غالباً برای رشد و نمو به‌کار می‌رود و اگر همراه با اکسین استفاده شود، تقسیم سلولی را سرعت می‌بخشد (*چاولا*، 2000). در دیگر تحقیقات انجام شده توسط *کمریت* و همکاران (2012)، *کریم*[3] و همکاران (2002) و *بکشا*[4] و همکاران (2002)، تلفیقی از دو هورمون BAP و IBA پیشنهاد گردید که تلفیق این دو هورمون پس از حصول به نتیجه مطلوب با استفاده از Kinetin و NAA موردبررسی قرار نگرفت. *کوریل*[5] و همکاران (2006) بهترین درصد باززایی را ۵۸/۳ درصد در تیمار Kinetin (1 mgl^{-1}) و BAP همراه با NAA (0.5 mgl^{-1}) نشان دادند. *علی*[6] و همکاران (2012) محیط MS تغییر یافته با ۵۰۰ mgl^{-1} کازئین‌هیدرولیزات و غلظت‌های مختلف BAP (0.5-2.5 mgl^{-1}) و (0.1-1 mgl^{-1}) NAA را به‌عنوان محیط باززایی معرفی کردند.

در نهایت برای رقم CP48-103، تیمار Kinetin (0.5 mgl^{-1}) + BAP (0.5 mgl^{-1})، در رقم CP69-1062، تیمار Kinetin (3 mgl^{-1}) + NAA (0.1 mgl^{-1})، و برای CP57-614 تیمار Kinetin (3 mgl^{-1}) + NAA (0.5 mgl^{-1})، بهترین محیط برای باززایی معرفی می‌شوند.

1. Aftab
2. Gandonou
3. Karim
4. Baksha
5. Kureel
6. Ali

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، به‌کار بردن هم‌زمان دو نوع آنتی‌بیوتیک در محیط‌کشت تأثیر بسیار مؤثری در کنترل آلودگی نشان داد، علاوه‌بر این استفاده از قارچ‌کش کاربندازیم به میزان چشمگیری توانست آلودگی‌های قارچی را کنترل نماید. محیط‌کشت MS حاوی (2,4-D $2\ mgl^{-1}$ و $0.5\ mgl^{-1}$ BAP) بهترین نتیجه را برای تکثیر پینه در سه رقم تجاری نیشکر موردمطالعه نشان داد. در نهایت به‌منظور باززایی پینه‌های به‌دست‌آمده، تلفیقی از هورمون‌های اکسین و سیتوکنین در محیط باززایی مناسب شناخته شد.

منابع

اسمیت، ار. اچ. ۲۰۰۲. کشت بافت گیاهی، تکنیک‌ها و آزمایش‌ها. ترجمه باقری، ه. و آزادی، پ. مشهد: انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۱۵۴ صفحه.

افکاری، ا. ۱۳۸۸. زراعت گیاهان صنعتی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کلیبر، ۳۰۴ صفحه.

برات شوشتری، م.، احمدیان، س. و اصفیاء، ق. ا. ۱۳۸۷. نیشکر در ایران، انتشارات آییژ، ۳۶۰ صفحه.

بهمنی، ا. ۱۳۹۰. مدیریت تنش آبی جهت کاربرد بهینه آب و کود نیتروژنه در اراضی تحت کشت نیشکر. مجله پژوهش آب ایران، ۵ (۸): ۱۵۳-۱۶۰.

پرویزی آلمانی، م.، حمدی، ح.، طاهرخانی، ک.، فولادوند، م. و بنی‌عباسی، ن. ۱۳۹۰. مشخصات مورفولوژیکی ارقام تجاری و امیدبخش نیشکر در استان خوزستان. انتشارات مؤسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان، ۲۷ صفحه.

تورز، ک. س. ۱۹۹۸. فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی (بوستانداری). ترجمه خوشخوی، م. شیراز: انتشارات دانشگاه شیراز، ۴۳۸ صفحه.

چاولا، اچ. اس. ۲۰۰۰. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. ترجمه فارسی، ذوالعلی، ج.، مشهد: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۹۵ صفحه.

حمودی، م.، شکوه‌فر، ع. ر. و شمیلی، م. ۱۳۹۲. بررسی اثرات مواد رساننده بر کیفیت تکنولوژی گیاه نیشکر واریته IRC9902، هفتمین همایش ملی فن‌آوران نیشکر ایران.

سادات، ش.، بی‌همتا، م. ر. و امام، س. ا. ۱۳۸۷. تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر پینه‌زایی و باززایی نیشکر واریته CP73-21، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۵ (۵): ۴۷-۵۶.

سیاحی، س. س. و میرپناهی، ل. ۱۳۹۵. جهش القایی با استفاده از سدیم ازاید (NAN3) بر گیاهک‌های نیشکر باززایی شده از پینه در واریته CP69-1062. مجله زراعت و اصلاح نباتات، ۱۲ (۴): ۱۰۵-۱۱۵.

شاه‌پیری، آ.، امیدی، م.، احمدیان تهرانی، پ. و داودی، د. ۱۳۸۳. بررسی کشت بافت و تنوع سوماکلون در سیب‌زمینی، مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۵ (۲): ۳۲۳-۳۳۵.

مؤذن رضا محله، ح.، نصیرپور، ن. و طاهرخانی، ک. ۱۳۹۲. بررسی واکنش کلون‌های امیدبخش به بیماری سیاهک ساقه نیشکر ناشی از قارچ *Sporisorium scitaminea* در خوزستان، هفتمین همایش ملی فن‌آوران نیشکر ایران.

Aftab, F., Zafar, Y. and Malik, K. A. 1996. Plant regeneration from embryogenic cell suspension and protoplast in sugarcane (*Sacchrum* spp. Hybrid cv. Col-54). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 44: 71-78.

Ali, S., Khan, M. S. and Iqbal, J. 2012. *In vitro* direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), The Journal of Animal and Plant Sciences, 22 (4): 1107-1112.

Baksha, R., Alam, R., Karim, M. Z., Paul, S. K., Hossain, M. A., Miah M. A. S. and Rahma, A. B. M. M. 2002. *In vitro* shoot tip culture of sugarecane (*Saccharum officinarum* L.) variety lsd 28, Biotechnology, 1 (2-4): 67-72.

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

Biradar, S., Biradar, D. P., Patil, V. C., Patil, S. S and Kambar, N. S. 2009. *In vitro* plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane. Karnata Journal Agriculture Science, 22 (1): 21-24.

Franklin, G., Arvinth, S., Sheeba, C. J., Kanchana, M. and Subramonian, N. 2006. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids) midrib segment explants. Plant Growth regulation, 50: 111-119.

Gandonou, Ch., Abrini, J., Idaomar, M., and N, Skali senhaji. 2005. Response of sugarcane (*Saccharum* sp.) varieties to embryogenic callus induction and in vitro salt stress, African Journal of Biotechnology 4 (4): 350-354.

Garg, R. K., Srivastan, V., Kaur, K. and Gosal, S. S. 2014. Effect of sterilization treatments on culture establishment in *Jatropha curcas* L. Karnata Journal Agriculture Science, 27 (2): 190-192.

Ghasemi Bezdi, K. and A. Ahmadi. 2010. Cell and Tissue Biotechnology (in Micropropagation and Plant Breeding). Makhtoomgholi Faraghi Pub., Gorgan, Iran. 254 pp.

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, Journal of Biological Sciences, 2 (10): 682-685.

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

Khan, S. A., Rashid, H., Chaudhary, M. F. and Chaudhry, Z. 2007. Optimaization of explant sterilization condition in sugarcane cultivars. Pakistan Journal of Agricultural Research, 20 (3-4): 119-123.

Kureel, N., Subhanand, N., Lal, M. and Singh, S. B. 2006. Plantlet regeneration through leaf callus culture in sugarcane. Sugar Technology, 8 (1): 85-87.

Kureel, N., Subhanand, N., Lal, M. and Singh, S. B. 2006. Plantlet regeneration through leaf callus culture in sugarcane. Sugar Technology, 8 (1): 85-87.

Mittal, P., Gosal, S. S., Senger, A. and Kumar, P. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryogenesis and shoot regeneration in sugarcane. Physiology and Molecular Biology of Plant, 15 (3): 257-265.

Mng'omba, S. A., Sileshi, G., du Toit, E. S. and AKinetinnifesi, F. K. 2012. Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. In Fungicides for Plant and Animal Diseases. In Technology, 245-254.

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, 10 (5): 714-719.

Panathula, C. S., Mahadev, M. D. N. and Naidu, C. V. 2014. The stimulatory effects of the antimicrobial agents bavistin, cefotaxime and kanamycin on in vitro plant regeneration of *centella asiatica* (L.)- An important antijaundice medicinal plant. American Journal of Plant Sciences, 5 (3): 279-285.

Sani, L. A. and Mustapha, Y. 2010. Effect of genotype and 2,4-D concentration on callogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. Hybrids). Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 3 (1): 238-240.

Siddiqui, F. A. 1993. A study of the elimination of sugarcane mosaic virus from *saccharum officinarum* by means of *in vitro* meristem and callus culture and some biochemical aspects of regenerated healthy and infected plants, PhD thesis, University of the Punjab, Lahore. 255 p.

Optimization of Preparation and Sterilization of Culture Medium for Callus Proliferation and Plant Regeneration in Three Iranian Commercial Cultivars of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)

Shamansori[1], S., Shomeili [2], M. and Koohi Dehkordi[3*], M.

Abstract

Microbial contamination (fungal and bacterial) of culture medium is one of the most common problems in plants *in vitro* micropropagation. In the present research, achievement of a reliable sterilization method, optimization of callus proliferation and plant regeneration medium in three Iranian commercial cultivars of sugarcane, CP48-103, CP69-1062 and CP57-164 were studied. For sterilization, 12 treatments were separately examined for each cultivar in a completely randomized design with 12 replications. In order to select the best callus culture and plant regeneration media, five treatments including MS medium supplemented with a combination of 2,4-D (2 mg l^{-1}) and different levels of BAP and fifteen treatments using MS medium containing different levels of auxin and cytokinin were studied, respectively in a completely randomized design with 10 replications. Based on the results, disinfection treatments containing carbendazim 2 parts per thousand (15 min), 70% ethanol (50 seconds), 25% sodium hypochlorite (5% active chlorine) plus Tween 20 (15 min), and culture medium containing cefotaxime (200 ppm) and gentamicin (5 ppm) showed to be the best sterilization method without any contamination in CP69-1062 and CP57-164 cultivars and the lowest percentage of contamination in CP48-103. For callus culture, MS media containing 2,4-D (2 mg l^{-1}) + BAP (0.5 mg l^{-1}) exhibited the highest callus growth rate and proliferation. The highest percentages of plant regeneration were observed in treatments (Kinetin = 0.5 mg l^{-1} and BAP = 0.5 mg l^{-1}), (Kinetin = 3 mg l^{-1} and NAA = 0.5 mg l^{-1}) and (Kinetin = 3 mg l^{-1} and NAA = 0.1 mg l^{-1}) with the means of 70%, 60% and 50% in CP48-103, CP57-164 and CP69-1062 cultivars, respectively.

Keywords: Auxin, Cytokinin, Carbendazim, Tween 20, Cefotaxime, Gentamicin

1 and 3. Master Graduate and Assistant Professor, Respectively, Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Research and Training Institute for the Development of Sugarcane Crops, Khuzestan, Ahvaz, Iran

※: Corresponding author Email: m.koohi@gmail.com

This paper has been extracted from the first author's MSc thesis under the guidance of Mehrana Koohi Dehkordi.