Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

# The effect of increasing genomic DNA content on catalase gene expression and salinity resistance in two sugarcane cultivars

**Maryam Ghaedi**

Master's degree in Plant Biotechnology, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran, Email: Maryamghaydi1372@gmail.com

**Payam Pour Mohammadi**

*Corresponding author. Assistant Professor, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran, Email: Mohammadi@asnrukh.ac.ir

**Ali Reza Shafeinia**

Assistant Professor, Plant Production and Genetics Department, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran, Email: Shafeinia@asnrukh.ac.ir

**Mohammad Reza Salehisalmi**

Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Khuzestan, Iran, Email: Mrsalehisalmi@gmail.com

---

***Abstract***

**Objective**

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is a commercial plant that extracts more than 70% of the sugar produced worldwide. Salinity in many arid and semi-arid regions of the world is considered as a major problem and limiting factor for growth, quality and yield of crops including sugarcane. Chromosome manipulation of the plant species is one of the most powerful methods of plant breeding because of its effect on some morphological, physiological and genetic variation. The aim of this study was to investigate the effect of different levels of colchicine mutagen on changes in DNA content and to investigate the effect of increasing DNA content on the transcription rate of catalase gene.

**Materials and methods**

In this experiment, sugarcane seedlings were treated with colchicine (concentrations of 0, 100, 200 and 400 mg / L) in two CP48 and CP69 cultivars for 8, 24 and 48 hours, respectively. The plants were then examined for morphological and physiological characteristics. Plants were then exposed to saline stress (200 mM NaCl) and normal. After applying stress, plants with probable polyploidy were examined for genetic content using flow cytometry. Also, to investigate the expression pattern of Catalase gene (*CAT2*), leaf sampling was done 24 h after salinity stress from control and stressed plants.

**Results**

The results showed that viability, height and density of stomata decreased with increasing colchicine concentration and duration of treatment. However, stomata size increased with increasing colchicine concentration and duration of treatment and chlorophyll and photosynthesis increased with increasing duration of treatment. The results showed that the expression of this gene was significantly increased in both CP48 and CP69 cultivars under salinity stress. The expression of this gene was increased in CP69 cultivar treated with colchicine and this increase was significant at 200 mg / L colchicine. While in CP48 cultivar the effect of colchicine treatment was not significant.

**Conclusions**

Based on the above results, it can be concluded that increasing the genetic content of sugarcane can improve salinity resistance.

**Keywords:** Catalase gene, Colchicine, Polyploidy, Salinity resistance, Sugarcane.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Ghaedi M, Mohammadi PP, Shafeinia AR, Salehisalmi MR (2022) The effect of increasing genomic DNA content on catalase gene expression and salinity resistance in two sugarcane cultivars. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 101-118.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 101-118. DOI: 10.22103/jab.2022.18758.1367

Received: March 12, 2022. Received in revised form: April 24, 2022.

Accepted: April 25, 2022. Published online: May 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

---

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

# بررسی تأثیر افزایش محتوی ژنومیک DNA بر بیان ژن کاتالاز و میزان مقاومت به شوری در دو رقم نیشکر

**مریم قائدی**

دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان، ایران، رایانامه: Maryamghaydi1372@gmail.com

**پیام پورمحمدی**

* نویسنده مسئول: استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان، ایران، رایانامه: Mohammadi@asnrukh.ac.ir

**علی‌رضا شافعی نیا**

استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان، ایران، رایانامه: Shafeinia@Asnrukh.ac.ir

**محمدرضا صالحی‌سلمی**

دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان، ایران، رایانامه: Mrsalehisalmi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۲/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۵

## چکیده

**هدف:** نیشکر (*Saccharum officinarum* L.) یک گیاه صنعتی است که بیش از ۷۰ درصد شکر تولید شده در سراسر جهان از آن استخراج می‌شود. شوری در بسیاری از مناطق خشک و نیمه خشک جهان به عنوان یک مشکل اساسی و عامل محدود کننده رشد، کیفیت و عملکرد محصولات زراعی از جمله نیشکر محسوب می‌شود. دست‌ورزی در محتوای کروموزوم گونه‌های گیاهی به علت تأثیر آن در برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و ایجاد تنوع ژنتیکی، یکی از روش‌های توانمند اصلاح نباتات محسوب می‌شود. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر سطوح مختلف موتاژن کلشی‌سین بر تغییر در محتوای DNA و بررسی تأثیر افزایش محتوای DNA بر میزان رونویسی از ژن کاتالاز می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این آزمایش ریشه گیاهچه‌های نیشکر در دو رقم CP۴۸ و CP۶۹ با ماده کلشی‌سین (غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) در مدت زمان‌های ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس گیاهان از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از یک ماه از تیمار گیاهان با کلشی‌سین، گیاهان رشد کرده از پنجه‌زنی، در دو شرایط تنش شوری (۲۰۰میلی‌مولار نمک) و نرمال قرار گرفتند. پس از اعمال تنش، در گیاهانی که بر ا ساس تعداد و اندازه روزنه احتمال تغییر در محتوی ژنتیکی می‌رفت با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری محتوی ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت بررسی الگوی بیان ژن کاتالاز (*CAT2*)، نمونه‌برداری برگ در فاصله ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش شوری، از گیاهان شاهد و تحت تنش انجام شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد که میزان زنده‌مانی، ارتفاع و تراکم روزنه‌ها با افزایش غلظت کلشی سین و مدت زمان اعمال تیمار، کاهش می‌یابد. درحالی که اندازه روزنه‌ها با افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان اعمال تیمار افزایش پیدا می‌کند. بیان ژن کاتالاز در گیاهان تحت تنش شوری در هر دو رقم CP۴۸ و CP۶۹ افزایش معنی‌داری پیدا کرد. بیان این ژن درگیاهان رقم CP۶۹ تحت تیمار کلشی سین نیز افزایش پیدا کرد و در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کلشی سین این افزایش بیان معنی‌دار بود. در حالی که در رقم CP۴۸ تأثیر تیمار کلشی‌سین غیرمعنی‌دار بود.

**نتیجه‌گیری:** در مجموع بر اساس نتایج این تحقیق، احتمالاً افزایش محتوی ژنتیکی در نیشکر می‌تواند مقاومت به شوری را بهبود دهد.

**کلیدواژه‌ها**: پلی‌پلوئیدی، ژن کاتالاز، کلشی‌سین، نیشکر، مقاومت به شوری.

**نوع مقاله**: پژوهشی.

**استناد:** قائدی مریم، پورمحمدی پیام، شافعی‌نیا علی‌رضا، صالحی‌سلمی محمدرضا (۱۴۰۱) بررسی تأثیر افزایش محتوی ژنومیک DNA بر بیان ژن کاتالاز و میزان مقاومت به شوری در دو رقم نیشکر. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۲)، ۱۰۱-۱۱۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## مقدمه

نیشکر با نام علمی (*Saccharum officinarum* L.) از راسته‌ی آندروپوگونیا (Andropoganeae) و تیره‌ی گرامینه (Poacea) می‌باشد و یک محصول تجاری است که ۱۳-۱۶ درصد ساکاروز در ساقه آن تجمع می‌یابد (Moore 1995). بیش از ۷۰ درصد شکر تولید شده در سراسر جهان از نیشکر بدست می‌آید (Lakshmanan et al. 2005). دست‌ورزی در محتوای

کروموزوم و اندازه ژنوم گونه‌ها به علت تأثیر آن در برخی از ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی، ابزاری توانمند در مطالعات گیاهی بوده و در تکامل ژنتیکی بسیاری از گیاهان، مؤثر شناخته شده است (Ochatt et al. 2011). اگر چه فراوانی گیاهان پلی‌پلوئید اغلب پایین می‌باشد، اما تنوع ایجاد شده از طریق القای آن بالا بوده و ژرم‌پلاسم گیاهی متنوعی را جهت انجام مطالعات اصلاحی فراهم می‌سازد (Thao et al. 2003). القاء پلی‌پلوئیدی در اغلب گیاهان موجب تولید واریته‌های جدید با کیفیت متمایز می‌شود. از طرفی دیگر از طریق دو برابر شدن سطح کروموزومی در گیاهان، افزایش تعداد نسخه‌های ژنی و افزایش جثه گیاه، موجب افزایش ترکیبات ثانویه گیاهان می‌شود. تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی بسیاری پس از القای پلی‌پلوئیدی اتفاق می‌افتد و ممکن است به علت افزایش بیان ژن‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش پیدا کند (Zhang et al. 2010). القای پلی‌پلوئیدی به عنوان یک سازوکار برای افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه و افزایش مقاومت به برخی از تنش‌ها در نظر گرفته می‌شود (Liu et al. 2011). القاء مصنوعی پلی‌پلوئیدی با استفاده از عوامل بازدارنده میتوزی مختلفی مانند کلشی‌سین، اوریزالین[1] و تریفلورالین[2] انجام می‌شود (Dhooghe et al. 2011).

تغییر در بیان ژن‌ها از مهمترین اتفاقاتی است که در سلول‌های گیاهی تحت تنش روی می‌دهد و منجر به پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در برابر تنش می‌شود. در سال‌های گذشته بررسی بیان و نحوه تنظیم ژن‌ها به‌عنوان یکی از ابزارهای مهم در جهت اصلاح برای مقاومت به تنش در گیاهان به‌کار رفته است (Mohammadi et al. 2012). پلی‌پلوئیدی مکانیسم‌هایی را در سلول فعال کرده که در نتیجه آن میزان DNA الگو و به دنبال آن نسخه‌برداری و ترجمه نیز تحت تأثیر قرار گرفته و منجر به افزایش، کاهش و یا حتی خاموشی ژن می‌شود و به این صورت بسیاری از صفات فیزیولوژیک و ریخت‌شناسی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Adams and Wendel 2005). روش‌های مختلفی به منظور بررسی بیان ژن وجود دارد، با این حال ابداع Real-time PCR انقلابی را در حوزه بررسی بیان ژن در موجودات زنده به‌وجود آورده است. مهمترین مزیت این روش اختصاصی بودن و حساسیت بالای آن است (Pabinger et al. 2014). در روش کمیت‌سنجی نسبی Real-time PCR، کاهش یا افزایش بیان ژن نسبت به ژن مرجع که به طور معمول یک ژن خانه‌دار است مورد بررسی قرار می‌گیرد و لزومی به دانستن تعداد کپی‌های دقیق ژن در نمونه‌ها نیست (Brunner et al. 2004). علاوه بر این، اپی‌ژنوم شامل مکانیسم‌های مختلفی است، به عنوان مثال متیلاسیون DNA، بازسازی مجدد، تغییرات دم هیستون، microRNAهای کروماتین و RNA های بلند غیر کدکننده، با عوامل محیطی مانند تغذیه، عوامل بیماری‌زا، آب و هوا برهمکنش می‌کنند تا بر پروفایل بیان ژن‌ها و ظهور فنوتیپ‌های خاص تأثیر بگذارند (Mohammadabadi, 2021). تعاملات چند سطحی بین ژنوم، اپی ژنوم و عوامل محیطی ممکن است رخ دهد. علاوه بر این، شواهد متعددی حاکی از تأثیر تنوع اپی ژنوم بر سلامت و تولید است (Mohammadabadi and Asadollahpour Nanaei,

[1] . Oryzalin

[2] . Trifluralin

2021). لذا با توجه به اینکه القاء پلی‌پلوییدی (و در نتیجه افزایش محتوای DNA) به عنوان یک ساز وکار برای افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه و افزایش مقاومت به برخی از تنش‌ها در نظر گرفته می‌شود و نیز اگر چه فراوانی گیاهان پلی‌پلوئید اغلب پایین است، اما تنوع ایجاد شده از طریق القای آن بالا بوده و ژرم‌پلاسم گیاهی متنوعی را جهت انجام مطالعات اصلاحی فراهم می‌سازد و با در نظر گرفتن این مسأله که پلی‌پلوئیدی مکانیسم‌هایی را در سلول فعال کرده که در نتیجه آن میزان DNA الگو و به دنبال آن رونویسی و ترجمه نیز تحت تأثیر قرار گرفته و منجر به افزایش، کاهش و یا حتی خاموشی ژن می‌شود، هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر محتوای DNA بر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و رونویسی برخی ژن‌های مرتبط با تنش شوری در گیاه نیشکر است.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. جهت تهیه مواد گیاهی مناسب که از نظر مرحله رشدی یکسان باشند، گیاهچه‌های نیشکر حاصل از کشت درون شیشه‌ای برگ ارقام CP۴۸ و CP۶۹ در محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم در لیتر BAP (Eslami et al. 2020) مورد استفاده قرار گرفتند. پس از باززایی، گیاهان از محیط کشت خارج شده و پس از شستشوی کامل ریشه‌ها به منظور حذف آگار باقیمانده، گیاهچه ها به ظروف آب مقطر دارای غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کلشی‌سین به مدت زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت منتقل شدند. پس از طی مدت زمان‌های ذکر شده به گلدان حاوی کوکوپیت و پرلیت منتقل شدند و پس از طی مراحل سازگاری در اتاق رشد با دمای ۲۵ $^{\circ}$ C و دوره نوری ۸/۱۶ ساعت (روشنایی/تاریکی) و شدت نور ۵۰۰ $\mu molm^{-2}s^{-1}$، تاثیر تیمارهای اعمال شده روی خصوصیات میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها و خصوصیات مورفولوژیکی از جمله ارتفاع گیاهان بررسی شد. پس از یک ماه از تیمار گیاهان با کلشی‌سین، گیاهان رشد کرده از پنجه‌زنی (گیاهچه های جدید ایجاد شده در طوقه گیاه)، در دو شرایط تنش شوری (۲۰۰میلی‌مولار نمک) و نرمال قرار گرفتند.

**مطالعات میکروسکوپی:** برای مشاهده روزنه‌ها، از برگ‌های بالغ و کاملاً توسعه‌یافته و تا حد ممکن برگ‌های هم‌سن و هم‌اندازه از قسمت میانی هر یک از گیاهان استفاده شد. سپس با استفاده از تکنیک لاک ناخن (Hamill et al. 1992). برای تعیین تعداد روزنه‌های سطح برگ، لایه فوقانی برگ با قشری نازک از لاک بی‌رنگ معمولی پوشانیده شد. پس از خشک شدن، با استفاده از نوار چسب لایه فوق روی یک لام تمیز قرار داده شد و با میکروسکوپ نوری (40x) (شرکت Hund wetzlar) تعداد روزنه‌ها در میلی‌متر مربع مشاهده و شمارش گردید.

**فلوسایتومتری:** برای تعیین سطح پلوییدی گیاهچه‌های مذکور، از دستگاه فلوسایتومتری (آنالیزر پلوییدی PA شرکت Partec) و دستورالعمل Dehghan et al. (2012) استفاده شد. برای این منظور مراحل آماده‌سازی نمونه برای تزریق به دستگاه



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

فلوسایتومتری و تعیین وضعیت پلوییدی به این شرح انجام شد: از برگ‌های جوان و رشد یافته قطعاتی به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر مربع تهیه شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه، Partec) به این نمونه‌ها اضافه شده و با تیغ به نحوی که از له‌شدگی بافت جلوگیری شود، مقطع برگی به خوبی خرد شد. پس از آن محلول سوسپانسیون حاوی DNA گیاهی تهیه شده از فیلترهای مخصوص دستگاه عبور داده شده و ۱۶۰۰ میکرولیتر محلول رنگ آمیزی هسته حاوی ۴ و ۶-دی آمیدینو-۲ فنیل ایندول (DAPI، محلول B کیت) به آن اضافه گردیده و پس از ۶۰-۳۰ ثانیه برای شمارش به دستگاه تزریق شد. گیاهان شاهد نیز برای مقایسه اثرات کلشی‌سین مورد استفاده قرار گرفتند و پیک به‌دست آمده از آنها مبنای کار مقایسات محتوای DNA قرار گرفت.

**بررسی بیان نسبی ژن *CAT2*، با روش Real-Time PCR:** واکنش Real-Time PCR با استفاده از مسترمیکس 2X Real-time PCR Master Mix (SYBR Green) (شرکت Fermentas) دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR System (شرکت ABI) انجام‌شد که برای هر ژن دو تکرار بیولوژیکی (از دو گیاه متفاوت از هر تیمار) و دو تکرار تکنیکی (دو تکرار برای هر cDNA) در نظر گرفته شد. در این تحقیق، از جفت آغازگر ژن‌های *CAT2* و ژن اکتین به‌عنوان ژن خانه‌دار (جدول ۱) با استفاده از برنامه Primer Quest موجود در سایت IDT (www.idtdna.com) طراحی و جهت سنتز به شرکت سیناکلون ارسال گردید. منحنی استاندارد برای ژن‌های مورد نظر در غلظت‌های مختلف cDNA رسم شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت New England و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مخلوط واکنش شامل مسترمیکس 1x (green SYBR) (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۱۰۰ نانوگرم cDNA، ۰/۵ میکرومول از هر یک از آغازگرهای مستقیم و معکوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برنامه دمایی شامل ۵ دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای C °۹۴ و به دنبال آن۴۰ چرخه شامل ۵ ثانیه دمای C °۹۴ ، ۲۰ ثانیه دمای C °۶۰ و ۲۰ ثانیه دمای C °۷۲ در نظر گرفته شد. همه واکنش‌ها در دو تکرار بیولوژیکی و دو تکرار تکنیکال فنی انجام و برای هر ژن در هر آزمایش یک کنترل منفی (بدون cDNA) در نظر گرفته شد. پس از استخراج نتایج خام از دستگاه Time-Real PCR ، تکرارهایی که تکثیر غیراختصاصی (بیش از یک پیک در منحنی ذوب) داشتند از داده‌های آزمایش حذف شدند. در نهایت میزان بیان نسبی ژن‌ها با روش $\Delta\Delta Ct$ و نرم افزار REST محاسبه شد (Pfaffl et al. 2002; Schmittgen and Livak 2001).

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** آزمایش برر سی تاثیر کلشی سین در مدت زمان‌های مختلف به صورت فاکتوریل با سه فاکتور انجام شد. فاکتورها شامل ژنوتیپ در ۲ سطح، غلظت کلشی سین در ۴ سطح (غلظت‌های $mgl^{-1}$ ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰) و مدت زمان تیمار در سه سطح (۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با سه تکرار در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسات میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم شدند.

**جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در واکنش Real-Time PCR**

**Table 1. Specifications of primers used in Real-Time PCR reaction**

| نام ژن Gene name | | توالی آغازگرها Primers Sequence (5'-3') | دمای اتصال آغازگر ($^0$C) Annealing temperature (℃) | طول قطعه تکثیر شده (bp) Amplicon size (bp) |
|---|---|---|---|---|
| *Act* | Forward | CCATGTTCCCAGGTATTGC | 60 | 148 |
| | Reverse | AGCCTCCAATCCAGACAC | | |
| *CAT2* | Forward | GTCCTTGGTCTCTACTCAAT | 60 | 142 |
| | Reverse | TCTTGTGCTTGACTCTTCTAG | | |

## نتایج و بحث

### تـأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با کلشی‌سین بر خصوصیات مورفولوژیکی و محتوی ژنتیکی گیاهچه‌های

**نیشکر:** تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از این آزمایش نشان داد که بین منابع تغییر رقم و زمان‌های مختلف قرارگیری ریشه‌های گیاهچه‌ها در محلول کلشی‌سین در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد و اثر متقابل میزان کلشی‌سین و مدت زمان از نظر میزان زنده‌مانی در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲).

مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کلشی‌سین و مدت زمان‌های مختلف اعمال تیمار، بر روی میزان زنده‌مانی، با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد ( نمودار ۱) نشان داد که با افزایش زمان و میزان غلظت کلشی‌سین، میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها کاهش پیدا می کند. در تحقیق Mohammadi et al. (2011) نیز نشان داده شد که افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار باعث افزایش شدت مرگ و میر و ناهنجاری در گیاهان می‌شود. در القاء پلی‌پلوئیدی در گیاهان فاکتورهای بسیار متنوعی دخالت دارد که از این فاکتورها می‌توان به نوع مواد جهش‌زا، غلظت آن‌ها، زمان تیمار، نوع ژنوتیپ و ریزنمونه و عوامل متعدد دیگر اشاره کرد. غلظت بهینه جهت القای پلی‌پلوئیدی در ژنوتیپ‌های مختلف و در مراحل مختلف متنوع می‌باشد. به نظر می‌رسد در مرحله دو برگ حقیقی، نسبت به مراحل اولیه رشد با جلوگیری از ورود کلشی‌سین به سلول گیاه و تداخل با محصول DNA اثر سمی کمتری داشته و در نتیجه سبب کاهش مرگ و میر گیاهچه‌ها در این مرحله رشدی گردید (Mensah et al. 2007). در واقع رابطه معکوس بین غلظت کلشی‌سین با بقاء ریزنمونه‌ها در این آزمایش مورد انتظار بود که با سایر بررسی‌های انجام شده روی گیاهان مختلف در شرایط طبیعی مانند گیاه شبدر (*Trifolium alexandrinum* L.) مطابقت داشت ( El-Naby et al. 2012).



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

**جدول ۲. تجزیه واریانس تـأثیر غلظت و مدت زمان تیمار با کلشی‌سین بر میزان زنده‌مانی، ارتفاع و تعداد روزنه**

**Table 2. Analysis of variance of the effect of cultivar, colchicine and time on viability, height and density of stomata**

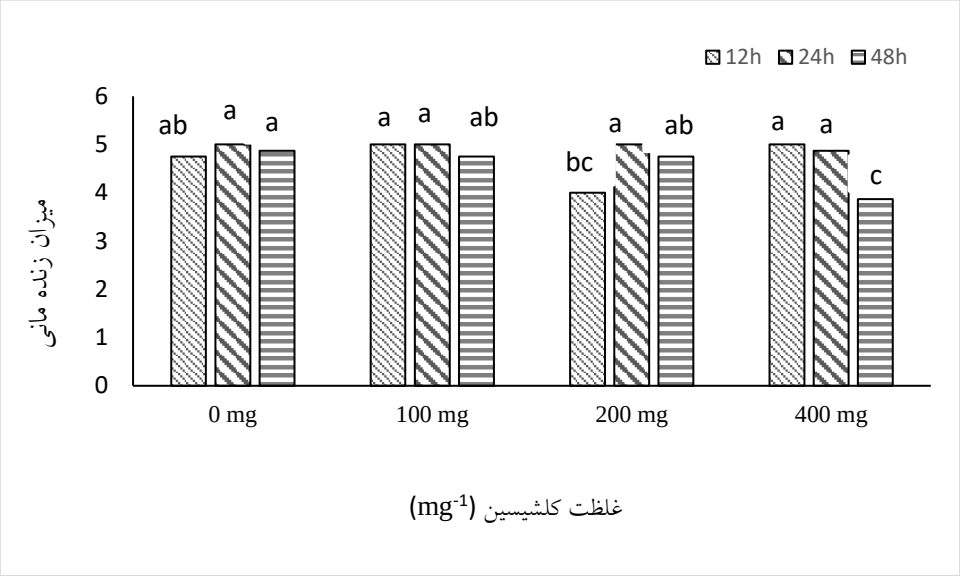
| Mean of squares (MS) میانگین مربعات | | | درجه آزادی Degree of freedom | منابع تغییرات Sources of variation |
|---|---|---|---|---|
| تعداد روزنه Number of stomata | ارتفاع High | میزان زنده مانی Survival rate | | |
| 28.167* | 51.92** | 2.334* | 1 | Cultivar رقم |
| 3.903ns | 46.856** | 0.788 ns | 3 | Colchicine concentration غلظت کلشی‌سین |
| 36.375** | 27.099* | 1.385* | 2 | Treatment duration مدت زمان تیمار |
| 56.472** | 12.2 ns | 0.899 ns | 3 | Cultivar×Colchicine Concentration رقم×کلشی‌سین |
| 23.167* | 8.175ns | 0.406 ns | 3 | Cultivar× Treatment duration رقم× زمان |
| 65.736** | 15.166* | 1.372* | 6 | Treatment duration ×Colchicine Concentration زمان×کلشی‌سین |
| 26.222** | 12.657 ns | 0.753 ns | 6 | Cultivar×Colchicine Concentration× Treatment duration رقم×کلشی‌سین×زمان |
| 5.493 | 6.559 | 0.427 | 72 | Error خطا |

****معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد و ns عدم معنی دار بودن**

**(*Significance at 5% probability level, ** Significance at 1% probability level and ns= non significance)**

تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از این آزمون نشان داد برای صفت ارتفاع، بین ارقام و مقدارهای مختلف کلشی‌سین در سطح احتمال ۱ درصد و بین مدت زمان‌ها و اثر متقابل زمان و مقدار کلشی‌سین در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۲). در پژوهش حاضر القای پلی‌پلوئیدی در گیاهان نیشکر سبب کاهش معنی‌دار ارتفاع نسبت به گیاهچه‌های شاهد شده است که مطابق با نتایجی است که در انگیزش پلی‌پلوئیدی در *Zizyphus jujube* به‌دست آمد، به‌طوری‌که گیاهان پلی‌پلوئید بصورت

معنی‌داری کوتاهتر از گیاهان دیپلوئید بودند (Gu et al. 2005). با توجه به نمودار مقایسه میانگین (شکل ۲) کمترین ارتفاع در تیمار با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم به مدت ۴۸ ساعت (۷/۵۵) و بیشترین ارتفاع در تیمار با غلظت ۱۰۰ به مدت ۲۴ ساعت (۱۳/۷۵۵) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد نداشت.




**شکل ۱. نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل کلشی‌سین و زمان بر میزان زنده‌مانی گیاهچه‌های دو رقم CP٤٨ و CP٦٩ با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪**

**Figure 1. Comparison of the mean interaction of colchicine and time on seedling viability of CP48 and CP69 cultivars using Duncan test at 1% probability level**

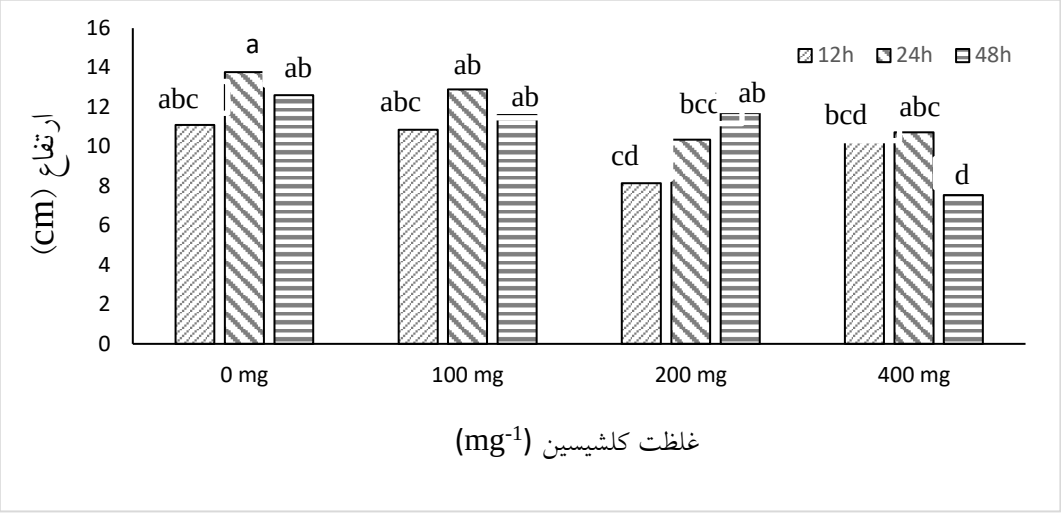
کاهش ارتفاع در گیاهان پلی‌پلوئید احتمالاً به علت سمیت بالای کلشی‌سین و احتمالاً تاثیر منفی آن روی فعالیت‌های فیزیولوژیکی از جمله تولید و فعالیت هورمون‌های رشد گیاه است. در مطالعات انجام شده روی چند گیاه دارویی از جمله *Astragalus memberanaceus* دلیل رشد آهسته گیاهان تتراپلوئید را اثر تخریبی فیزیولوژیکی کلشی‌سین در کاهش سرعت تقسم سلولی دانسته‌اند (Chen and Gao 2007).

در مقایسه میانگین اثر ارقام بر میزان ارتفاع گیاهچه‌های دو رقم CP۴۸ و CP۶۹ با استفاده از آزمون دانکن، رقم CP۴۸ بیشترین ارتفاع (۱۱/۸۲) و رقم CP۶۹ کمترین ارتفاع (۱۰/۲۳) را داشت، اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد (شکل ۳ ) معنی‌دار بود. بررسی پیک‌های حاصل از فلوسایتومتری بین نمونه‌های حاصل از گیاهان شاهد و گیاهان تیمارشده با کلشی‌سین نشان داد که در گیاهان شاهد Peak ها بین فلورسانس(FL)۳۰ و FL۶۰ بودند که به ترتیب نمایانگر فاز $G_1$ و $G_2$ یا M می‌باشد، اما در گیاهانی که تحت تیمار کلشی‌سین قرار گرفته بودند و بررسی‌های مورفولوژیکی بین آنها و گیاهان شاهد تفاوت نشان داده بود، Peak ها بین FL ۴۰ تا FL ۸۰ بود. دلیل بالاتر بودن Peakها در گیاهان با محتوی ژنتیکی بیشتر، جذب بالاتر نور فلورسانس در هسته



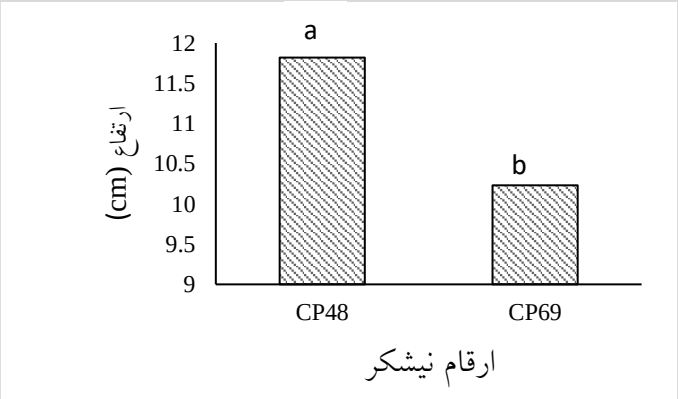
Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

سلول‌های آنها می‌باشد. نتایج بررسی فلوسایتومتری نشان داد که از بین ۱۲ گیاه بررسی شده ۵ گیاه از نظر محتوی ژنتیکی با گیاهان شاهد تفاوت داشتند.




**شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل کلشی‌سین و زمان بر میزان ارتفاع گیاهچه‌های دو رقم CP۴۸ و CP۶۹ با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪**

**Figure 2. Comparison of the mean interaction of colchicine and time on seedling height of CP48 and CP69 cultivars using Duncan test at 5% probability level**




**شکل ۳. مقایسه میانگین اثر ارقام بر میزان ارتفاع گیاهچه‌های دو رقم CP۴۸ و CP۶۹ با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪**

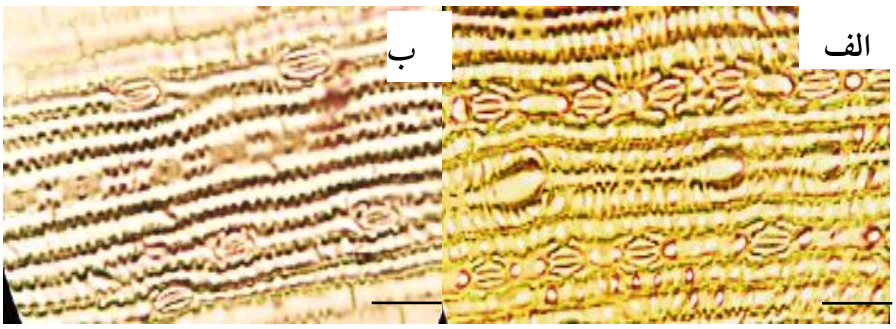
**Figure 3. Comparison of the mean effect of cultivars on seedling height of CP48 and CP69 cultivars using Duncan test at 5% probability level**

**مطالعات میکروسکوپی (شاخص‌های روزنه‌ای) گیاهان تیمار شده با کلشی‌سین:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس تعداد روزنه در یک میلی‌متر مربع از سطح پشت برگ در مرحله توسعه کامل برگ‌ها (شکل ۴) نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بین مدت زمان‌های اعمال تیمار کلشی‌سین، اثر متقابل مدت زمان و کلشی‌سین، رقم و



Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

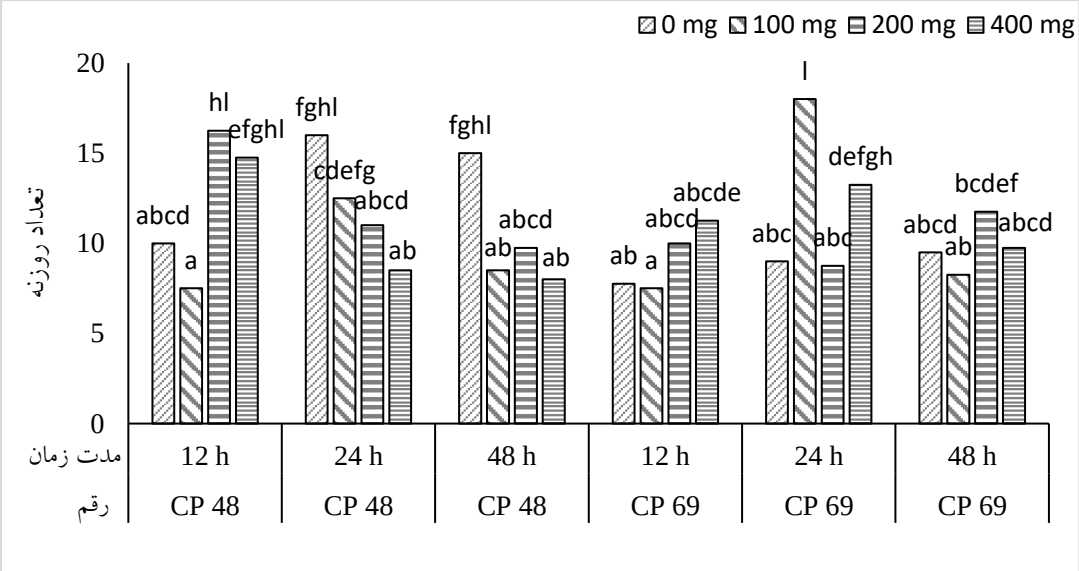
کلشی‌سین، اثر متقابل رقم، کلشی‌سین و زمان وجود داشت و در سطح احتمال ۵ درصد بین ارقام و اثر متقابل رقم و زمان اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۲).




**شکل ٤. روزنه در برگ گیاه تیمار شده با کلشی‌سین (الف) در مقایسه با تیمار شاهد (ب) ( بار ۱۰۰µm)**

**Figure 4. Stomata of leaves obtained from treatments with colchicine (A) without colchicine (B) (Bar 100µm)**

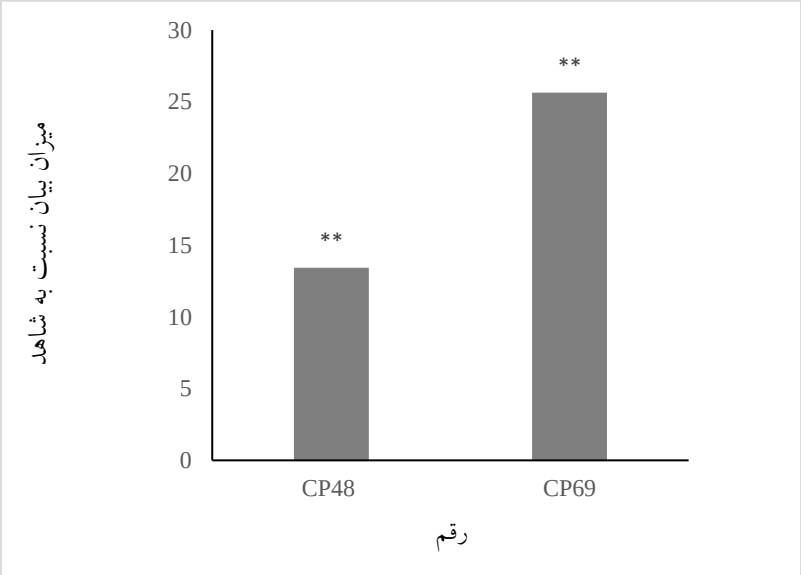
نتایج مقایسه میانگین این پژوهش نشان داد که با افزایش میزان کلشی‌سین و مدت زمان، اندازه روزنه‌ها بیشتر و در نتیجه تراکم آن‌ها کاهش می‌یابد ( شکل ۵). در پژوهش Omidbaigi et al. (2012) نیز با افزایش سطح پلوئیدی، طول و عرض روزنه‌ها افزایش و در نتیجه تراکم روزنه‌ها در واحد سطح برگ کاهش یافت.




**شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل کلشی‌سین و زمان بر تعداد روزنه گیاهچه‌های دو رقم CP٤٨ و CP٦٩ استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪**

**Figure 5. Comparison of mean interaction of colchicine and time on number of seedling stomata of CP48 and CP69 cultivars using Duncan test at 1% probability level**

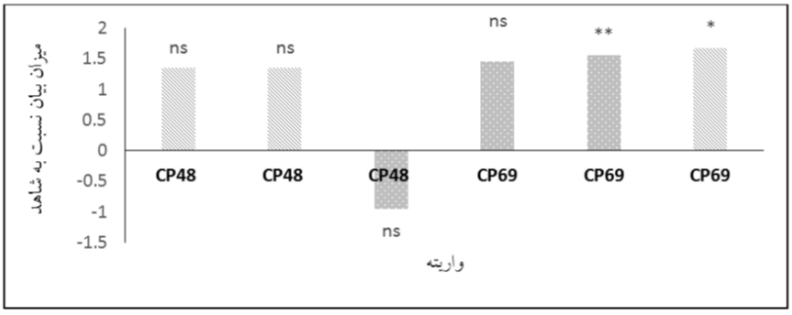
**انجام واکنش Real-Time PCR و آنالیز داده‌ها:** نتایج حاصل از بررسی بیان ژن کاتالاز در اثر اعمال تیمار شوری در دو رقم CP۴۸ و CP۶۹ افزایش بیان را نشان داد. این افزایش بیان در رقم CP۶۹ معنی‌دار و افزایش ۲۵/۶۳۷ برابری نسبت به شاهد و در رقم CP۴۸ معنی‌دار و افزایش ۱۳/۴۲۱ برابری نسبت به شاهد را نشان داد (شکل ۶).




**شکل ٦. تغییر میزان بیان نسبی ژن کاتالاز تحت تنش شوری در برگ دو رقم CP٤٨ و CP٦٩ نیشکر، شاهد شرایط بدون تنش شوری، ** (معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱)**

**Figure 6. Relative expression of *CAT* in salinity stress condition in leave of sugarcane CP48 and CP69, Normal condition is as a control, ** shows that results are significant at the 0.01 level)**

سطح رونوشت ژن کاتالاز پس از اعمال تیمار شوری به همراه دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم کلشی‌سین در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در رقم CP۶۹ نیز مورد بررسی قرار گرفت. در هر سه سطح تیماری (۱۰۰ $mg^{-1}$ کلشی‌سین به مدت ۲۴ ساعت و $mg^{-1}$ ۲۰۰ کلشی‌سین به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت) افزایش بیان مشاهده گردید که این افزایش بیان در تیمار شوری با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم کلشی‌سین در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار غیرمعنی‌دار بود. در تیمار شوری به همراه ۲۰۰ میلی‌گرم کلشی‌سین در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار معنی‌دار در سطح ۱ درصد و در تیمار شوری با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم کلش‌سین در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد را نشان داد. احتمالاً دلیل این افزایش بیان، افزایش تعداد نسخه‌های ژن در اثر افزایش محتوی ژنتیکی بوده است (شکل ۷). بررسی سطح بیان ژن کاتالاز در نتیجه اعمال تیمار شوری با سه غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم کلشی‌سین در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در رقم CP۴۸ افزایش غیرمعنی‌دار را در هر دو سطح تیماری ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم و کاهش غیرمعنی‌دار را در سطح تیماری ۴۰۰ میلی‌گرم در این رقم نشان داد.




**شکل۷. تاثیر زمان و غلظت کلشی‌سین بر میزان رونویسی نسبی ژن کاتالاز. *، ** و ns بترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی‌داری را نشان می‌دهند**

**Figure 7. Effect of time and colchicine concentration on *CAT*2 relative expression. * and ** show that results are significant at the 0.01 and 0.05 levels respectively**

در تحقیق Pagariya et al. (2011)، ۱۳۷ cDNA کاندید متحمل به شوری (با ۲۰ درصد ژن‌های جدید) شناسایی شد، از جمله افزایش بیان کاتالاز (CAT)، سوپراکساید دیسموتاز (SOD) و اسکوربات پراکسیداز (APX) تحت تنش شوری در نیشکر رقم Co 62175 (تحت ۱ تا ۳ درصد شوری برای ۳۰ روز) را گزارش دادند. در مقابل فعالیت APX و CAT در رقم Co 86032 تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار به مدت ۳۰ روز کاهش پیدا کرد ( Patade et al. 2011). در پژوهشی Poonsawat et al. (2015) افزایش بیان ژن کاتالاز در رقم K88-92 تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار، در مدت زمان‌های ۳ و ۷ روز را گزارش دادند. با این حالت گزارش‌های متضاد در مورد بیان ژن کاتالاز و فعالیت آن وجود دارد. برای مثال در توتون، فعالیت و بیان این ژن تحت تنش شوری (۱۵۰ میلی‌مولار نمک برای ۵ روز) به ویژه در بافت‌های ریشه افزایش یافت (Savoure et al., 1999). در پژوهشی تأثیر تنش شوری در سطح ۱۵۰ میلی مولار بر میزان بیان ژن کاتالاز در گیاه نعناع قمی که دارای ترکیبات آنتی اکسیدانتی فراوانی می‌باشد با استفاده از تکنیک Real- Time PCR مورد بررسی قرارگرفت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که میزان بیان ژن کاتالاز تحت شرایط تنش شوری نسبت به شاهد (بدون تیمار) ۱۷۹ ٪ افزایش داشته و از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (Zamharir et al., 2014).

**نتیجه‌گیری:** نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد غلظت مناسب از کلشی‌سین به عنوان یک محرک با افزایش بیان ژن کاتالاز در گیاهان نیشکر تحت تنش شوری می‌تواند سبب افزایش تحمل گیاهان به تنش شود. این دست‌یابی می‌تواند برای شناخت بیشتر ساز و کارهای مقاومت گیاهان به تنش‌ها و در نتیجه مقاومت، کشت و رشد بهتر گیاهان تحت تنش‌های محیطی حائز اهمیت باشد.

**سپاسگزاری:** از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانیmRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۴- ۱۶۹.

محمدآبادی محمدرضا، اسدالله پور نعنایی حجت (۱۴۰۰) بیان ژن لپتین در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۳(۱)، ۱۹۷-۲۱۴.

اسلامی عاطفه، پورمحمدی پیام، الهی فرد الهام (۱۳۹۹) تأثیر تنظیم کننده‌های رشد و اتیل متان سولفونات (EMS) بر تولید درون شیشه ای نیشکر مقاوم به علف کش گلایفوسیت. پژوهش‌نامه اصلاح گیاهان زراعی ۱۲ (۳۴)، ۱۷۵-۱۸۴.

## References

Adams KL, Wendel JF (2005) Novel patterns of gene expression in polyploidy plants. Trends Genet 10, 539-43.

Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. BMC Plant Biol 4(14), 1-7.

Chen LL, Gao ShL (2007) In vitro Tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus memberanaceus*. Sci Hort 112, 339-344.

Dehghan E, Hakkinen S, Oksman-Caldentey M, et al. (2012) Production of tropane alkaloids in diploid and tetraploid plants and in vitro hairy root cultures of Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult 110, 35-44.

Dhooghe E, Van Laere K., Eeckhaut T, et al. (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. Plant Cell Tiss Organ Cult 104(3), 359-373.

El-Naby A, Zeinab M, Nabila A, et al. (2012) Colchicine induction of polyploidy in Egyptian clover genotypes. J Am Sci 8(10), 221-227

Eslami A, Mohammadi PP and Elahifard E (2020). Effects of Plant Growth Regulators and Ethyl Methanesulfonate (EMS) on In Vitro Production of Glyphosate Herbicide Resistant Sugarcane. J Crop Breed 12(34), 175-184 (In Persian).

Gu XF, Yang AF, Meng H, et al. (2005) *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. Cv. Zhanhua. Plant Cell Rep 24,671-676.

Hamill S, Smith M, Dodd W (1992) In vitro induction of *Banana autotetraploids* by colchicine treatment of micropropagated diploids. Aust J Bot 40, 887–89.

Lakshmanan P, Geijskes RJ, Aitken KS, et al. (2005) Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. In Vitro Cell Dev Biol Plant 41(4), 345-363.

Liu S, Chen S, Chen Y, et al. (2011) In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel shows an improved level of abiotic stress tolerance. Sci Hort 127, 411-419.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$method. Methods 25, 402–408.

Mensah BO, Akomeah PA, Ikhajiagbe B, et al. (2007) The effects of sodium azide and colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.). Afr J Biotechnol 6 (5), 534-538.

Mohammadabadi M. (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12 (4), 167-181 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Asadollahpour Nanaei H. (2021) Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 13 (1), 197-214 (In Persian).

Mohammadi PP, Moieni A, Ebrahimi A, Javidfar F. (2011) Doubled haploid plants following colchicine treatment of microspore-derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult 108, 251-256.

Mohammadi PP, Moieni A, Hiraga S, Komatsu S. (2012) Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. J Proteomics 75, 1906–1923.

Moore PH (1995) Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. Funct Plant Biol 22(4), 661-679.

Ochatt SJ, Patat-Ochatt EM, Moessner A (2011). Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. Plant Cell Tiss Organ Cult 104(3), 329-341.

Omidbaigi R, Mirzaee M, Hassani ME, et al. (2012) Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. Int J Plant Prod 4(2), 87-98.

Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, et al. (2014) A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. Biomol Detect Quantif 1(1), 23–33.

Pagariya, M. C., Harikrishnan, M., Kulkarni, P. A., et al. (2011). Physio-biochemical analysis and transcript profiling of *Saccharum officinarum* L. submitted to salt stress. Acta Physiol Plant, *33*(4), 1411-1424.

Patade VY, Bhargava S, Suprasanna P (2011) Salt and drought tolerance of sugarcane under isoosmotic salt and water stress: growth, osmolytes accumulation, and antioxidant defense. J P Interac 6(4), 275-282.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucl Acids Res, 30

Poonsawat W, Theerawitaya C, Suwan T, et al. (2015) Regulation of some salt defense-related genes in relation to physiological and biochemical changes in three sugarcane genotypes subjected to salt stress. Protoplasma 252(1), 231-43

Zamharir AR, Ahmadi J, Asghari B, et al. (2014) Expression analysis of Catalase gene in spearmint (*Mentha spicata*) plants under salinity stress. 1st international congress and 13th Iranian genetics congress, Tehran, Iran.

Savoure A, Thorin D, Davey M, et al. (1999) NaCl and CuSO4 treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. PlantCell Envir 22, 387–396

Thao NTP, Ureshino K, Miyajima I, et al. (2003) Induction of tetraploids in ornamental Alocasia through colchicine and oryzalin treatments. Plant cell tiss and organ cult 72(1), 19-25.

Zhang XY, Hu CG, Yao JL (2010) Tetraploidization of diploid Dioscorea results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. J plant physiol 167(2), 88-94.