بررسی ریزازدیادی چغندرقند و تولید ریزگیاهچه‌های فتواتوتروفیک
Study on sugar beet micropropagation and production of photoautotrophic micro plants

نسرین یاوری[1]، سید یعقوب صادقیان[1]، محمود مصباح[1] و عبدالرسول غفاری جهرمی[2]

ن. یاوری، س.ی. صادقیان، م. مصباح و ع.ر. غفاری جهرمی . ۱۳۸٤. بررسی ریزازدیادی چغندرقند و تولید ریزگیاهچه‌های فتواتوتروفیک. **چغندرقند ۲۱(۲): ۱۷۸-۱٦٥**

چکیده

چغندرقند 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 چغندرقند با استفاده از بافت مریستمی ساقه گل‌دهنده جوان انجام می‌گیرد. ریز نمونه‌های مریستمی از ساقه گل‌دهنده بوته‌های نرعقیم چغندرقند 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 NAA, GA3 و BA به ترتیب در مقادیر ۱، ۰/۱ و ۰/۵میلی‌گرم/ لیتر از نظر ازدیاد ریزجوانه در سه ژنوتیپ شماره ٤٦٣، ٤٤٥ و ٤٢٨ پس از مدت۲۰،۳۰ و ۱۰ روز از آغاز کشت و در پایان چرخه ازدیاد در مرحله جداسازی برای انتقال به محیط ریشه‌زایی مورد مقایسه قرارگرفت. آزمایش در هشت تکرار هر یک شامل یک ظرف کشت در طرح بلوک‌های کامل تصادفی در یک آزمایش اسپلیت- فاکتوریل انجام گردید. زمان کرت‌های اصلی و ترکیب ژنوتیپ و محیط در کرت‌های 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(٤٤٥ و ٤٢٨) از نظر تولید ریزجوانه در یک گروه قرارگرفتند. محیط دو نسبت به محیط یک با تولید ریزجوانه بیشتر، برتر بود و این امر نمایانگر نقش ترکیب هورمونی در محیط کشت ازدیاد ریزجوانه‌ها می‌باشد. در اجرای این پژوهش طراحی و ساخت یک دستگاه آب کشت مجهز به سیستم هوارسانی انجام شد و ریزگیاهچه‌های چغندرقند در شرایط ایجاد شده در سیستم آب کشت توانایی رشد فتواتوتروفیک را باز یافتند.

واژه‌های کلیدی: آب کشت، تطبیق پذیری، چغندرقند، ریزازدیادکلونی

---

۱ – اعضاء هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندرقند

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

مقدمه

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

ریزازدیادی چغندرقند با استفاده از بافت مریستمی ساقه گل‌دهنده جوان انجام می‌گیرد. نخستین مسئله زنده نگه‌داشتن 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 آلودگی‌های خارجی و کنترل‌های بعدی از نظر وجود آلودگی‌های آوندی در مراحل ازدیاد بافت می‌باشد. بیشتر عوامل آلودگی را می‌توان با اجرای ضدعفونی ریزنمونه گیاهی ازمیان برد. علاوه بر این، کنترل اولیه و به موقع ظروف کشت و حذف ظروف حاوی بافت آلوده ضروری است. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها رایج می‌باشد (Leifert and Cassells 2001). در بسیاری موارد، در صورت وجود آلودگی‌های نهفته، این عوامل در مراحل ازدیاد بافت استقرار یافته بروز می‌نمایند و منشاء آلودگی‌های گسترده در آزمایشگاه می‌گردند. از سوی دیگر، آلوده شدن بافت استریل و استقرار یافته در مراحل بعدی کشت می‌تواند ناشی از عوامل آلودگی در حین کار به ویژه قارچ‌های پوستی باشد. برخی از باسیل‌های مقاوم به الکل، حرارت شعله و اتوکلاو نیز می‌توانند موجب آلودگی در جریان کار شوند.

رایج‌ترین عوامل آلودگی‌های آزمایشگاه‌های تولید گیاهان به روش کشت درون شیشه‌ای، عبارتند از: *Staphylococcus, Micrococcus, Lactobacillus*. هم چنین *Acinetobacta, Bacillus, Corynbacterium, Enterobacta, Erwinia, Pseudomonas* در تمام جهان در آزمایشگاه‌های طبی و گیاهی وجود دارند (Boxus 1995).

یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده 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 نمک‌های معدنی، منبع انرژی یا کربن، ویتامین‌ها و مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی را شامل می‌شود. اما استفاده از مواد آلی مانند انواع قندهای لاکتوز، گالاکتوز و یا عصاره‌های گیاهی اختیاری است. نمک‌های معدنی متناسب با یون‌های مورد نیاز گیاه انتخاب و ترکیب می‌گردند. 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)

شامل آهن، منگنز، روی، بر، کوبالت و مولبیدن می باشند. برای ازدیاد رویشی، منبع انرژی کربن معمولاًدر غلظت ۲ تا ۳ درصد در محیط غذایی گنجانده می‌شود. کمپلکس ویتامین‌های B و ویتامین C معمولاًبیشتر 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).

براساس یک اصل کلی پذیرفته شده می‌توان با انتخاب نسبت هورمون‌های گیاهی، روند رشد و نمو ریزنمونه را تعیین نمود (Murashige and Skoog1962). اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و ژیبرلین‌ها به عنوان مهم‌ترین گروه‌های هورمونی، معرفی شده‌اند (Boxus 1995). توازن ترکیب هورمونی مورد استفاده باید براساس 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 چغندرقند شامل سیتوکینین و اسید ژیبرلیک (Atanassov 1980) ، سیتوکینین، اکسین و اسید ژیبرلیک(Coumains et al. 1982) ، سیتوکینین به تنهایی و سیتوکینین و اکسین پس از تیمار آنتی اکسین (Saunders 1982; Tsai and Saundres 1995) می‌باشند.

القاء ریزجوانه‌های رویشی در اثر ترکیب عوامل رشد در محیط کشت پایه PGoB(De Greef and Jacobs 1979) حاوی هورمون‌های اکسین (IBA)، سیتوکینین (BA) و ژیبرلین (GA3) به ترتیب در مقادیر ۰/۱، ۱ و ۱ میلی گرم در لیتر، ۳ درصدقند و ۰/۸ درصد آگار و ازدیاد ریزجوانه‌های رویشی در محیط پایه، حاوی اکسین‌های IBA، NAA و سیتوکینین BA به ترتیب به مقادیر ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم 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، ازدیا د، 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

(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 ازطریق 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 نرعقیم 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 ۳-۲ 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 انتهای ریزنمونه به طول ۵ میلی‌متر برای کشت اولیه و شستشو با محلول آب اکسیژنه ۳ درصد (dip) در زمان انتقال به محیط جدید.

ج- استقرار بافت ریزنمونه در شرایط کشت درون شیشه‌ای و القاء رشد رویشی

قطعه ریزنمونه ضدعفونی شده در محیط کشت اول ریز ازدیادی با پایه PGoB، حاوی۳ درصد قند، ۰/۸ درصد آگار و هورمون‌های BA/IBA/GA3 به ترتیب در مقادیر۰/۱ ، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم/ لیترکشت گردید به طوری که محل برش داخل محیط غذایی قرارگرفت. ظرف‌های کشت در شرایط اطاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی قرارداده شد.

د- آزمایش ترکیب‌های هورمونی محیط کشت تکثیر

این آزمایش شامل بررسی اثر دو محیط کشت، بر ازدیاد کلون‌های سه ژنوتیپ چغندرقند 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 و۱ میلی‌گرم/لیتر.

محیط۲: PGoB حاوی هورمون‌های BA, NAA, GA3 به ترتیب در مقادیر۱، ۰/۱و ۰/۵ میلی‌گرم/لیتر.

ه- محاسبه‌های آماری

ریزجوانه کلونی سه ژنوتیپ نرعقیم ۴۲۸, ۴۴۵ و۴۶۳ در هشت تکرار در طرح بلوک‌های کامل تصادفی در قالب آزمایش اسپلیت- فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفت. یادداشت‌برداری تعداد ریزجوانه‌های رویشی ازدیاد

شـده در سـه زمـان: ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پـس از کشـت ریزجوانه اولیه و نیز در زمـان جداسـازی تـک ریزجوانـه‌ها جهت القاء ریشه‌زایی انجام گرفت. زمان کرت‌های اصـلی و ترکیب ژنوتیپ و محیط در کرت‌های فرعی منظور شـد. میانگین داده‌ها توسط آزمـون دانکـن مـورد مقایسـه قـرار گرفت.

و- افزایش مقاومت تطبیق‌پذیری ریزگیاهچه‌ها

محلـول۰/۲ درصـد پـاکلوبوترازول (Mepiquat paclobutrazol) برای تیمـار بـرگ‌های ریزگیاهچـه‌های کامل در مرحله انتقال به گلدان استفاده گردید

ز- تطبیق‌پذیری در دستگاه آب کشت

ریزگیاهچـه‌های کامـل از ظـروف کشـت حـاوی محیط ریشه‌زایـی خـارج و بـه مـدت یـک هفتـه بـا آب معمـولی و سـپس در هفتـه دوم بـا محلـول ۱/۴ غلظـت هوگلند در یک دستگاه آب کشـت مجهـز بـه هوارسـانی تغذیه شدند.

نتایج و بحث

اجرای چرخه ریز ازدیادی با کشـت ریزنمونـه‌های ساقه از بوته‌های نرعقیم چغندرقنـد در مرحلـه اولیـه رشـد ساقه گل انجام گرفت. باتوجه به عدم پاسخگویی مطلـوب بافت به استریلیزاسیون با محلول هیپوکلریـت، اسـتفاده از محلول آب اکسیژنه ۳ درصـد بـرای استریلیزاسـیون مـواد گیاهی در زمان انتقال به محیط جدیـد، مـورد توجـه قـرار گرفت. هسته‌های کلونی سپس در مرحله ازدیـاد قـرار داده شد. در این مرحله، دو محیط کشت جامد بـا ترکیـب پایـه PGoB، حاوی هورمون‌های رشـد متفـاوت از نظـر تولیـد ریزجوانه جانبی در زمان دوره ازدیـاد مـورد مقایسـه قـرار گرفت. نتایج تجزیه آمـاری داده‌ها نشـان داد کـه اثرکلیـه فاکتورها (زمان، محیط و ژنوتیپ) معنی‌دار اسـت (جـدول ۱).

اثر متقابل فاکتورهای مورد آزمایش

از نظر گروه‌بندی میانگین‌ها، ژنوتیـپ‌هـای ۴۴۵ و ۴۲۸ از نظـر میـزان تولیـد ریزجوانـه رویشـی تفـاوت معنی‌دار ندارند و در یک گروه قرار مـی‌گیرنـد و ژنوتیـپ ۴۶۳ در گروه دوم قرار می‌گیرد(جدول۲). تولید ریزجوانه‌ها مشخصاً یک روند فزاینده را در مدت کشت دنبال نمـود و تولید ریزجوانه‌ها در سه زمان کشت به ترتیب در سه گروه مشاهده شد (جدول ۳).

اثرمتقابل زمان رشد و ژنوتیپ

در زمان اول شمارش ریزجوانه‌هـا (۱۰ روز پـس‌از کشت)، به ترتیب ژنوتیپ ۴۴۵ در گروه اول و ژنوتیپ‌های ۴۲۸ و ۴۶۳ در گروه بعد قـرار مـی گیرنـد. در زمـان دوم شمارش ریزجوانه‌ها (۲۰ روز پس‌از کشـت) ژنوتیـپ ۴۲۸ در گروه اول، ژنوتیپ ۴۴۵ در گروه بعد و ژنوتیپ ۴۶۳ بـا فاصله زیاد در گروه سوم قرار گرفته است. در زمـان سـوم شمارش ریزجوانه‌ها (۳۰ روز پس‌از کشـت) فاصـله گـروه اول متمـایزتر و ژنوتیـپ ۴۲۸ در گـروه اول و دو ژنوتیـپ دیگردرگروه‌های بعد قرار گرفتند (جدول ۲).

اثر محیط و ژنوتیپ

جدول ۲ نشان می‌دهد که تولید ریزجوانه در ژنوتیپ‌های (۴۴۵ و ۴۲۸) 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 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 ۱ تجزیه واریانس تیمارهای آزمایش تعداد ریزجوانه ازدیاد شده در سه زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس ازکشت
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 **
محیطX 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 ** : به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و۱ درصد *,**: Significant at p<5% and 1% respectively

اثر متقابل محیط کشت، ژنوتیپ و زمان

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، درگروه‌های متفاوت قرار گرفتند، در حالی که این دو در محیط رشد با ترکیب هورمونی اول در یک گروه قرار 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

است. در این زمـان از دوره کشـت، دو ژنوتیـپ دیگـر در گروه‌های بعدی دیده می‌شوند(جدول۲).

پـیش از ایـن، در بررسـی ازدیـاد ریزجوانـه‌هـای رگه‌های‌های تتراپلوییدگرده‌افشـان کـه در محـیط ازدیـاد اول این آزمایش انجام گرفـت، پاسـخگویی ژنوتیـپ‌هـای چغندرقند برای تولید ریزجوانه بـا تفـاوت معنـی‌دار همـراه شده بود (Yavari and Sadeghian 1997).

از نتایج فوق چنین بر می‌آیـد کـه تـأثیر ترکیـب هورمونی محیط کشت بـر ژنوتیـپ‌هـای چغندرقنـد 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 قرارگرفتند و درمحیط ۲ نسـبت بـه محیط ۱ به شرایط رشد پاسخ بهتری نشان دادند. این امـر نمایانگر نقش با اهمیـت‌تـر ترکیـب هورمـونی در محـیط کشت ازدیاد ریزجوانه‌ها می باشد.

تولید ریزجوانه‌های قابل انتقال برای ریشه‌زایی

نتایج بررسی آمـاری در خصـوص اثـر دو ترکیـب هورمـونی بـر روی رونـد تولیـد تـک جوانـه‌هـای قابـل جداسازی برای ریشه‌زایی و انتقـال بـه گلـدان بـرای سـه ژنوتیپ نشان می‌دهد که تفاوت دو محـیط کشـت و سـه ژنوتیپ از نظر تولید ریزجوانـه قابـل جداسـازی، معنـی‌دار می‌باشد ولی اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیـپ معنـی‌دار نبود (جدول ۳).

جدول ۲ اثر تیمارهای آزمایش ترکیب هورمون های رشد بر تعداد ریزجوانه در سه زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت
Table2 The effects of growth regulators on no. of micro-shoots at 10-20-30 days after culture

تیمار ها Treatments	میانگین تعداد ریزجوانه ها Mean No.microshoots	ژنوتیپ G enotype	محیط Media	زمان(روز) Days of Culture
زمان کشت culture period	2.243 c			10
	2.379 b			20
	2.508 a			30
محیط کشت ازدیاد media	2.201 b		1	
	2.552 a		2	
ژنوتیپ genotypes	2.603 a	428		
	2.479 a	445		
	2.047 b	463		
اثرمتقابل 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
اثرمتقابل 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
اثرمتقابل 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	
اثرمتقابل 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

جدول۳ 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 ***
محیطXژنوتیپ	Medium x Genotype	2	0.097 ns
خطا	Error	35	4.640
CV		14.68% *	

* و ** : به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و۱درصد Significant at p<5% and 1% respectively: *, **

ژنوتیپ‌های ۴۲۸ و ۴۴۵ نسبت به ۴۶۳، با ریزجوانه‌های قابل جداسازی بیشتر در یک گروه قرار گرفته‌اند. هم چنین، اثرمتقابل ژنوتیپ و محیط در این مرحله برای ژنوتیپ‌های ۴۲۸ و۴۴۵ 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 محیط۲ (شکل۲) 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.

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 چغندرقند 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.

جدول ٤ 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

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

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

اجرای کشت در شرایط درون شیشه‌ای (*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، ریز گیاهچه‌های 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 محیط، در مرحله رشد گلدانی ضایعات زیادی به ریزگیاه‌چه‌هاتولید 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(شکل۳).

در شرایط دستگاه آب کشت، ریز گیاهچه‌ها 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

«فتواتوتروفیک» را، بدون هیچگونه ضایعات گیاهی، بازیافتند(شکل‌های ۴و۵).

امکان استفاده از ماده بازدارنده رشد پاکلوبوترازول (۰/۲٪) 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 ریزگیاهچه‌ها 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 ریزگیاهچه 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 ۱۲۴۲ مصوب شورای پژوهش‌های علمی کشور به دست آمده است.

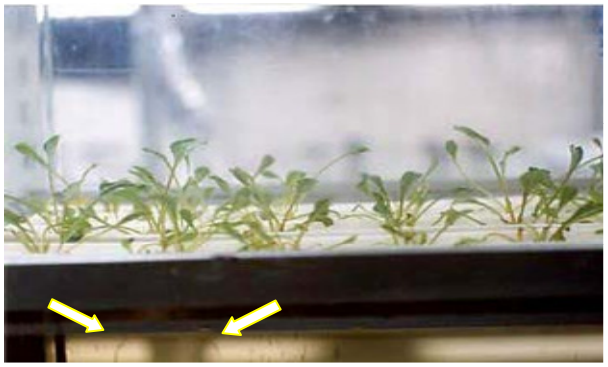
در اجرای این طرح، یافته‌های زیر برای نخستین بار در ایران به دست آمد: ۱) دستیابی به ترکیب هورمونی جدید برای ازدیاد درون شیشه‌ای چغندرقند، ۲) طراحی و ساخت دستگاه آب‌کشت و به کارگیری آن در برنامه ریزازدیاد کلونی گیاهان در ایران و ۳) فراهم نمودن پارامترهای فتو اتوتروفیسم مؤثر در تطبیق‌پذیری ریزگیاهچه‌های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

شکل۱ ازدیاد ریزجوانه در محیط A

Fig. 1 Shoot multiplication in medium A

شکل ۲ ازدیاد ریزجوانه در محیط PII

Fig. 2 Shoot multiplication in medium PII



شکل ۳ ریشه‌زایی طبیعی ریزگیاهچه‌ها در سیستم " آب کشت"

Fig. 3 Rooting in "water culture" device

شکل ٤ انتقال گیاهچه‌های فتواتوتروفیک به گلدان، بدون ضایعات

Fig. 4 Autophototrophic micro plants transferred into pots

شکل ٥ استقرار کلون‌های چغندرقند 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 چغندرقند از شرایط *in vitro* به خاک. گزارش کوتاه، مجله چغندرقند. جلد۱۴ :۱۱۵.

مصباح، م. ۱۳۷۰. بررسی مناسبترین روش ازدیاد غیر جنسی *in vitro* ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند (جنس *Beta*)، پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران.

یاوری ن. و م. مصباح. ۱۳۶۸. معرفی تکنیک کشت بافت گیاهی *in vitro* و ازدیاد کلونی ژنوتیپ‌های برگزیده چغندرقند. مؤسسه تحقیقات چغندرقند. کرج. ۲۰ صفحه.

یاوری، ن. و س. ی. صادقیان. ۱۳۷۵. کاربرد فنون کشت « درون شیشه» در بهنژادی چغندرقند، موسسه تحقیقات چغندرقند. 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 Rènnes- France.pp: 5-116

Coumains 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 Commision 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 biotechology 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, 60^{th} IIRB congress 30^{th} June – 4^{th} July – Cambridge. England. p 110