کاربرد بیوتکنولوژی در نیشکر

بابک جعفری

مقدمه

تکنیک کشت بافت و سلول گیاهی در شرایط (Invitre درون شیشه‌ای) از جمله فنون بیوتکنولوژی است که کاربرد آن به سال ۱۹۵۰ می‌رسد بر این اساس، سلول گیاهی یا بافت از اندامهایی مثل ریشه، ساقه، برگ، گل آذین یا هر اندام دیگری از گیاه جدا شده و در شرایط کاملاً استریل و گندزدایی شده در درون لوله‌های آزمایشی محتوی محیط غذایی مصنوعی قرارگرفته و با تأمین نیازهای نوری و حرارت مناسب تبدیل به یک گیاه کامل میگردد. این تکنیک امکان تولید هزاران گیاهچه مشابه گیاه مادری را در مدت زمان بسیار کوتاه و در فضای فیزیکی بسیار محدودی را فراهم می‌سازد که با انتقال این گیاهچه‌ها به سطح گلخانه و مزرعه تولید انبوهی از گیاهان مورد نظر را می‌توان باعث شد.

کاربردهای بیوتکنولوژی در نیشکر

طی ۲۰ سال گذشته تأثیر بیوتکنولوژی در کشاورزی خیلی قابل توجه بوده است و افزایش در میزان تولید محصول در اثر کاربرد مطلوب بیوتکنولوژی امکان پذیر شده است. بیوتکنولوژی علمی است که سیستم‌های حیاتی (موجود زنده) را تحت کنترل و دستخوش تغییر قرار میدهد تا محصولات جدیدی را تولید نموده و ضمن بالا بردن میزان عملکرد گیاهی، مقاومت به بیماریها را نیز افزایش دهند. بنابراین بیوتکنولوژی می‌تواند توانایی ما را در کاهش هزینه‌ها و افزایش میزان محصول بالا ببرد. منظور از کشت بافت به عنوان یک شاخه مهم از بیوتکنولوژی، رشد دادن اندامها و بافتهای سلولی گیاه در خارج از بدن موجود زنده و در شرایط آزمایشگاهی است. به این ترتیب که سلولها یا بافت مورد نظر با مواد غذایی و سایر مواد مورد نیاز برای رشد تأمین می‌شوند، و در این میان سلکسیون‌های آزمایشگاهی به منظور انتخاب کلونهای مقاوم به استرس‌های زنده و غیر زنده انجام می گیرند.لازم به ذکر است که در نیشکر با استفاده از این تکنیک، پیشرفتهای زیادی در جهت انتخاب تعدادی واریته‌های مقاوم به بیماری انجام گرفته است. یکی دیگر از مهم‌ترین کاربردهای بیوتکنولوژی ایجاد صفت مقاومت به علفکش‌ها در گیاهان است. علفکشهای گروه تریازین (نظیر آترازین) بطور وسیع در کنترل علفهای هرز مزارع نیشکر استفاده می‌شوند، (چون گیاهان قبل از رسیدن علفکش مذکور به محل فعالیت خود، توانایی ترکیب آن را با گلوتاتیون (یک پروتئین در مسیر انتقال الکترون فتوسنتزی) دارند لذا می‌توانند آن را تحمل کنند. بنابراین در صورت اصلاح گیاهان با ژنهای تغییر یافته

علفکش‌های موثر و بدون اثر مخرب زیست محیطی در مرحله بعد از سبز شدن نیشکر می توانند مورد استفاده قرار گیرند.

ریزازدیای micropropagation

ریز ازدیادی یا کشت اندام، با یک بخش سازماندهی شده گیاهی (اغلب یک جوانه) شروع می‌شود در روند کشت بافت این ساختار سازماندهی شده را حفظ می کند، در حالیکه رشد و نمو بعدی آن را به سمت تکثیر و باززایی یک گیاه کامل جدید هدایت می کند. این کشت‌ها با کشت‌هایی که در آنها بافتهای سازماندهی شده‌ای مثل کالوس تولید می‌شوند فرق می کند. ریز ازدیادی تکثیر سریع در فضای محدود است و با استفاده از این روش می‌توان ژنوتیپ گیاه مورد نظر را بدون تغییر حفظ و کلون کرد. در این روش با استفاده از روشهای کشت بافت از ریز نمونه‌های مختلفی هم چون مریستم انتهایی، جوانه‌های جانبی، شاخه‌های نابجا و جنین استفاده می‌شود.

منبع ریز نمونه برای ریز ازدیادی: استفاده از گیاهان سالم و با رشد زیاد به عنوان منبع اولیه اهمیت زیادی دارد.

ریز ازدیادی، از زمان تهیه ریز نمونه اولیه تا بدست آوردن گیاه جدید، شامل موارد ذیل می‌باشد:

۱) انتخاب مواد گیاهی مناسب
۲) ایجاد کشت‌های عاری از میکروب
۳) تکثیر
۴) رشد طولی
۵) تکثیر ریشه
۶) کشت گیاهچه‌های بدست آمده در شرایط طبیعی (گلخانه، مزرعه)

برای تولید گیاهان عاری از ویروس بایستی قسمتی را از گیاه در نظر گرفت که ویروس‌ها یا در آغاز نبوده و یا براحتی از موضع، اندام یا بافت حذف شوند. و بدین ترتیب پس از بدست آوردن یک یا چند گیاه کامل و عاری از ویروس در ادامه با تکثیر انبوه (کلون)، گیاه عاری از ویروس تولید کرد. برای این منظور بایستی از تکنیک کشت مریستم در محیط مصنوعی استفاده کرد.

در مریستم‌ها بدلیل سرعت تقسیم بالا و همچنین عدم وجود آوندها و فضاهای بین سلولی، ویروس‌ها انتقال نمی یابند.

در آزمایشگاه کشت بافت کشت و صنعت کارون ریز ازدیادی به طریق زیر صورت گرفته است.

۱) ابتدا مزارع سالم شناسایی و از واریته سالم نمونه گیری صورت گرفته است.
۲) انتقال نمونه‌ها از مزرعه به آزمایشگاه

۳) جدا کردن نوک ساقه (مریستم انتهایی)
۴) قرار گیری نمونه‌ها زیر آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه الی ۱ ساعت جهت از بین رفتن آلودگی‌های سطحی
۵) انتقال نمونه‌ها به زیر هود و استریل سازی نمونه‌ها
۶) مراحل استریل: ضد عفونی با الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت ۵ درصد آب مقطر استریل
۷) تهیه ریز نمونه به اندازه مناسب به وسیله برش دادن نمونه
۸) کشت ریز نمونه‌ها در محیط کشت مناسب عموماً MS
۹) انتقال ریزنمونه‌ها به اتاقک رشد (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی)
۱۰) تکثیر ریزنمونه‌ها با بازکشت نمونه‌ها در محیط shoot مناسب از طریق تولید شاخه‌های جانبی
۱۱) ریشه دار کردن ریز نمونه با استفاده از محیط Root مناسب
۱۲) انتقال گیاهچه ریشه‌دار شده به گلدان
۱۳) انتقال گلدان به گلخانه
۱۴) انتقال گلدان از گلخانه به مزرعه
۱۵) گزینش از لحاظ صفات مورد بررسی

* هدف ریز ازدیادی تکثیر سریع ریز نمونه‌ها می‌باشد

فعالیت آزمایشگاه کشت بافت با هدف سالم سازی واریته CP48- 103 آغاز شد:

که بدین منظور سرنی‌ها پس از جداسازی در مزرعه و انتقال به آزمایشگاه مراحل ضد عفونی و استریل سازی را طی کرده و بصورت explant در محیط کشت استریل قرار گرفته و پس از طی مدت زمان لازم و شرایط نوری، دمایی استاندارد تحت شرایط استریل اقدام به تکثیر و ریزازدیاری (Micropropagation) واریته CP48-103 نمودیم. نمونه‌ها بطور مرتب بازکشت (subculture) میشدند، بدین صورت که پس از تکثیر جوانه‌ها از طریق قرارگیری در محیط (shoot) شاخه‌زایی و (Root) ریشه‌زایی اقدام به تولید گیاهچه سالم در آزمایشگاه نمودیم.

در سال ۸۵ الی ۸۶ بعلت تکمیل نبودن ساختمان گلخانه مجاور اداره تحقیقات که بعنوان حد واسط آزمایشگاه تا مزرعه محسوب می‌شود اقدام به ساخت یک گلخانه پلاستیکی جنب اداره نمودیم که گیاهچه‌ها پس از انتقال به گلدان و سپری کردن دوره Hardening به آنجا انتقال داده شده و در فصل کشت، ابتدا به مزرعه ۴۲۱ قطعه ۳ انتقال داده شدند که با تکمیل رشد و تهیه قلمه از آنجا به مزرعه A ۴۲۵ قطعه۳ منتقل گردیدند. سپس قطعه ۵ مزرعه ۱۲۲ با استفاده از این بوته‌های سالم سازی شده کشت شد.

هدف دیگر در آزمایشگاه کشت بافت ایجاد جهش‌های ژنتیکی از طریق somaclonal variation در ارقام تجاری نیشکر و معرفی یک رقم برتر جدید بود که از سال ۸۶ اقدام به کالوس‌گیری از واریته CP48-103 نموده که در این راستا موفق به تولید ۸۵ واریانت شدیم که از این واریانت‌ها، ۱۰ واریانت مطلوب در مقطع زمانی ۸۶ الی

۸۹ تولید و تکثیر گردید و ۲۰ واریانت دیگر هم در فاصله زمانی ۸۹ الی ۹۰ تولید و تکثیر گردید که بقیه واریانتها در حین کار مطلوب نبودند حذف شده‌اند.

- در تاریخ‌های ۸۶/۱۲/۲۸ الی ۸۷/۹/۲ واریانت‌های ۱ الی ۱۰ به مزرعه کنار گلخانه انتقال داده شده‌اند.
- در تاریخ ۸۸/۶/۱۶، کشت ۹ واریانت در مزرعه ۱-۵۱۲ صورت گرفت.
- درتاریخ ۸۹/۷/۱، تهیه قلمه واریانت‌های مزرعه ۱-۵۱۲ جهت اجرای طرح آزمایشی

- در تاریخ ۸۹/۷/۳ اجرای طرح آزمایشی بلوکهای کاملاً تصادفی در مزرعه ۴-۱۵۱ با استفاده از واریانت‌های شماره ۱ الی ۹ در مزرعه ۱-۵۱۲

- در تاریخ‌های ۱۷ و ۸۹/۷/۱۸ واریانت‌های ۱۰، ۷، ۶، ۵، ۳، ۱، جهت توسعه به مزرعه ۴-۵۱۴ انتقال و در انتهای قطعه کشت شد.

- در تاریخ‌های ۲۳ و ۹۰/۱/۲۴ انتقال گیاهک‌های تولیدی سال ۸۹ شامل واریانت‌های ۱۱ الی ۳۰ به مزرعه کنار گلخانه با همکاری گروه زراعت انجام شد.

- در سال ۱۳۸۷ تعداد ۵۸۲۶ نمونه شاخه‌زایی و ۴۳۸۹ نمونه ریشه‌زایی در آزمایشگاه تولید گردید.
- در سال ۱۳۸۸، تعداد ۶۳۸۸ نمونه شاخه‌زایی و ۲۹۸۴ نمونه ریشه‌زایی در آزمایشگاه تولید شد.
- در سال ۱۳۸۹، تعداد ۸۹۴۳ نمونه شاخه‌زایی و ۳۲۷۸ نمونه ریشه‌زایی در آزمایشگاه تولید شد.
- در سال ۱۳۹۰، تعداد ۸۷۱۱ نمونه شاخه‌زایی و ۶۷۶۰ نمونه ریشه‌زایی در آزمایشگاه تولید شد.

تعداد گلدان‌های انتقال داده شده به گلخانه در سال‌های ۱۳۸۷ الی ۱۳۹۰:

سال ۱۳۸۷	۱۹۰۹ گلدان
سال ۱۳۸۸	۱۰۱۴ گلدان
سال ۱۳۸۹	۵۰۰ گلدان
سال ۱۳۹۰	۲۸۰۸ گلدان

هر ساله شمار زیادی از گلدان‌ها به علت مجهز نبودن گلخانه به وسایل گرمایش و سرمایش و عدم انتقال از اطاق رشد به گلخانه در تمام سال، از بین رفته و این مشکل بزرگی برای آزمایشگاه محسوب می‌شود. چرا طبق آمار موجود، در سال ۱۳۸۷ از ۱۹۰۹ گلدان کشت شده در آزمایشگاه تنها ۱۰۸۱ گلدان به مزرعه منتقل شد که ۸۲۵ گلدان از بین رفتند. متأسفانه این مشکل در سالهای بعد هم حل نشد به طوری که در سال ۱۳۹۰ از ۲۸۰۸ گلدان کشت شده در آزمایشگاه ۱۷۸۹ گلدان بدلیل شرایط نامناسب گلخانه، انتقال زود هنگام گیاهچه‌ها به مزرعه از بین رفتند و فقط ۱۰۱۹ گلدان به مزرعه انتقال داده شد، گیاهچه‌های تولید شده قبل از انتقال به مزرعه باید در یک محیط حد واسط آزمایشگاه و مزرعه قرار گیرند تا پس طی کردن دوره سازگاری، به مزرعه انتقال یابند.

متأسفانه هر چقدر که کار در آزمایشگاه خوب پیش برود و موفق به تولید تعداد زیادی گلدان شویم ولی تعداد گلدان‌های باقی مانده در گلخانه اهمیت دارد و بیلان کاری محسوب می‌شود که اگر رفع مشکل نشود بازهم میزان تلفات گلدان‌ها بالا خواهد بود.

تنوع سوماکلون somaclonal variation

بافتهای حاصل از کشت یک ریز نمونه یا سلول منفرد در شرایط درون شیشه‌ای، پس از واکشت‌های متوالی ممکن است از نظر صفات مورفولوژیکی مانند سرعت رشد، رنگ، جنین‌زایی، قابلیت باززایی و همچنین صفات فیزیولوژی دارای تنوع و اختلاف باشند. این اختلاف‌ها که اغلب نتیجهٔ ناپایداری ژنیتیکی است، تنوع سوما کلون نامیده می‌شود، این واژه در سال ۱۹۸۱ معرفی شد. تغییرات ژنتیکی در کشت‌های بافت گیاهی نشان دهندهٔ آن است که بافت در شرایط درون شیشه‌ای به ایجاد جمعیتهایی از ژنوتیپ‌های مختلف منجر می شود که از راه انتخاب، اصلاح میشوند. پیدایش چنین تنوع هایی در کشت‌های کالوس، سوسپانسیون سلولی و پروتوپلاست، اساس انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای را تشکیل می‌دهند، به طوری که میتوان با استفاده از روش‌های مناسب سلول‌های دارای ویژگی مطلوب را شناسایی و جدا کرد. از این راه میتوان لاین‌های سلولی مقاوم به علفکش ها یا لاین‌هایی با قدرت بیشتر برای تولید فرآورده‌های بیوسنتزی ثانویه را انتخاب کرد.

*** مراحل انتخاب سلول در شرایط درون شیشه‌ای برای سوماکلون‌های مقاوم به تنش‌های زنده و غیر زنده**

- منبع کشت (کالوس، سوسپانسیون سلولی، ذرات پروتوپلاستی)
- نگهداری در شرایط تنش (علف‌کش، نمک، مایه قارچ، درجه حرارت کم)
- انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای
- افزایش میزان تنش
- انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای
- انتخاب سلول مقاوم
- رشد کالوس و باززایی سلول‌های مقاوم
- انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای
- گیاه باز زا شده
- تولید بذر و نتایج
- بررسی در آزمایشگاه و مزرعه

تجزیه و تحلیل نتایج

باززایی سوماکلون‌ها و سپس انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای این مزیت را دارد که انتخاب در مراحل اولیه صورت پذیرد، از این رو احتمال انتخاب جهش‌های نامطلوب به حداقل میرسد. مزیت دیگر این است که تعداد زیادی از افراد را میتوان غربال کرد و پس از انتخاب، تنها تعداد کمی از افراد نگهداری و باززایی می‌شوند اما انتخاب در شرایط

طبیعی مستلزم وجود تعداد زیادی گیاه است که تهیه و نگهداری آنها بسیار مشکل است. با وجود نقش مثبت انواع تنوع سوماکلون در اصلاح نباتات، باید به خاطر داشت که پیشرفت‌های اصلی و با ارزش در نباتات زراعی از راه روش‌های کلاسیک اصلاحی حاصل شده است. بنابراین این روش‌هایی همچون تنوع سوماکلون باید همواره با روش‌های کلاسیک اصلاحی به کار گرفته شوند.

با وجود امکانات آزمایشگاهی فعلی هم قادر به تولید واریته جدید هستیم. چون ابتدا از برگهای اولیه کالوس میگیریم این کالوس، توده سلولی تمایز نیافته است و با توجه به استعمال ماده جهش زای 2,4-D در کالوسها جهش صورت گرفته و هر نو ساقه‌ای که از این کالوسها بوجود بیاید یک واریانت جدید محسوب میشود چون هر قطعه ی کالوس حاوی هزاران سلول جهش یافته است و هر جوانه ای که به وجود آید، واریانت جدید محسوب میشود به طوری که از یک پتری دیش میتوان حداقل ۱۰ واریانت جدید تولید کرد ولی چون جهش ها تصادفی هستند هم جهش مفید هم جهش مضر روی داده است لذا واریانتها باید با استفاده از دستگاه PCR که در کشت و صنعت کارون موجود نمیباشد از لحاظ الگوی ژنی با واریته اصلی مورد مقایسه قرار گیرد تا جهش ثابت شود و سپس آزمایشات لازم بر روی خصوصیات کمی و کیفی واریانتها صورت گیرد و همچنین آزمایشات مزرعه ای انجام شود و در صورت برتر بودن خصوصیات آن واریانت، به عنوان واریته جدید معرفی گردد. هم اکنون طرحهای در حال اجراء (تنشهای شوری، خشکی و سرما) هم اگر به نتیجه برسند علاوه بر اینکه متحمل به تنش مربوطه هستند واریته جدید هم محسوب میشوند.

امید که در این آزمایشگاه بتوانیم شاهد تولید واریته ای متحمل به تنشهای غیر زنده و واجد خصوصیات کیفی و کمی برتر نسبت به واریته های موجود باشیم.

واحد کشت بافت

مدیریت تحقیقات کشاورزی

شرکت کشت و صنعت کارون