از : نسریـــن یـــــاوری *

چکیـــــده

درسال ۱۳۶۷برای نخستین باردرایران تکثیر in vitro نیشکردرآزمایشگاه کشت بافت وسسه‌اصلاح‌وتهیه بذرچغندرقندموردبررسی‌قرارگرفـت. آزمایشهای تهیه جداکشت ازنقاط مریستمـــی انتهای ساقه وجوابگوئی بافت درمراحل مختلف رشددرموردورقم 96– 62 L و310 – Nco صورت گرفت .

درعملیات جداکشت ازاسیدسیتریک (125mg/l) به عـنوان‌آنتی اکسیدان‌استفاده‌شد .محیـط های غذایی کشت طبق تحقیقات انجام گرفتـه‌توسط (1974) Ming – Chin Liu (1977) Nadar and Heinz (1977) انتخاب شده است . ایجادکالوس جوانه وتشکیل‌ریشـه بطورموفقیت آمیزانجام گرفت وگیاهان باززائی شده‌به گلدان منتقل شدند .

مقـــدمـــه

نیشکـــر Saccharum sp . گیاهی است پایاازتیره گندمیان رستـــــــــه Andropogoneae که ازطریق غیرجنسی تکثیروپس ازمدت طولانی تکثیروکشت به عوامـــل ویروسی آلوده‌می شـودوعملکردمحصول بسیارپائین می آید .برخلاف اغلب گیاهان تیره گندمیان جوابگوئی این گیاه به شرایط کشت بافت in vitro خوب است و استفاده ازاین تکنیک برای ویروس زدائـی وازدیادکلونی سریع اکنون یک بخش اساسی ازبرنامه ازدیادنیشکردرمناطق تولیداین محصول درجهان‌است. درمقاله حاضرخلاصـه‌ای ازمطالعات وبررسیهای آزمایشگاهی درموردکشت بافت نیشکرونتایج‌مقدماتی بدست آمده‌درزمینه‌ازدیاداین گیاه درشرایط in v itro درایران‌توضیح‌داده‌می شـود .

---

* ــ کارشناس آزمایشگاه کشـت بافت

تاریخچه کاربردتکنیکهای کشت in v itro دراصلاح نیشکـــــــــر

تحقیقات درزمینه کشت بافت نیشکردرسال ۱۹۶۱ درهاوائی آغازشدودرسال ۱۹۷۰ انستیتوی تحقیقات قندتایوان× تکنیکهای کشت بافت دراصلاح نیشکررابه کارگرفت . بتدریج برنامه‌های تحقیقاتی مشابه درکشورهای دیگرازجمله آمریکاوفرانسه آغازشده است .

نتایج تحقیقات‌انجام شده درهاوائی وتایوان نشان‌می دهدکه مراحل کشت بافت این گیاه شامل‌سه مرحله اصلی : تشکیل ورشدکالوس ــ تشکیل‌مریستم‌ساقه وجوانه زنی وبالاخره ریشه زائی می‌شود .

تشکیل کالوس ، بااستفاده‌ازمحیط غذایی حاوی اکسین وشیره نارگیل‌ازجداکشتهای (Explants) تهیه شده ازقسمتهایی مختلف گیاه نیشکرامکان پذیراست وبهترین نتایج ازنظردرصدتشکیل‌کالوس ومشابهت گیاهان باززائی شده+ به گیاه مادری ازجداکشت گل آذین‌نارس بدست‌می آید . تحقیقات‌بعمل آمده‌نشان داده است که کشت قسمتهای دیگرگیاه‌بـاتغییرات ژنی بسیارهمراه است که میزان این تغییرات به ارقـام موردمطالعه بستگی دارد . درهمین ارتباط کشت سلولهای منفردجداشده‌ازکشتهای سوسپانسیون سلولی‌نشان داده است که کالوس حاصل ازرشدهریک ازسلولهـامی‌تواندازنظررنگ متفـاوت باشد . هریک ازدستجـــات سلولی دررنگهای سفید ، شیری وزردلیموئی درتعدادکروموزم نیزمتفاوت هستنداین پدیده‌را "موزائیسیـــسم کروموزمی " می نامندکه درگیاه نیشکربه اثبات رسیده است ودرازدیادکلونی برنامه‌های اصلاح‌نیشکرمورد بهره برداری قرارمی گیرد .

دربرنامه‌های اصلاح نیشکرازایجاد ، پلی پلوئیدی ، هاپلوئیدی ، مقاومت به بیماریهادر ــ کشتهای بافت نیشکراستفاده شده واین کشتهاهمچنین بمنظورپیشبردوتحقیقات فیزیولوژی گیاهی درزمینـــه‌های الگوی متابولسیم کربن وسلکسیون کلونهابرای شرایط محیطی ویژه بکارگرفته شده است .(2/4)

---

x - Taiwan Sugar Research Instiute (TSRI)
Tainan Taiwan, China

+ - Regenerated

ویژگیهای کشت بافت نیشکر

باززائی گیاه کامل ازطریق کشت بافت نیشکردرعمل بادومسئله عمده روبرواست . اولا" .با شناختی که ازوقوع موزائیسیسم کروموزمی درنیشکرحاصل آمده است انتخاب صحیح بافت جداکشت Explant برای نیل به هدف تحقیقات ازاهمیت ویژه ای برخورداراست . معمولا" کشت مریستم انتهائی ساقه برای ویروس زدائی ،کشت گل آذین برای ازدیادکلونی سریع وکشت قسمتهای دیگرگیاه(مریستم انتهایی ریشه وساقه ، برگهای جوان ، بندریشه زادرگره جوان ، بافت پارانشیم مغزساقه) برای بهره گیری از تغییرپذیری ژنی درمطالعات گوناگون اصلاح نیشکربه کارمی رود .

تهیه جداکشت وانتقال بافت به محیط های مختلف غذایی in vitro چه به صورت کشت کالوس یا سوسپانسیون سلولی ، باترشح موادفنلی واکسیده شدن (Browning) شدیدبافت جداکشت همراه است وحساسترین جداکشت ها دراین ارتباط بافت های مریستمی گیاه است وکشت آنهادراثرایـن ترشحات بامانع بزرگی روبرومی شود . برای کاهش این ترشحات توصیه هایی ارائه شده که شامل بافت برداری سریع وبدون ایجادصدمه به مریستم ، استفاده ازآنتی اکسیدان ها ، تعویض سریع محیط غذایی وحفظ ظروف کشت درتاریکی است .

ثانیا" . دومین مسئله ایجادبهترین شرایط ریشه زائی برای جوانه های باززائی شده ازکالوس نیشکر است . این امردربرنامه ازدیادکلونی سریع ازاهمیت زیادبرخورداراست ودراین ارتباط درتحقیقات انجام گرفته دوروش تغذیه وهورمونی برای ریشه زائی پیشنهادشده است . (2/3)

شرایط محیطی ودوره کشت

شرایط محیطی کشت بافت نیشکرشامل خصوصیات زیراست .

- دمای ۲۶ تا ۲۸ درجه سانتیگراد
- نور فلوئورسنت سفید ۳تا ۴ هزارلوکس
- فتوپریود ۱۲/۱۲ ساعت

کشت بافت نیشکرازمرحله اولیه تشکیل کالوس تاباززائی گیاه کامل جوابگوئی خوبی دارد ، اماژنوتیپ عامل مهمی درمیزان موفقیت کشت است . درمحیط های غذایی مختلف دوره کشت ازمرحله ریشه زائی تاباززائی گیاه کامل علاوه برعواملی چون تراکم هورمونی ، ترکیب معدنی ، محیط غذائی ، مقدارمحیط غذائی دردسترس جوانه وکیفیت نورعوامل موثردیگر درموفقیت محسوب شده است (2) .مدت یک دوره کامل کشت تا مرحله انتقال گیاهان باززائی شده به شرایط معمولی رشد ۱۴تا ۲۲هفته ذکرشده است (3 / 2) .

واین گیاهان سپس تحت بررسیهای نهائی قرارمی گیرندتاخصوصیات مرفولوژیک ، پلوئیدی واصالت ژنی آنان شناسائی گردد .

اجرای عملیات کشت بافت نیشکردرایران درنیمه دوم سال ۱۳۶۷ درآزمایشگاه کشت بافت موسسه تحقیقات اصلاح‌وتهیه بذرچغندرقندآغازشد . دراین آزمایشات‌ازدورقم مرغوب ومورد‌نظرکشت وصنعت هفت ـ تیپ 96 ـ L62 و 310 ـ Nco استفاده شده است .

عملیات کشت مریستم ساقه وبرگ مریستمی‌روی ساقه‌های جوان تکثیرشده درشرایط‌آب وهوائی کرج‌انجام‌گرفت. انتخاب محیط غذائی کشت براساس نتایج علمی انتشاریافته(3 / 2 / 1)ومواددردسترس صورت گرفته است .

روش هـــــــــاومـــــــواد

۱ـ محیط غذائی کشت

۱ـ۱ـ MSC3 = محلولهای معدنی ، موادآلی ، ویتامین هاوتراکم D ـ 2/4 درصدقندوآگارمطابـــق محیـط (2)

۱ـ۲ـ MSD = محلولهای معدنی ، مـوادآلی ، ویتامین‌هاوتراکم NAA و KIN ، درصـد قندوآگارمطابق محیط (2)

۱ـ۳ـ MS5 = محلولهای معدنی ، ویتامین ها ، درصدقندوآگارمطابق MSD باحذف شیره ـ نارگیل واستفاده از۵ میلی گرم درلیتر (NAA) .

۲ـ تـهیه جداکشـــت

۲ـ۱ـ استرلیزاسیون = ساقه‌های جوان پس ازشستشوباآب معمولی دراتانل ۷۰% (به مدت ۲۰ثانیـه) وسپس‌در محلول هیپوکلریت سدیم (به مدت ۲۰ دقیقه) قرارداده ودرپایان‌باآب استریل کاملا " شستشوشدند .

۲ـ۲ـ برداشت جداکشت = این عمل ازناحیه‌مریستمی‌انتهای ساقه وبرگ مریستمی انجام گرفته است .

۲ـ۳ـ عملیات کشـــت = برای انجام کشت‌ازابزارتشریح‌استریل (سوزن ،پنس‌واسکالپل)استفاده‌شده‌وباجداکردن غلافهاازمحل اتصال آنهابه‌ساقه‌تنهاناحیه‌مریستمی‌بایک بـرگ‌مریستمی‌حفظ شد .

مریستم‌انتهائی وبرگ‌مریستمی بطورجداگانه‌درمحیط MSC3 برای تشکیل‌کالوس‌ورشد آن‌داخل‌لوله‌آزمایش‌قرارداده‌شد ، مراحل‌مختلف شامل‌تشکیل‌کالوس ،جوانه‌وریشه‌در ـ فواصل‌چهارهفته‌انجام‌گرفـــت .

۲ـ۴ـ شـرایط رشد = ظروف‌کشت دردمای۲۵درجه‌سانتیگراد وشرایط فتوپریود ۱۴/۱۰ساعت‌روز/شب وشدت‌نور ۳۰۰۰لوکس لامپ‌فلوئورسنت سفیدقرارداده‌است .

نخستین نتایج بدست آمده درآزمایشات کشت بافت نیشکر

۱ـ نتایج عملیات کشت

اجرای آزمایشات ابتدائی بااکسیداسیون شدیدبافت مریستم انتهایی ساقه بطورکامل وجداکشت برگ‌مریستمی باشدت کمتری همراه بود . عملیات کشت بااستفاده ازاسیدسیتریک (125mg/L) استریل به عنوان آنتی اکسیدان (1) درحین کشت تکرارشد . کشت دوم درشرایط یکسان باموفقیت محسوس روبروشد . قابل ذکراست که قراردادن ظروف درتاریکی بمدت یک هفته پس ازکشت درعملیات نوبت دوم رعایت‌شده بود .

۲ـ نتایج تشکیل کالوس

آغازتشکیل کالوس دقیقا " یک هفته پس ازاستقرارجداکشت درمحیط غذائی بطورمشخص مشاهده گردید . درادامه رشدبافت کالوس ، دستجات سلولی به رنگهای شیری ، خاکستری وزردلیموئی قابل تشخیص بود . رشدکالوس روی جداکشت های برگ مریستمی باسرعت بیشتری همراه بود . تفاوت ژنوتیپ ازنظرسرعت رشدکالوس ومیزان ترشح موادفنلی بابرتری رقم اول (L62-96) مشاهده شد .

۳ـ نتایج جوانه زنی

درزمان انتقال به‌کالوس‌محیط تازه پس از۴ هفته رشد ، قسمتی ازکالوس به محیط جدیدMSC3 جهت نگهداری کالوس تشکیل شده وقسمت دیگربه محیط دوم یامحیط MSD جهت تمایزجوانه انتقال داده‌شد.تشکیل نخستین نقاط مریستمی روی کالوس درمحیط MSDپس از۱۴ روزبامشاهده نقاط کلروفیل دارروی سطح کالوس ـ ثبت شدوپس ازیکماه رشد ، جوانه‌های کوچک به طول۲ تا۵ میلی متربه وضوح‌قابل تشخیص بود .دراین مرحله کشت رقم دوم (Nco-310) باجوانه‌زائی کندترازرقم اول وایجادتک جوانه همراه‌بود .

۴ـ نتایج ریشه زائی

دستجات جوانه‌های کوچک ونیزتک جوانه‌های درشت‌به محیط سوم یامحیط MS5 که حاوی ۵ـ میلی گرم NAA درلیتر محیط غذائی است انتقال یافت.ریشه زائی جوانه دراین محیط همراه باادامه رشد

۱

۲

۳

۴

عکسهای تهیه شده ازمراحل کشت بافت نیشکر : ۱ــ کالوس ۲ــ جوانه‌های باززائی شده‌از کالوس ۳ــ باززائی گیاه کامل ۴ــ انتقال به گلدان .

برگهامشاهده شد. ریشه زائی درجوانه‌های درشت زودترومشخص ترمشاهده شد . نخستین مشاهده درموردرشد ریشه درمحیط ریشه زائی ده روزپس ازانتقال به ایـن محیط غذائی ثبت شد .

نتیجه گیری وپیشنهادات

آزمایشهای مقدماتی انجام شده برای بررسی ویژگی های کشت بافت نیشکروامکان بکارگیری ایـــن تکنیک درجهت ازدیادکلونی سریع نیشکردرایران باموفقیت همراه بوده‌است .

بافراهم شدن امکانات فیزیکی وپرسنلی وهمچنین ایجاد تسهیلات درامر تامین موادشیمیائی وکمیاب موردنیاز درکشورمی توان برنامه‌تهیه وازدیادویاسالم سازی کلون های مرغوب نیشکررادرایران به مورداجراگذارد .

آزمایشگاه کشت بافت موسسه‌تحقیقات اصلاح وتهیه بذرچغندرقندمی تواندراین برنامه جهت به تحقق در ـ آوردن اهداف مذکورفعالانه همکاری نماید .

1- Bhojwani and Razdan 1983 , Plant Tissue Culture , Theory and Practice , Elsevier , PP 333 - 334 .

2- Ming - Chin Liu , 1979 , In vitro methods applied to Sugar - cane improvement , in: Plant tissue Culture , Methods and - Applications in Agriculture(Ed. T.A. Thorpe) PP. 209-223 .

3- Nadar , H.M. and D.J. Heinz, Root and shoot development from Sugar cane callus tissue, crop SCI: 77/17: 874 - 816.

4- Nickell , Louis G./ Crop Improvement in Sugarcane . Studies - using invitro methods , crop Sci : 77/17/714 - 719 .

Summary :

Research on Sugarcane (Saccharum sp.) in vitro propagation has been undertaken in Iran at Sugar Beet Seed Institute,in 1988 .

Explant preparation from meristematic regions of the shoot and the behavior of the tissue in culture were examined for Nco - 310 and L62 -96, varieties .

The use of antioxidants was proved to be absolutely necessary - during inoculation of the explants to the media and subculture procedures. The use of citric acid (125mg/l) showed good results .

The media composition was chosen according to the results obtained by Nadar and Heinz (1977) and Ming chin Liu (1979) .

Callus induction , shoot differentiation and root growth occurred and regenerated plantlets were transferred to pots under high humidity condition .

Résumé:

La multiplication invitro de la canne à sucre (Saccharum sp.) a-été effectuée en 1988 à l' Institut de Recherches de la Betterave-Sucrière en Iran .

Les particularités de la méthode de préparation de l' implant - méristema tique et le comportement des tissus cultivés in vitro ont été examinées pour les variétés : Nco - 310 et L 62 - 96 .

L' utilisation d' un antioxidant lors de la mise en culture de l' - implant s' est montrée obligatoire et l' acide citric utilisé(125mg/l) a été efficace .

La composition des media de culture a été choisie sur La base - des résultats de recherches obtenus par Nadar et Heinz (1977) et Ming - Chin Liu (1979).

L' induction et la croissance du callus , la différentiation des tigelles et la formation des racines ont eu lieu et les plantes - régénérées ont été empotées et mises dans conditions très humides.