

بررسی ریزازدیادی چغندر قند و تولید ریز گیاهچه‌های فتواتوتروفیک

Study on sugar beet micropropagation and production of photoautotrophic micro plants

نسرین یآوری^۱، سید یعقوب صادقیان^۱، محمود مصباح^۱ و عبدالرسول غفاری جهرمی^۲

ن. یآوری، س. ی. صادقیان، م. مصباح و ع. ر. غفاری جهرمی. ۱۳۸۴. بررسی ریزازدیادی چغندر قند و تولید ریز گیاهچه‌های فتواتوتروفیک.

چغندر قند ۲۱(۲): ۱۷۸-۱۶۵

چکیده

چغندر قند یک گیاه ترجیحاً دگرگشن و در بسیاری موارد خود نابارور است که با ازدیاد غیرجنسی یا رویشی آن، می‌توان بوته‌های مشابه بوته اولیه تولید نمود. ریزازدیادی کلونی چغندر قند با استفاده از بافت مریستمی ساقه گل‌دهنده جوان انجام می‌گیرد. ریز نمونه‌های مریستمی از ساقه گل‌دهنده بوته‌های نرعی چغندر قند تهیه و در شرایط استریل کشت گردید. دو محیط کشت پایه PGoB حاوی ترکیب هورمونی IBA, NAA و BA به ترتیب در مقادیر ۰/۱، ۰/۱ و یک میلی‌گرم/لیتر و ترکیب هورمونی GA3, NAA, BA به ترتیب در مقادیر ۱، ۱ و ۰/۱ میلی‌گرم/لیتر از نظر ازدیاد ریز جوانه در سه ژنوتیپ شماره ۴۶۳، ۴۴۵ و ۴۲۸ پس از مدت ۲۰، ۳۰ و ۱۰ روز از آغاز کشت و در پایان چرخه ازدیاد در مرحله جداسازی برای انتقال به محیط ریشه‌زایی مورد مقایسه قرار گرفت. آزمایش در هشت تکرار هر یک شامل یک ظرف کشت در طرح بلوک‌های کامل تصادفی در یک آزمایش اسپلیت-فاکتوریل انجام گردید. زمان کورت‌های اصلی و ترکیب ژنوتیپ و محیط در کورت‌های فرعی منظور شد. میانگین تیمارها به صورت فاکتوریل دو عاملی در زمان، با روش دانکن مقایسه گردید. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که کلیه فاکتورها (زمان، محیط و ژنوتیپ) دارای اثر معنی‌دار هستند. دو ژنوتیپ برتر (۴۴۵ و ۴۲۸) از نظر تولید ریز جوانه در یک گروه قرار گرفتند. محیط دو نسبت به محیط یک با تولید ریز جوانه بیشتر، برتر بود و این امر نمایانگر نقش ترکیب هورمونی در محیط کشت ازدیاد ریز جوانه‌ها می‌باشد. در اجرای این پژوهش طراحی و ساخت یک دستگاه آب کشت مجهز به سیستم هوارسانی انجام شد و ریز گیاهچه‌های چغندر قند در شرایط ایجاد شده در سیستم آب کشت توانایی رشد فتواتوتروفیک را باز یافتند.

واژه‌های کلیدی: آب کشت، تطبیق پذیری، چغندر قند، ریزازدیاد کلونی

۱- اعضاء هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندر قند

۲- کارشناس ارشد بخش آمار و کامپیوتر- مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

مقدمه

چغندرقد یک گیاه ترجیحاً دگرگشن و در بسیاری موارد خود نابارور است. ازدیاد یک بوته انتخاب شده برای مطالعه ترکیب پذیری و نیز تولید بذور آزمایشی از طریق ازدیاد جنسی ممکن نیست، اما با ازدیاد غیرجنسی یا رویشی آن، می توان بوته های مشابه بوته اولیه تولید نمود و به این ترتیب، قدرت تشخیص و انتخاب ژنوتیپها را برای صفات مورد نظر در آزمایش های گوناگون در برنامه های بهنژادی ارقام جدید افزایش بخشید (یاوری و صادقیان ۱۳۷۵).

ریزازدیادی چغندرقد با استفاده از بافت مریستمی ساقه گل دهنده جوان انجام می گیرد. نخستین مسئله زنده نگه داشتن ریزنمونه گیاه است و برای دستیابی به این امر، از یک سو جلوگیری از بروز آلودگی و نیز کنترل ترشح مواد فنلی از محل برش ریزنمونه اهمیت بسیار دارد و از سوی دیگر، جهت دادن به روند رشد و نمو ریزنمونه به صورت هدفمند امر اساسی دیگر در این روش است (Thorpe 1981).

موفقیت در اجرای کشت و پیشرفت آن مستلزم رفع کامل آلودگی های خارجی و کنترل های بعدی از نظر وجود آلودگی های آوندی در مراحل ازدیاد بافت می باشد. بیشتر عوامل آلودگی را می توان با اجرای ضد عفونی ریزنمونه گیاهی از میان برد. علاوه بر این، کنترل اولیه و به موقع ظروف کشت و حذف ظروف حاوی بافت آلوده ضروری است. استفاده از آنتی بیوتیک ها رایج می باشد (Leifert and Cassells 2001). در بسیاری موارد، در

صورت وجود آلودگی های نهفته، این عوامل در مراحل ازدیاد بافت استقرار یافته بروز می نمایند و منشاء آلودگی های گسترده در آزمایشگاه می گردند. از سوی دیگر، آلوده شدن بافت استریل و استقرار یافته در مراحل بعدی کشت می تواند ناشی از عوامل آلودگی در حین کار به ویژه قارچ های پوستی باشد. برخی از باسیل های مقاوم به الکل، حرارت شعله و اتوکلاو نیز می توانند موجب آلودگی در جریان کار شوند.

رایج ترین عوامل آلودگی های آزمایشگاه های تولید گیاهان به روش کشت درون شیشه ای، عبارتند از: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* هم چنین *Acinetobacta*, *Bacillus*, *Corynbacterium*, *Enterobacta*, *Erwinia*, *Pseudomonas* در تمام جهان در آزمایشگاه های طبی و گیاهی وجود دارند (Boxus 1995).

یکی از مهم ترین عوامل تعیین کننده موفقیت کشت بافت گیاهی پس از استقرار بافت در شرایط کشت استریل، انتخاب صحیح محیط غذایی است. محلول غذایی شامل اجزای اصلی و اختیاری است. مواد غذایی اصلی نمک های معدنی، منبع انرژی یا کربن، ویتامین ها و مواد تنظیم کننده رشد گیاهی را شامل می شود. اما استفاده از مواد آلی مانند انواع قندهای لاکتوز، گالاکتوز و یا عصاره های گیاهی اختیاری است. نمک های معدنی متناسب با یون های مورد نیاز گیاه انتخاب و ترکیب می گردند. عناصر پر مصرف در غلظت میلی مولار (mM) شامل نیتروژن، پتاسیم، فسفر، کلسیم، گوگرد، منیزیم و عناصر کم مصرف اما مهم در غلظت میکرو مول (μM)

Jacobs 1979) حاوی هورمون‌های اکسین (IBA)، سیتوکینین (BA) و ژبیرلین (GA3) به ترتیب در مقادیر ۰/۱، ۱ و ۱ میلی گرم در لیتر، ۳ درصد قند و ۰/۸ درصد آگار و ازدیاد ریز جوانه‌های رویشی در محیط پایه، حاوی اکسین‌های IBA، NAA و سیتوکینین BA به ترتیب به مقادیر ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میلی گرم در لیتر قابل اجرا می باشد (مصباح ۱۳۷۰؛ Coumains et al. 1982).

پژوهشگران اروپایی، در بررسی‌های انجام شده در چارچوب همکاری مشترک خود در دهه ۹۰ میلادی، شناسایی دقیق نیازهای هورمونی رشد بافت گیاهی را در شرایط رشد درون شیشه به دلایل متعدد از جمله تولید هورمون‌های طبیعی در داخل بافت ریزنمونه، دینامیک هورمون‌های هم گروه، دینامیک هورمون‌های گروه‌های متفاوت و موانع جذب هورمون‌های گیاهی افزوده شده قابل توجه می‌دانند. نتایج این بررسی‌ها بر اهمیت تنظیم ترکیب هورمونی در روند رشد بافت گیاهی در روش‌های ازدیاد رویشی، انتخاب نوع هورمون‌ها و مدت تیمارهای هورمونی در مراحل القاء، ازدیاد، ریشه‌زایی و یا جنین‌زایی رویشی تاکید دارد (Reuther 2000).

مرحله نهایی ریزازدیادی گیاهان به روش کشت «درون شیشه‌ای» شامل خارج کردن ریز گیاهچه‌ها از محیط کشت و تطبیق با شرایط رشد فعال در محیط خارج از شیشه می‌باشد. معمولاً برای تطبیق‌پذیری در شرایط محیطی جدید باید گیاهان ریزازدیاد شده را به تدریج با شرایط رشد در محیط گلخانه‌ای آماده ساخت. هزینه مرحله تطبیق‌پذیری به تنهایی حدود ۷۵-۳۵ درصد از هزینه کل ریزازدیادی گیاهان برآورد می‌گردد

شامل آهن، منگنز، روی، بر، کوبالت و مولیبدن می باشند. برای ازدیاد رویشی، منبع انرژی کربن معمولاً در غلظت ۲ تا ۳ درصد در محیط غذایی گنجانده می‌شود. کمپلکس ویتامین‌های B و ویتامین C معمولاً بیشتر در محیط‌های کشت به کار می‌روند. انتخاب یک محیط غذایی برای کشت بافت یک گیاه ویژه با استفاده از الگوهای غذایی آزمون شده آغاز می‌شود و بر طبق نیازهایی که مشاهده می‌گردد تغییرات کمی و کیفی در آن انجام تا با شرایط رشد آن گیاه تطبیق داده شود (یاوری و مصباح ۱۳۶۸).

بر اساس یک اصل کلی پذیرفته شده می‌توان با انتخاب نسبت هورمون‌های گیاهی، روند رشد و نمو ریزنمونه را تعیین نمود (Murashige and Skoog 1962). اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و ژبیرلین‌ها به عنوان مهم‌ترین گروه‌های هورمونی، معرفی شده‌اند (Boxus 1995). توازن ترکیب هورمونی مورد استفاده باید بر اساس نتایج تحقیقات پیشین و نیز مشاهدات دقیق در حین اجرای ریزازدیادی، شناسایی و بهترین ترکیب تعیین شود.

ترکیب‌های هورمونی استفاده شده در محیط ازدیاد رویشی چغندر قند شامل سیتوکینین و اسید ژبیرلیک (Atanassov 1980)، سیتوکینین، اکسین و اسید ژبیرلیک (Coumains et al. 1982)، سیتوکینین به تنهایی و سیتوکینین و اکسین پس از تیمار آنتی اکسین (Saunders 1982; Tsai and Saundres 1995) می‌باشند.

القاء ریز جوانه‌های رویشی در اثر ترکیب عوامل رشد در محیط کشت پایه PGoB (De Greef and

ج- استقرار بافت ریزنمونه در شرایط کشت درون

شیشه‌ای و القاء رشد رویشی

قطعه ریزنمونه ضد عفونی شده در محیط کشت اول ریز ازدیادی با پایه PGoB، حاوی ۳ درصد قند، ۰/۸ درصد آگار و هورمون‌های BA/IBA/GA3 به ترتیب در مقادیر ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم/لیتر کشت گردید به طوری که محل برش داخل محیط غذایی قرار گرفت. ظرف‌های کشت در شرایط اطاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی قرارداد شد.

د- آزمایش ترکیب‌های هورمونی محیط کشت

تکثیر

این آزمایش شامل بررسی اثر دو محیط کشت، بر ازدیاد کلون‌های سه ژنوتیپ چغندر قند در زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از آغاز کشت و در زمان جداسازی ریزجوانه‌ها برای انتقال به مرحله ریشه‌زایی بود. آزمایش در هشت تکرار به اجرا درآمد. هر تکرار شامل یک جوانه از کلون ازدیاد شده به عنوان واحد آزمایش بود.

محیط ۱: PGoB حاوی هورمون‌های BA, IBA,

NAA به ترتیب در مقادیر ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم/لیتر.

محیط ۲: PGoB حاوی هورمون‌های BA, NAA,

GA3 به ترتیب در مقادیر ۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم/لیتر.

ه- محاسبه‌های آماری

ریزجوانه کلونی سه ژنوتیپ نرعیتم ۴۲۸، ۴۴۵

و ۴۶۳ در هشت تکرار در طرح بلوک‌های کامل تصادفی

در قالب آزمایش اسپلیت-فاکتوریل مورد بررسی قرار

گرفت. یادداشت‌برداری تعداد ریزجوانه‌های رویشی ازدیاد

(Boxus 1995). استفاده از مواد بازدارنده رشد برای

تقویت و استحکام بافت گیاه در این مرحله، نتایج مؤثری

همراه داشته است (Smith et al. 1990).

در این مقاله نتایج بررسی انجام شده برای بالا

بردن کارایی روش ریزازدیادی در آزمایشگاه از طریق

کنترل آلودگی‌ها، شناسایی و تنظیم عوامل محرک رشد

ازدیادی و تطبیق‌پذیری ریزگیاهچه‌ها برای رشد خارج از

شیشه، به عنوان عوامل دستیابی به افزایش تولید

ریزگیاهچه کلونی، ارائه می‌گردد.

مواد و روش‌ها

الف- مواد گیاهی

در این بررسی از رگه‌های نرعیتم سیتوپلاسمی به

شماره‌های IR ۴۶۳، IR ۴۴۵ و IR ۴۲۸ استفاده شد.

ب- نمونه‌برداری و آماده نمودن بافت گیاهی برای

کشت استریل

بافت ساقه گل‌دهنده با استفاده از تیمار زیر آماده

کشت استریل گردید: جداسازی انتهای ساقه گل در اندازه

۲-۳ سانتی‌متر، شستشو با محلول Detergent، آب‌کشی

کامل با آب معمولی، شستشو با الکل ۹۶ درجه به مدت

۲۰ ثانیه، شستشو با محلول هیپوکلریت ۱/۵ درصد و

آب‌کشی با آب مقطر استریل سه بار هر بار سه دقیقه، جدا

نمودن قطعه انتهایی ریزنمونه به طول ۵ میلی‌متر برای

کشت اولیه و شستشو با محلول آب اکسیژنه ۳ درصد

(dip) در زمان انتقال به محیط جدید.

شد. در این مرحله، دو محیط کشت جامد با ترکیب پایه PGoB، حاوی هورمون‌های رشد متفاوت از نظر تولید ریزجوانه جانبی در زمان دوره ازدیاد مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که اثر کلیه فاکتورها (زمان، محیط و ژنوتیپ) معنی‌دار است (جدول ۱).

اثر متقابل فاکتورهای مورد آزمایش

از نظر گروه‌بندی میانگین‌ها، ژنوتیپ‌های ۴۴۵ و ۴۲۸ از نظر میزان تولید ریزجوانه رویشی تفاوت معنی‌دار ندارند و در یک گروه قرار می‌گیرند و ژنوتیپ ۴۶۳ در گروه دوم قرار می‌گیرد (جدول ۲). تولید ریزجوانه‌ها مشخصاً یک روند فزاینده را در مدت کشت دنبال نمود و تولید ریزجوانه‌ها در سه زمان کشت به ترتیب در سه گروه مشاهده شد (جدول ۳).

اثر متقابل زمان رشد و ژنوتیپ

در زمان اول شمارش ریزجوانه‌ها (۱۰ روز پس از کشت)، به ترتیب ژنوتیپ ۴۴۵ در گروه اول و ژنوتیپ‌های ۴۲۸ و ۴۶۳ در گروه بعد قرار می‌گیرند. در زمان دوم شمارش ریزجوانه‌ها (۲۰ روز پس از کشت) ژنوتیپ ۴۲۸ در گروه اول، ژنوتیپ ۴۴۵ در گروه بعد و ژنوتیپ ۴۶۳ با فاصله زیاد در گروه سوم قرار گرفته است. در زمان سوم شمارش ریزجوانه‌ها (۳۰ روز پس از کشت) فاصله گروه اول متمایزتر و ژنوتیپ ۴۲۸ در گروه اول و دو ژنوتیپ دیگر در گروه‌های بعد قرار گرفتند (جدول ۲).

شده در سه زمان: ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت ریزجوانه اولیه و نیز در زمان جداسازی تک ریزجوانه‌ها جهت القاء ریشه‌زایی انجام گرفت. زمان کورت‌های اصلی و ترکیب ژنوتیپ و محیط در کورت‌های فرعی منظور شد. میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت.

و- افزایش مقاومت تطبیق‌پذیری ریز گیاهچه‌ها

محلول ۰/۲ درصد پاکلوبوترازول (Mepiquat) برای تیمار برگ‌های ریز گیاهچه‌های کامل در مرحله انتقال به گلدان استفاده گردید

ز- تطبیق‌پذیری در دستگاه آب کشت

ریز گیاهچه‌های کامل از ظروف کشت حاوی محیط ریشه‌زایی خارج و به مدت یک هفته با آب معمولی و سپس در هفته دوم با محلول ۱/۴ غلظت هوگلند در یک دستگاه آب کشت مجهز به هوارسانی تغذیه شدند.

نتایج و بحث

اجرای چرخه ریز ازدیادی با کشت ریز نمونه‌های ساقه از بوته‌های نر عقیم چغندر قند در مرحله اولیه رشد ساقه گل انجام گرفت. باتوجه به عدم پاسخگویی مطلوب بافت به استریلیزاسیون با محلول هیپوکلریت، استفاده از محلول آب اکسیژنه ۳ درصد برای استریلیزاسیون مواد گیاهی در زمان انتقال به محیط جدید، مورد توجه قرار گرفت. هسته‌های کلونی سپس در مرحله ازدیاد قرار داده

اثر محیط و ژنوتیپ

عبارتی، بیشترین تعداد ریزجوانه در ژنوتیپ‌های ۴۲۸ و ۴۴۵ در محیط کشت دوم مشاهده می‌گردد، در حالی که تعداد ریزجوانه‌های این دو ژنوتیپ در محیط کشت اول با تولید ریزجوانه ژنوتیپ ۴۶۳ (ژنوتیپ ضعیف) در محیط کشت دوم (محیط کشت محرک‌تر) نزدیک به یکدیگر و پایین‌تر می‌باشد.

جدول ۲ نشان می‌دهد که تولید ریزجوانه در ژنوتیپ‌های (۴۲۸ و ۴۴۵) در محیط دوم بالاترین میزان و در یک گروه قرار گرفته و تولید ریزجوانه در محیط یک در سه ژنوتیپ و نیز تولید ریزجوانه در ژنوتیپ ۴۶۳ در محیط دوم، پایین‌تر و نزدیک به یکدیگر است. به

جدول ۱ تجزیه واریانس تیمارهای آزمایش تعداد ریزجوانه ازدیاد شده در سه زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت
Table 1 ANOVA results for mean of no. of shoots in different media and genotypes at 10, 20 and 30 days after culture

منبع تغییرات Source	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square
تکرار Replication	7	0.135
زمان Time	2	0.845 **
خطا Error (a)	14	0.037
محیط Medium	1	4.425 **
محیط X زمان Time x Medium	2	0.471 *
ژنوتیپ Genotype	2	4.098 **
زمان × ژنوتیپ Time * Genotype	4	0.921 **
محیط × ژنوتیپ Medium * Genotype	2	0.554 *
محیط × ژنوتیپ × زمان Time * Medium * Genotype	4	0.409 *
خطا Error (b)	105	0.148
CV	16.20 % *	

* ** و ***: Significant at $p < 5\%$ and 1% respectively

* و ** : به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

اثر متقابل محیط کشت، ژنوتیپ و زمان

داشتند. در محیط رشد دوم، ژنوتیپ ۴۴۵ برتری دارد. ژنوتیپ‌های ۴۴۵ و ۴۲۸ در فاصله زمان ۲۰ روز پس از کشت در محیط دوم در یک گروه قرار گرفته است. بالاترین میزان ازدیاد ریزجوانه در زمان ۳۰ روز پس از کشت در محیط دوم و در ژنوتیپ ۴۲۸ مشاهده شده

گروه‌بندی تیمارهای حاصل از ترکیب سه فاکتور مورد بررسی نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های ۴۴۵ و ۴۲۸ در فاصله زمان ۱۰ روز پس از کشت، در هر دو محیط، در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند، در حالی که این دو در محیط رشد با ترکیب هورمونی اول در یک گروه قرار

است. در این زمان از دوره کشت، دو ژنوتیپ دیگر در گروه‌های بعدی دیده می‌شوند (جدول ۲).

پیش از این، در بررسی ازدیاد ریزجوانه‌های رگه‌های‌های تتراپلوئید گرده‌افشان که در محیط ازدیاد اول این آزمایش انجام گرفت، پاسخگویی ژنوتیپ‌های چغندر قند برای تولید ریزجوانه با تفاوت معنی‌دار همراه شده بود (Yavari and Sadeghian 1997).

از نتایج فوق چنین بر می‌آید که تأثیر ترکیب هورمونی محیط کشت بر ژنوتیپ‌های چغندر قند دارای پاسخ ویژه در زمان یا مرحله از دوره کشت ازدیاد می‌باشد. در این بررسی، دو ژنوتیپ برتر (۴۴۵ و ۴۲۸) از نظر تولید ریزجوانه در یک گروه قرار گرفتند و در محیط ۲ نسبت به

محیط ۱ به شرایط رشد پاسخ بهتری نشان دادند. این امر نمایانگر نقش با اهمیت‌تر ترکیب هورمونی در محیط کشت ازدیاد ریزجوانه‌ها می‌باشد.

تولید ریزجوانه‌های قابل انتقال برای ریشه‌زایی

نتایج بررسی آماری در خصوص اثر دو ترکیب هورمونی بر روی روند تولید تک جوانه‌های قابل جداسازی برای ریشه‌زایی و انتقال به گل‌دان برای سه ژنوتیپ نشان می‌دهد که تفاوت دو محیط کشت و سه ژنوتیپ از نظر تولید ریزجوانه قابل جداسازی، معنی‌دار می‌باشد ولی اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ معنی‌دار نبود (جدول ۳).

جدول ۲ اثر تیمارهای آزمایش ترکیب هورمون های رشد بر تعداد ریز جوانه در سه زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت
Table 2 The effects of growth regulators on no. of micro-shoots at 10-20-30 days after culture

تیمارها Treatments	میانگین تعداد ریز جوانه ها Mean No. microshoots	ژنوتیپ G genotype	محیط Media	زمان (روز) Days of Culture
culture period زمان کشت	2.243 c			10
	2.379 b			20
	2.508 a			30
media محیط کشت ازدیاد	2.201 b		1	
	2.552 a		2	
genotypes ژنوتیپ	2.603 a	428		
	2.479 a	445		
	2.047 b	463		
اثر متقابل زمان کشت و محیط کشت media * culture period	2.182 b		1	10
	2.304 b		2	10
	2.143 b		1	20
	2.616 a		2	20
	2.279 b		1	30
	2.737 a		2	30
اثر متقابل زمان کشت و ژنوتیپ genotype * culture period	2.208 de	428		10
	2.328 cd	445		10
	2.191 de	463		10
	2.692 ab	428		20
	2.549 bc	445		20
	1.896 f	463		20
	2.909 a	428		30
	2.561 bc	445		30
	2.053 ef	463		30
اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ Media * genotype	2.487 b	428	1	
	2.180 c	445	1	
	1.937 d	463	1	
	2.720 a	428	2	
	2.779 a	445	2	
	2.157 cd	463	2	
اثر متقابل زمان کشت و محیط کشت و ژنوتیپ Media * culture period * genotype	2.099 d-f	428	1	10
	2.042 d-f	445	1	10
	2.405 cd	463	1	10
	2.317 c-e	428	2	10
	2.616 a-c	445	2	10
	1.978 e-f	463	2	10
	2.539 bc	428	1	20
	2.238 cde	445	1	20
	1.653 g	463	1	20
	2.846 ab	428	2	20
	2.860 ab	445	2	20
	2.139 de	463	2	20
	2.821 ab	428	1	30
	2.262 c-e	445	1	30
	1.753 fg	463	1	30
	2.997 a	428	2	30
	2.860 ab	445	2	30
	2.353 c-e	463	2	30

جدول ۳ نتایج تجزیه واریانس میانگین تعداد ریزجوانه ازدیاد شده در محیط‌های کشت و ژنوتیپ‌ها در زمان انتقال برای ریشه‌زایی

Table 3 ANOVA results for mean of no. of shoot at root induction phase in different media, and genotypes

منبع تغییرات Source	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square
تکرار Replication	7	0.225
محیط Medium	1	0.809 *
ژنوتیپ Genotype	2	2.742 ***
محیط X ژنوتیپ Medium x Genotype	2	0.097 ns
خطا Error	35	4.640
CV	14.68% *	

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد
*، **: Significant at $p < 5\%$ and 1% respectively

در عین حال، با توجه به پاسخ مشابه ژنوتیپ‌های ۴۲۸ و ۴۴۵ در تولید ریزجوانه‌های قابل جداسازی در مرحله نهایی چرخه ازدیاد و به طور کلی، تولید بیشتر ریزجوانه در محیط ۲ نسبت به محیط ۱، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که اثر ترکیب هورمونی در محیط ۲ در افزایش تکثیر ریزجوانه‌های رویشی چغندر قند برتر می‌باشد. برای افزایش سودمندی این محیط ازدیاد در مرحله ریشه‌زایی، تغییر در سطح هورمون اکسین و یا استفاده از یک مرحله کشت برای تکمیل رشد ریزجوانه‌ها پیش‌بینی می‌گردد.

ژنوتیپ‌های ۴۲۸ و ۴۴۵ نسبت به ۴۶۳، با ریزجوانه‌های قابل جداسازی بیشتر در یک گروه قرار گرفته‌اند. هم‌چنین، اثر متقابل ژنوتیپ و محیط در این مرحله برای ژنوتیپ‌های ۴۲۸ و ۴۴۵ مشابه بود در حالی که ژنوتیپ ۴۶۳ در گروه دوم قرار گرفت (جدول ۴). مشاهدات انجام شده نشان داد که تراکم بیشتر تولید ریزجوانه در محیط ۲ (شکل ۲) نسبت به محیط ۱ (شکل ۱) موجب شده است تا در مرحله انتقال برای ریشه‌زایی، تعدادی از ریزجوانه‌های کوچک‌تر قابل جداسازی نباشند و از این رو، تفاوت معنی‌دار در میانگین ریزجوانه‌های انتقال یافته از محیط کشت آزمایش دیده نشود.

جدول ۴ اثر تیمارهای آزمایش ترکیب هورمون‌های رشد بر تعداد ریزجوانه جداسازی شده برای ریشه‌زایی
Table 4 The effects of growth regulators on no. of propagated shoots at root induction

میانگین تعداد ریزجوانه Mean no. of shoots	ژنوتیپ Genotype	محیط Media	تیمارها Treatments
			محیط‌های کشت (media)
2.350 b		1	
2.610 a		2	
			ژنوتیپ‌ها (genotype)
2.652 a	428		
2.781 a	445		
2.008 b	463		

میانگین‌های با حرف مشابه در یک گروه قرار دارند.

Means followed by different letters differ significantly at $p < 0.05$

فراهم نمودن شرایط رشد فتواتوتروفیک

محیط، در مرحله رشد گلدانی ضایعات زیادی به ریزگیاه‌چه‌ها تولید وارد می‌گردد. به منظور رفع این معضل، فعال نمودن رشد فتواتوتروفیک ریزگیاهچه‌ها و افزایش مقاومت آن‌ها در برابر تنش رطوبتی مورد بررسی قرار گرفت.

بهره‌برداری از سیستم‌های گوناگون کشت بدون خاک (هایدروپونیک) مورد بررسی قرار گرفت که با در نظر گرفتن کلیه عوامل و امکانات، یک دستگاه آب کشت مجهز به سیستم هوارسانی طراحی و ساخته شد (شکل ۳). در شرایط دستگاه آب کشت، ریزگیاهچه‌ها به مدت یک هفته با آب معمولی و سپس در هفته دوم با محلول ۱/۴ غلظت هوگلند تغذیه شدند. ریزگیاهچه‌ها در این سیستم به واسطه تأمین آب برای تولید ریشه‌های جدید، نور، رطوبت نسبی کافی و یکنواخت، توانایی رشد

اجرای کشت در شرایط درون شیشه‌های (*in vitro*) بافت گیاه، به منظور تسریع روند ازدیاد ریزجوانه‌های رویشی سالم، یکنواخت و به تعداد زیاد انجام می‌گیرد. بافت گیاهی ازدیاد شده در شرایط فوق، نمک‌های معدنی، قند و هورمون‌های گیاهی را از محیط غذایی جذب و به مصرف تولید بافت جدید می‌رساند. در آخرین مرحله از چرخه ریزازدیادی، ریزگیاهچه‌های کامل (ریشه‌دار) تولید می‌شود در حالی که این ریزگیاهچه‌ها پس از خروج از شیشه، توانایی رشد در شرایط طبیعی را دارا نمی‌باشند (شکل ۳).

در اثر ویژگی‌های این ریزگیاهچه‌ها از جمله ظریف و نازک بودن لایه کوتیکول، باز بودن روزنه‌ها در برگ‌ها و نیز پایین بودن رطوبت نسبی (۳۵٪) در شرایط محیطی موجود و بروز نوسان در شرایط نوری و دمایی

«فتواتوتروفیک» را، بدون هیچگونه ضایعات گیاهی، باز یافتند (شکل‌های ۵و۴).

امکان استفاده از ماده بازدارنده رشد پاکلوبوترازول (۲/۰٪) برای نخستین بار در ایران به منظور افزایش مقاومت ریز گیاهچه‌های تولید شده در شرایط درون شیشه، در زمان جا به جایی در گلدان انجام گرفت. برگ ریز گیاهچه‌های تیمار شده، ۲۴ ساعت پس از تیمار به رنگ سبز تیره، با طراوت و دارای قامت کاملاً ایستاده مشاهده شد.

پیش از این، موفقیت در استفاده از آب برای انتقال موقت ریز گیاهچه‌ها گزارش شده است (احسانی مقدم، ۱۳۷۷). سیستم بررسی شده در این پروژه، با تأمین امکانات آب‌رسانی و تغذیه کودی هم‌زمان تأمین پارامترهای رشد فتواتوتروفیک برای تولید ریز گیاهچه در

سطح وسیع دارای امتیاز می باشد. نتایج بررسی‌های به عمل آمده در اجرای این طرح، نشان داد که با فراهم آمدن امکانات و تجهیزات مناسب، تولید نیمه صنعتی گیاهان به روش ریزازدیادی قابل حصول است. این نتایج برای نخستین بار و در ایران در چارچوب اجرای پروژه ملی شماره ۱۳۴۲ مصوب شورای پژوهش‌های علمی کشور به دست آمده است.

در اجرای این طرح، یافته‌های زیر برای نخستین بار در ایران به دست آمد: ۱) دستیابی به ترکیب هورمونی جدید برای ازدیاد درون شیشه‌ای چغندرقد، ۲) طراحی و ساخت دستگاه آب‌کشت و به کارگیری آن در برنامه ریزازدیاد کلونی گیاهان در ایران و ۳) فراهم نمودن پارامترهای فتواتوتروفیسم مؤثر در تطبیق‌پذیری ریز گیاهچه‌های چغندرقد.



شکل ۱ ازدیاد ریز جوانه در محیط A

Fig. 1 Shoot multiplication in medium A

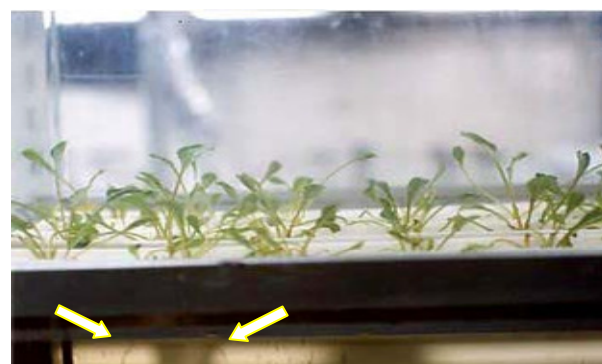
شکل ۲ ازدیاد ریز جوانه در محیط PII

Fig. 2 Shoot multiplication in medium PII



شکل ۳ ریشه‌زایی طبیعی ریز گیاهچه‌ها در سیستم " آب کشت "

Fig. 3 Rooting in "water culture" device



شکل ۴ انتقال گیاهچه‌های فتواتوتروفیک به گلدان، بدون ضایعات

Fig. 4 Autophototrophic micro plants transferred into pots



شکل ۵ استقرار کلون‌های چغندر قند در شرایط گلخانه

Fig. 5 Established sugar beet clones in greenhouse



منابع مورد استفاده:**References:**

- احسانی مقدم، ب. ۱۳۷۷. استفاده از آب در انتقال گیاهان چغندر قند از شرایط *in vitro* به خاک. گزارش کوتاه، مجله چغندر قند. جلد ۱۴: ۱۱۵.
- مصباح، م. ۱۳۷۰. بررسی مناسبترین روش ازدیاد غیر جنسی *in vitro* ژنوتیپ‌های مختلف چغندر قند (جنس *Beta*)، پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران.
- یاوری ن. و م. مصباح. ۱۳۶۸. معرفی تکنیک کشت بافت گیاهی *in vitro* و ازدیاد کلونی ژنوتیپ‌های برگزیده چغندر قند. مؤسسه تحقیقات چغندر قند. کرج. ۲۰ صفحه.
- یاوری، ن. و س. ی. صادقیان. ۱۳۷۵. کاربرد فنون کشت « درون شیشه » در بهنژادی چغندر قند، مؤسسه تحقیقات چغندر قند. کرج.
- Atanassov AI (1980) Method for continuous bud formation in tissue cultures of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Z. Pflanzenzuchtg.84: 23-29
- Boxus P(1995) Multiplication végétative; micropropagation, embryogénèse somatique. In: BV93 Biotechnologies Végétales. Institut de Rennes- France.pp: 5-116
- Coumans M, Coumans-Gillès MF, Menard D, Kevers C, Ceulemans E (1982) Micropropagation of sugarbeet: Possible ways. Proc. 5th Intl.Cong. Plant Tissue and Cell Culture- Tokyo, Japan. pp: 689-690
- De Greef W, Jacobs M (1979) *In vitro* culture of sugarbeet; Description of a cell line with high regeneration capacity. Plant Sci. Lett.17:55-61
- Leifert C, Casselles AC (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol.37:133-138
- Murashige T, Skoog F(1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473- 497

- Reuther G (2000) Development of integrated systems for large scale propagation of elite plants using *in vitro* techniques. European Commission Cost- Action 822: Report of the Activities 1994-1999. Geisenheim, Germany
- Saunders JW (1982) Regeneration of REL-1 and REL-2 sugar beet germplasms for tissue culture genetic manipulations. *Crop Sci.* 38: 901- 902
- Smith EF, Roberts AV, Mottley J (1990) The preparation *in vitro* of chryanthemum for transplantation to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 133-140
- Thorpe TA (1981) *Plant Tissue Culture : Methods and Applications in Agriculture.* Academic Press, New York p: 45-113
- Tsai CJ, Saundres JW (1995) Somatic embryo from callus of sugarbeet biotechnology clone REL-1. *Journal of Sugarbeet Research*, Vol.32 NO.4: 215-228
- Yavari N, Sadeghian SY (1997) Evaluation of response to micropropagation in four sugar beet tetraploid populations. Abstract of papers, 60th IIRB congress 30th June – 4th July – Cambridge. England. p 110