

## هیبریدهای بین گونه‌ای در چغندر قند (جنس *Beta*) با استفاده از روش نجات جنین

### Inter-specific hybrids in Beta genus using embryo rescue technique

فرانک روزبه<sup>۱</sup>، سید یعقوب صادقیان<sup>۱</sup>، نسرین یآوری<sup>۱</sup> و محمود مصباح<sup>۱</sup>

ف. روزبه، س.ی. صادقیان، ن. یآوری و م. مصباح. ۱۳۸۴. هیبریدهای بین گونه‌ای در چغندر قند (جنس *Beta*) با استفاده از روش نجات جنین. چغندر قند ۲۱(۱): ۳۰-۱۵

#### چکیده

تلاقی بین گونه‌ای یا بین جنسی در چغندر قند معمولاً به علت عدم لقاح، مرگ جنین یا قطع ارتباط آندوسپرم با جنین موفقیت‌آمیز نبوده است. در این موارد، تکنیک نجات جنین مفید بوده و جنین‌های هیبرید قبل از نابود شدن در شرایط درون شیشه‌ای کشت و نگهداری می‌شود. دستیابی به تلاقی بین گونه‌ای چغندر قند با گونه‌های وحشی به دلیل عدم تشابه کروموزومی با روش‌های متداول به‌نژادی میسر نیست. در این بررسی، برای تهیه هیبریدهای بین گونه‌ای، تلاقی یک توده تتراپلوئید 37RT به عنوان والد مادری با دو گونه وحشی *Beta procumbens* و *Beta webbiana* به عنوان والد پدری به صورت دستی انجام شد. پس از مطالعه روند رشد جنین توسط محلول یک درصد تترازولیوم کلراید، جنین‌های هیبرید ۲۰ روزه در محیط غذایی N6 در سه آزمایش با ترکیبات مختلف هورمونی در شرایط آزمایشگاهی کشت و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار هفته قرار گرفتند. آزمایش سوم با ترکیب محیط N6 و هورمون‌های GA3, BA, NAA به ترتیب به میزان ۱، ۰/۲، ۰/۵ و P.V.P به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ساکارز و زغال فعال به ترتیب به میزان ۳۰ و یک گرم در لیتر و ۰/۶ درصد آگار نتیجه مطلوبی را از نظر جوانه‌زدن جنین هیبرید نشان داد. سپس جنین‌های جوانه‌زده جهت ازدیاد به محیط N6 حاوی BA و GA3 به ترتیب به میزان ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر منتقل

۱- اعضا هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندر قند- کرج

و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. نتایج نشان داد که درصد جوانه زنی و دانهال هیبرید دو نوع تلاقی *B.vulgaris*×*B.webbiana* و *B.vulgaris*×*B.procumbens* به ترتیب ۱۰ درصد و ۴۰ درصد است.

واژه های کلیدی: تلاقی بین گونه ای، چغندر قند، محیط کشت، نجات جنین  
اختصارات: GA3: اسید جیبرلیک، BA: بنزیل آمینو پورین، NAA:

آلفا نفتالین استیک اسید، P.V.P: پلی وینیل پیرولیدون

### مقدمه

مقاومت تر کردن گیاه در مقابل عوامل بیماری زا و شرایط نامناسب محیطی و در نتیجه آسیب پذیری کمتر صورت گیرد.

شناسایی منابع ژنتیکی مقاومت به آفات و بیماری ها از دیر باز در برنامه های به نژادی چغندر قند جایگاه ویژه ای داشته است. گزارش های متعددی مبنی بر وجود صفات مقاومت به سرکسپورا، نماتد چغندر قند، سفیدک حقیقی و دروغی، ویروس موزائیک چغندر قند و ویروس کرلی تپا در گونه های

سطح زیر کشت چغندر قند (*B.vulgaris* L.) در کشور بالغ بر ۱۹۲۰۰۰ هکتار است که بر اساس آمار سال ۱۳۸۱ با تولید ۵/۱۷ تن در هکتار شکر، پنجاه و یک درصد از نیاز مصرف داخلی از محل کشت چغندر قند تامین شد. (انجمن صنفی کارخانه های قند و شکر کشور ۱۳۸۲). افزایش تولید در واحد سطح میتواند به طور مستقیم از طریق بهبود پتانسیل ژنتیکی گیاه با افزایش عملکرد در واحد سطح انجام پذیرد و یا این که به طور غیرمستقیم با

می‌شود (Simmonds 1979). در جنس *Beta*، بیشترین مطالعات تلاقی دور بین گونه *B. vulgaris* و *Procumbenes* گونه‌های گروه انجام شده است. گونه‌های این گروه تنها گونه‌هایی از جنس *Beta* هستند که علاوه بر دارا بودن مقاومت به بیماری‌ها و تنش‌های متعدد، دارای مقاومت بالا نسبت به نماتد چغندر قند (*Heterodera schachtii*) نیز هستند (Savitsky 1960 and 1975; De Bock 1986; Klin et al. 1999; Van Geyt et al. 1990). تلاقی‌های موفق با گونه‌های این گروه به علت عدم تشابه کروموزومی و عدم جفت شدن کروموزم‌ها در میوز مشکل بوده و به خصوص در سطح دیپلوئیدی و در مرحله جوانه‌زنی به علت نکروزه شدن ریشه و عدم تشکیل ریشه ثانویه (Simmonds 1979; Van Geyt et al. 1990) ارتباط بین سیستم آوندی ساقه به ریشه، نتاج

خویشاوند چغندر قند وجود دارد (Savitsky 1960 and 1975; De Bock 1986; Van Geyt et al. 1990). یکی از مهم‌ترین روش‌های انتقال این صفات به گونه زراعی، تلاقی بین گونه‌های است. در حالی که در برخی از گیاهان، تلاقی بین گونه‌ای یا دورگ‌های دور تقریباً بدون مشکل تهیه می‌شوند و تلاقی بین آنها به اندازه تلاقی بین واریته‌ها ساده است، مثل کولتیوارهای گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) به راحتی با گونه *L. pimpinellifolium* تلاقی می‌یابد (Sing 1990)، اما در بسیاری از موارد، دورگ‌های F1 با سطوح متفاوتی از مشکلات مانند عدم تشکیل تخمک، عدم توسعه تخمک و عدم رشد گیاهچه‌های دورگ مواجه بوده که موجب محدود شدن رشد تلاقی‌های دور

چغندر قند تلاش زیادی انجام دادند (Johnson and Wheatley 1961; Savitsky 1960 and 1975; De Bock 1986; Bruun 1991).

تکنیک نجات جنین به عنوان روشی مفید و مطمئن جهت تولید گیاهان هیبرید از گیاهانی که در شرایط طبیعی آمیزش‌های سخت یا غیرممکن دارند، به‌کار می‌رود. در این روش، جنین هیبرید قبل از نابود شدن در شرایط آزمایشگاهی کشت و نگهداری می‌شود. گزارش‌های متعددی از کاربرد این تکنیک در تولید هیبریدهای دور در گیاهان مختلف از جمله کلم (Van Ripley and Arnison 1990)، برنج (Ram et al. 2004)، گندم (Kumlehn et al. 1997)، دلفینیوم (*Delphinium*) (Honda and Tsutsui 1997)، خیار (Chen et al. 1997)، سوسن (Shanchi 2002) و سیکلمه (Ishizaka and Uemetsu 1995) وجود دارد. هیبریداسیون بین

حاصل از بین می‌رود (Van Ripley and Arnison 1990). نسل  $F_1$  قادر به تشکیل ریشه نبوده و آن‌هایی که زنده باقی می‌مانند عقیم هستند. استفاده از گونه‌های حدواسط و یا پیوند زدن گیاه‌چه‌های هیبرید بر روی چغندر یک‌ساله از جمله روش‌هایی بوده‌اند که برای رفع این مشکل مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Savitsky 1960 and 1975; Van Geyt et al. 1990).

هر چند مطالعات زیادی در زمینه مشکلات موجود در تهیه هیبریدهای چغندر قند و زنده ماندن آن‌ها پس از مرحله دانه‌ال، در چند دهه اخیر صورت گرفته است؛ اما پیشرفت‌های زیادی به دست نیامد. گرچه در این زمینه محققین زیادی جهت دستیابی به هیبریدهای زنده و زایای بین گونه‌ای به ویژه نتاج حاصل از گونه‌های وحشی و

بروز می‌یابد. در این نوع تلاقی، جنین تشکیل می‌شود اما رشد آن به دلیل عدم تشکیل ریشه متوقف می‌شود (Savitsky 1975; Savitsky 1960). تلاقی بین *B. webbiana* و *B. vulgaris* به منظور انتقال ژن مقاومت به نماتد (*H. schachtii*) به گونه‌های زراعی توسط یوهانسن و ویتلی (Wheatley and Yohanson 1961) انجام گرفت. گیاهچه‌های F1 به عنوان پیوندک روی چغندر قند ریشه دار به عنوان پایه پیوند زده شد و از این طریق، تقریباً تعداد زیادی از گیاهان F1 زنده ماندند، اما پس از آزمون نسل چهارم تلاقی برگشتی (BC4) برای مقاومت به نماتد هیچگونه مقاومتی مشاهده نشد (De Bock 1986).

بـالـاخره مطالعات گسترده‌ای جهت انتقال ژن مقاومت به نماتد از گروه *Procumbentes* به چغندر قند

جنسی ارقام تجارتي توت فرنگی و هیبریداسیون بین گونه‌ای در کیوی با استفاه از نجات جنین میسر شده است (Sharma et al. 1996). مقاومت به ویروس پیچیدگی برگ سیبزمینی (RLRV) با موفقیت از *Solanum tuberosum* به *S. tuberosum* از طریق نجات جنین انتقال داده شد (Sharma et al. 1996). نجات جنین در تولید هیبریدهای بین گونه‌ای غلات نیز به کار رفته است (Kumlehn et al. 1997). *Oriza minuta* (برنج وحشی) یک رقم تراپلوئید با مقاومت به آفات و بیماری‌هایی چون بلاست و بلایت باکتریایی است. مقاومت به این بیماری‌ها از گونه وحشی به برنج زراعی با روش نجات جنین منتقل شده است.

مشکل تلاقی بین چغندر قند و گونه‌های وحشی گروه *Procumbentes* به‌طور عمده در مراحل بعد از تشکیل جنین

(2n+1) با هدف انتقال ژن مقاومت به نماتد به دست آمد (Savitsky 1975). هم‌چنین براون (Bruun 1991) مطالعات ساختاری روی تخمدان‌های حاصل از تلاقی‌های داخل و بین گونه‌ای چغندر انجام داد، وی نشان داد که آندوسپرم در شرایط آزمایشگاهی خیلی سریع‌تر نسبت به شرایط طبیعی رشد کرده و توسعه می‌یابد. به علاوه، وی با بررسی‌های آناتومیکی جنین‌های هیبرید، تجزیه‌ی سوسپانسون (suspensor) را عامل احتمالی عدم ریشه‌دهی قلمداد کرد. تلاقی‌های دور حاوی ژن‌های مفید، می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی چغندر قند مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین در این مطالعه امکان کاربرد تکنیک نجات جنین در تلاقی‌های دور گونه‌های زراعی با گونه‌های *B.*

توسط ساویتسکی در سال ۱۹۶۰ شروع شد (Savitsky 1960). در این بررسی، از تلاقی گیاهان دیپلوئید *B. vulgaris* با *B. webbiana* و *B. procumbens*، هیبریدهای دیپلوئید و از تلاقی *B. vulgaris* تراپلوئید با *B. patellaris* تراپلوئید، هیبرید تراپلوئید تولید شد. در تمام گیاهان F1، خواص چغندر وحشی غالب بود. پرچم‌ها در هیبریدهای دیپلوئید خیلی کوچک و تقریباً خالی بود. هیبریدهای تراپلوئید حدود ۱۵ الی ۱۰۰ بذر تولید کردند (Savitsky 1975; YU 1984; Van Geyt et al. 1990). ساویتسکی (۱۹۷۵) اولین کسی بود که با استفاده از چغندر زراعی تراپلوئید به هیبریدهای زنده و بارور دست یافت و از تلاقی این هیبریدها و چغندر زراعی دیپلوئید، گیاهانی با یک کروموزوم اضافی

گلخانه، علاوه بر نور طبیعی در هر مترمربع یک لامپ ۲۰۰ وات در ارتفاع ۸۰ سانتی متری گیاهان قرار داده شد. طول روز در گلخانه ۱۶ ساعت و دمای گلخانه در روز حدود ۲۰ تا ۲۵ درجه و در شب حدود ۱۵ درجه سانتیگراد بود. در طی این مدت، هر ۱۵ روز گیاهان با محلول هوگلند و همچنین محلولهای فسفات تغذیه شدند (یاوری، ۱۳۸۳).

گونه‌های وحشی گروه *Procumbentes* یکساله هستند و احتیاج به بهاره شدن ندارند، اما به دلیل پوسته بسیار سخت بذر، زمان جوانه‌زنی آنها بسیار طولانی است. بر این اساس، هم‌زمان با گونه زراعی، کاشت بذور وحشی نیز انجام گرفت.

**دورگ‌گیری:** پایه‌های مادری پس از ساقه‌دهی و رشد

*B. webbiana* و *procumbens* از گروه *Procumbentes* مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** در این بررسی به منظور تلاقی بین گونه‌ای، توده تتراپلوئید زراعی چغندر قند به نام 37RT به‌عنوان والد مادری و گونه‌های وحشی *Beta procumbens* و *B. webbiana* دیپلوئید به‌عنوان والد پدری انتخاب شدند. تعداد ۱۰۰ عدد بذر از گونه زراعی چغندر قند در گلدان کاشت و جهت رشد به گلخانه انتقال داده شد. گیاهچه‌های حاصل پس از ۶ تا ۸ هفته (مرحله ۸ تا ۱۰ برگ‌گی) به سردخانه (دمای ۴ تا ۷ درجه سانتیگراد) و نور دائم جهت بهاره شدن منتقل شدند. پس از ۱۰ هفته، گیاهان بهاره شده جهت گلدهی به گلخانه انتقال یافتند. در

به نوک کلاله آسیب وارد نشود، با پنس برداشته شدند. سپس جهت جلوگیری از آلودگی با گرده های ناخواسته، گل آذین اخته شده با پاکت های شفاف کاغذی پوشانده شدند. ۴ تا ۶ روز پس از اخته کردن گلها، گرده گونه های وحشی به طور مجزا جمع آوری گردیده و توسط قلم مو در روی کلاله گل های اخته شده قرار داده شد (شکل ۲) و مجدداً گل آذین مربوطه با پاکت شفاف کاغذی پوشانده شد (شکل ۳). عمل گرده دهی در ساعت ۸ تا ۱۰ صبح و با دو تکرار به فاصله دو روز پس از اولین گرده دهی انجام شد.

گل آذین برای اخته کردن گلها و دورگیری دستی آماده شد. بدین منظور، در هر گل آذین تمام گل های شکفته شده قسمت پائین ساقه، حذف شدند و تنها گل های نشکفته در قسمت میانی گل آذین جهت عقیم کردن، انتخاب شدند. چون والد مادری یک رقم مولتی ژرم بود، در هر کلاستر گل که کنار هم روی ساقه قرار داشتند، به غیر از یک گل، بقیه حذف شدند. عقیم نمودن به صورت دستی و با پنس های کوچک نوک تیز صورت گرفت (شکل ۱). بدین صورت که کاسبرگها به آرامی کنار زده شد و بساکها به طوری که





شکل ۱ عقیم سازی والد مادری

**Fig. 1** Emasculation of female parent



شکل ۲ انتقال گرده به والد مادری

**Fig. 2** Pollination of the female plant



شکل ۳ پوشاندن گل‌آذین‌های والد مادری پس از گرده‌دهی

Fig. 3 Isolation of female plants after pollination

مشخص می‌شود. همچنین با این بررسی، میزان رشد و نمو جنین نیز نشان داده می‌شود. (شکل ۵)

۲۰ تا ۲۵ روز پس از اولین گرده‌دهی، گل‌های تلقیح شده از گیاه پایه مادری جدا و پس از انتقال به آزمایشگاه، برگچه‌های اضافی حذف و ضد عفونی سطحی انجام شد. تیمار ضد عفونی شامل شستشو با آب معمولی به مدت ۲ دقیقه، قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، غوطه‌ور کردن در محلول یک درصد سدیم هیپوکلریت به مدت ۲۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل در سه نوبت بود. جنین‌ها با استفاده از استروئید میکروسکوپ در شرایط کاملاً استریل لامین ایر، توسط اسکالپل و پنس

**نجات جنین:** مشخص کردن مرحله رشد جنین از زمان تلقیح تا برداشت و تایید میزان موفقیت تلاقی بین گونه‌ای، توسط تترازولیوم کلراید صورت گرفت (Yavari 1979) برای این کار، مادگی جدا شده در محلول یک درصد تترازولیوم کلراید به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت رنگ‌آمیزی قرار گرفت. در این آزمایش، تعداد ۳۰ جنین (از هر تلاقی ۱۵ عدد) مورد آزمون قرار گرفت و هم چنین جنین‌ها در سن‌های ۷، ۱۴، ۲۰ و ۲۵ روزه پس از لقاح، جدا و به محلول تترازولیوم کلراید انتقال داده شد. قدرت حیاتی جنین با قرمز شدن در مجاورت این ماده

کوچک از درون تخم‌دان جدا شده و در محیط غذایی پایه N6 (Chu 1978) طبق جدول شماره یک در سه آزمایش کشت شدند.

### جدول ۱ ترکیب محیط‌های کشت جنین

**Table 1** Composition of embryo culture media

پارامترهای مورد آزمایش Studied parameters	آزمایش		
	اول	دوم	سوم
	Test 1	Test 2	Test 3
هورمون‌های رشد بر حسب میلی‌گرم در لیتر			
BA	-	0.2	0.2
NAA	-	0.5	0.5
GA3	-	-	1
Growth hormones mg/l			
P.V.P mg l <sup>-1</sup>	-	-	300
آگار (Agar)%	0.8	0.8	0.6
ساکارز (Sucros)%	6	6	3
زغال فعال (Active charcoal) mg l <sup>-1</sup>	1000	1000	1000

باد انجام می‌شود، اما این روش و سایر روش‌های طبیعی به دلیل عدم تشابهات کروموزومی گونه‌های دور در چغندر قند مؤثر نیست. تولید تعداد کم بذر در تلاقی بین گونه‌های چغندر زراعی و گونه‌های وحشی *Procumbentes* توسط محققین گزارش شده است (Savitsky 1960; Johnson and Wheatley 1961; Savitsky 1975; De Bock 1986) هم‌چنین در مطالعاتی که روی جوانه‌زنی بذر صورت گرفته است مشخص شده است که عدم موفقیت کامل در تلاقی بین *B. vulgaris* و گونه‌های وحشی *Procumbentes* در نتیجه عدم نفوذ لوله‌گرده به داخل خامه چغندر زراعی بوده است (Bhojwani and Razdan 1983; Bruun 1991; Brown 1996; Clark 1997).

گل‌های چغندر قند کوچک و فنجانی شکل هستند و به همین علت، عقیم‌سازی دستی آن‌ها بسیار مشکل است. هر چند که تکنیک اخته‌سازی دستی برای دورگ‌گیری کمتر مورداستفاده قرار می‌گیرد (Smith 1980)، اما به علت بالا

در تمام آزمایش‌ها، در هر پتری‌دیش (با قطر ۹ سانتی‌متر) که حاوی ۱۵ سی‌سی محیط غذایی بود تعداد ۱۰ جنین از یک نوع تلاقی کشت و تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان جوانه‌زنی (در حدود ۱۵ الی ۳۰ روز) نگهداری شدند. جنین‌های جوانه‌زده بلافاصله پس از ظهور علائم جوانه‌زنی در شرایط محیطی ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از یک هفته جنین‌های جوانه زده جهت رشد در محیط غذایی N6 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و یک میلی‌گرم در لیتر GA3 تحت شرایط نوری فوق‌الذکر قرار گرفتند. برای دستیابی به دانهال هیبرید، دانهال‌های کوچک اولیه بار دیگر در این محیط واکشت شدند.

## نتایج و بحث

علی‌رغم این‌که گرده‌افشانی طبیعی در چغندر زراعی به وسیله

دستی استفاده و بدین ترتیب درصد مطلوبی جنین هیبرید تهیه شد (شکل ۴).

بودن ضریب اطمینان در انجام تلاقی و تهیه دورگ مورد نظر از روش اخته سازی گل‌های نر و گرده افشانی



شکل ۴ گل‌های تلقیح شده در والد مادری (۱۴ روز پس از عمل گرده افشانی)

Fig. 4 Fertilized flowers (14 days after pollination)

دی اکسید کربن و نشانه زنده بودن تمام جنین‌ها بود (شکل ۵). هم چنین بین سن‌های متفاوت جنین که در این رنگ قرار داده شدند جنین ۲۰ روزه دارای ساختمان کامل دو قطبی با ساختار اولیه کوتیلدون و ریشه بود.

رنگ آمیزی با تترازولیوم کلراید، به دو منظور انجام شد: اول سنجش قدرت حیاتی جنین و دوم، بررسی روند رشد و نمو جنین. تعداد ۳۰ عدد جنین در تترازولیوم کلراید یک درصد قرار گرفتند. تمام جنین‌ها در مجاورت این ماده قرمز شدند که علت آن تنفس جنین و آزاد کردن



شکل ۵ جنین هیبرید پس از تیمار با تترازولیوم کلراید

**Fig. 5** Hybrid embryo treated with tetrazolium chloride

در کشت درون شیشه ای	بهینه جنین در شرایط
جنین، محیط پایه N6 محیط اصلی	آزمایشگاهی بررسی شد که
بود. در عین حال، تأثیر	نتایج آن در جدول شماره ۲
ترکیبات تکمیلی بر رشد	ارائه شده است.

جدول ۲ نوع تلاقی، تعداد گل‌های تلقیح شده، تعداد مادگی بارور شده، درصد باروری، تعداد جنین‌های کشت شده و درصد جنین‌های جوانه زده در سه آزمایش مختلف کشت جنین

**Table 2** Type of hybridization, number of fertilized flowering buds, number of fertilized ovules, fertilization percent, number of cultured embryos and germination percent in the three experiments

آزمایش‌ها No. experiment	نوع تلاقی Crossing type	تعداد غنچه گل‌های تلقیح شده Number of fertilized flower	تعداد مادگی بارور Number of fertilized ovule	درصد باروری Fertilization (%)	تعداد جنین‌های کشت شده Number of cultured embryos	درصد جوانه زنی Germination (%)
اول First experiment	37RT(4n) × <i>B. webbiana</i> (2n)	210	60	28	60	-
	37RT(4n) × <i>B. procumbens</i> (2n)	210	70	33	60	-
دوم Second experiment	37RT(4n) × <i>B. webbiana</i> (2n)	155	45	29	45	-
	37RT(4n) × <i>B. procumbens</i> (2n)	155	47	30	45	-
سوم Third experiment	37RT(4n) × <i>B. webbiana</i> (2n)	450	100	22	100	40
	37RT(4n) × <i>B. procumbens</i> (2n)	450	200	44	100	10

و NAA به ترتیب به مقدار ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود و سایر عوامل مشابه آزمایش اول بود. در این محیط نیز درصد بالایی از جنین‌ها بعد از سه روز قهوه‌ای شدند و در تعداد کمی نشانه‌هایی از پاسخ جنین‌های کشت شده به صورت توده‌های نامتمایز سلولی در اطراف آن به وجود آمد. این

در آزمایش اول، محیط کشت فاقد هورمون و P.V.P. بود. همچنین غلظت آگار و ساکارز در این محیط به ترتیب به میزان ۰/۸ و ۶ درصد بود. در این محیط، تمام جنین‌های کشت شده پس از ۳ الی ۴ روز قهوه‌ای شدند و درصد جوانه‌زنی صفر بود. در آزمایش دوم، محیط کشت پایه N6 حاوی هورمون‌های BA

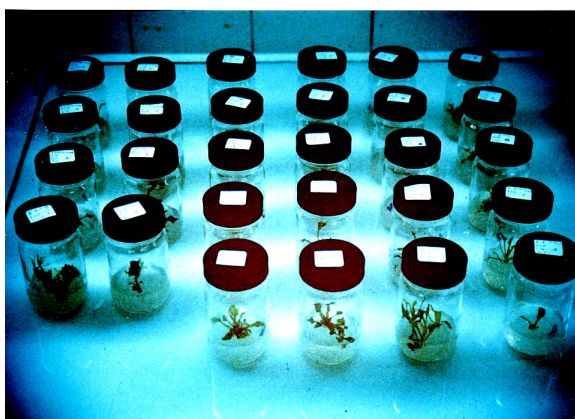
افزوده شد. همچنین P.V.P به مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیترافزوده شد. در این محیط، غلظت ساکارز به ۳ درصد و همچنین آگار به ۰/۶ درصد کاهش یافت و جوانه‌زنی مشاهده شد (شکل ۶). برای این اساس، مناسبترین ترکیب محیط کشت آزمایش سوم تعیین شد، زیرا بالاترین میزان جوانه‌زنی به دست آمد (جدول ۲).

توده‌های نامتمایز سلولی پس از چند روز، قهوه‌ای شده و از بین رفتند. عدم جوانه‌زنی در آزمایش اول به علت بازدارندگی ناشی از ترشح مواد فعلی در کشت جنین هیبرید بود که محدودیت رشد با وجود استفاده از هورمون‌ها در آزمایش دوم نیز برطرف شد. در آزمایش سوم، علاوه بر هورمون‌های BA و NAA به ترتیب به میزان ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، هورمون GA3 (غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر) نیز



شکل ۶ جوانه‌زنی جنین‌های کشت شده در شرایط درون شیشه

Fig. 6 Germination of embryos *In vitro*





## شکل ۷ دانه‌های هیبرید

Fig. 7 Hybrid seedlings

عوامل بسیاری در موفقیت کشت جنین مؤثر هستند که مهم‌ترین آن‌ها شامل ژنوتیپ، مرحله رشد جنین در زمان جداسازی، شرایط محیطی والد مادری، ترکیب‌های مختلف محیط کشت، هورمون‌ها، ساکارز، اکسیژن، دما و نور است (Kumlehn et al 1997). در این تحقیق، یکی از عوامل مؤثر بر عدم جوانه‌زنی جنین‌ها، ترشح ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن آن‌ها است. تیمارهای متفاوتی برای جذب مواد زائد از جمله ترکیبات فنلی در جلوگیری از قهوه‌ای شدن می‌روند که معمول‌ترین آن‌ها زغال فعال است (Honda and Tsutsui 1997, Bhojwani and Razdan Pierie 1987). زغال فعال در غلظت به‌کار گرفته‌شده قادر به برطرف کردن مشکل نبود و هنگامی که P.V.P که یک جاذب ترکیبات فنلی است به محیط کشت اضافه شد و میزان آگار به ۰/۶ درصد تقلیل یافت، جنین‌ها قهوه‌ای نشده و در حضور جیبرلیک اسید، جوانه‌زنی به‌طور طبیعی انجام شد.

با تیمار تترازولیوم کلراید مشخص شد که جنین‌های ۲۰ روزه بالغ هستند و

به نظر می‌رسد که کاربرد هم زمان P.V.P و کاهش غلظت آگار و همچنین اسید جیبرلیک که دارای اثرات محرک بر رشد جنین است (Honda and Tsutsui 1997; Kumlehn et al. 1997; Pierik 1987) در بهبود شرایط رشد جنین مؤثر بوده است.

مطالعات زیادی در زمینه مشکلات موجود در تهیه دورگه‌های بین گونه‌ای چغندر و زنده ماندن آن‌ها پس از مرحله دانه‌ال در چند دهه اخیر صورت گرفته است و علت عدم دستیابی به گیاه تلاقی نیز موضوع چندین تحقیق بوده است (Bruun 1991; De Bock 1986; Johnson and Wheatley 1961; Savitsky 1960).

اندرسون و لارسن (Andersen and Larsen 1990) برای بررسی عوامل فیزیولوژیکی ناتوانی در تولید ریشه، تعدادی نتاج حاصل از تلاقی چغندر زراعی و گونه وحشی *B. webbiana* با

نیازی به غلظت بالای ساکارز ندارند. ساکارز علاوه بر تامین کربن، تثبیت کننده فشار اسمزی نیز است و اهمیت ایجاد فشار اسمزی از اهمیت غذایی آن بیشتر است. جنین‌های نارس در محیط کشت نیاز به فشار اسمزی بالا دارند. آندوسپرم این جنین‌ها در حالت طبیعی دارای فشار اسمزی بالایی است (Pierik 1987). معمولاً غلظت آگار در کشت جنین بین ۰/۶ تا ۰/۸ درصد است و غلظت بیشتر، از رشد جنین جلوگیری به عمل می‌آورد و این در حالی است که در برخی موارد، استفاده از محیط کشت مایع جوانه‌زنی و رشد جنین را بهبود بخشیده است (Pierik 1987).

کاهش غلظت آگار موجب حرکت ترکیبات منفی مترشحه به سمت پائین محیط کشت شده و از تجمع آن‌ها در محل تماس جنین با محیط کشت جلوگیری به عمل می‌آید. بنابراین،

قابلیت ریشه‌زائی توضیح داده شده است.

مشکلات موجود در تهیه هیبریدهای بین‌گونه‌ای چغندر قند و عدم تولید بذر کافی در گیاهان دورگ و همچنین عدم وجود گیاهان هیبرید حاصل از تلاقی چغندر زراعی با گونه‌های وحشی گروه *Procumbentes*، اهمیت استفاده از تکنیک کشت جنین در محیط آزمایشگاه را بیان می‌دارد. با استفاده از این روش، علاوه بر صرف زمان کمتر در برنامه‌های اصلاحی، راندمان دستیابی به جنین‌های جوانه‌زده و نهایتاً دانه‌های هیبرید افزایش می‌یابد (شکل ۷). همان گونه که قبلاً نیز ذکر شد، یکی از مشکلات جوانه‌زنی بذور به علت سختی پوسته آنها است که این مانع به راحتی با کشت جنین برداشته می‌شود. علاوه بر این، طبق مطالعات انجام

استفاده از تکنیک نجات جنین تهیه کردند. شاخه‌های این دورگ‌ها که فاقد ریشه بود و شاخه‌های طبیعی ریز ازدیاد شده چغندر قند برای اندازه‌گیری و مقایسه میزان سیتوکینین داخلی به کار رفتند. مطالعات برای اندازه‌گیری میزان سیتوکینین داخلی انجام شد تا زمانی که میزان آن در پائین‌ترین حد است جهت تعیین مناسب‌ترین زمان برای تیمار ریشه‌دهی مشخص شود. شاخه‌های هیبرید تولید شده با استفاده از روش نجات جنین در مقایسه با شاخه‌های طبیعی ریشه‌دار دارای میزان بیشتری زآتین داخلی بودند. این نشان می‌دهد که میزان زآتین زیاد در شاخه‌های دورگ، می‌تواند عامل عدم ریشه‌دهی آنها باشد. در این مطالعه، همبستگی بین میزان سیتوکینین‌های داخلی و

شد، ترکیب مناسب محیط کشت در رشد جنین هیبریدهای بین گونه‌ای چغندر مؤثر است و در مواردی، اگر ژن مطلوبی در گونه‌های دور چغندر قند وجود داشته باشد، امکان انتقال ژن در تلاقی‌های بین گونه‌ای پس از رشد جنین‌ها در محیط کشت حاصل از تحقیق امکان‌پذیر خواهد بود.

شده (Anderson and Larsen 1990) یکی از موانع تشکیل ریشه در هیبریدهای بین گونه‌ای *B.vulgaris* × *B.webbiana* بالا بودن زآتین داخلی در آنها است، برطرف کردن این مشکل از طریق کشت جنین، ایجاد شرایط محیطی مناسب از نظر هورمون‌ها و با تاکید به نقش اکسین‌ها محتمل به نظر می‌رسد. همان طور که بررسی

## منابع مورد استفاده:

## References:

- انجمن صنفی کارخانه‌های قند و شکر ایران. ۱۳۸۲. آمار بهره‌برداری کارخانه‌های قند و شکر کشور. یاور. ن، ۱۳۸۳. نشریه فنی کشت بافت گیاهی. مؤسسه تحقیقات چغندر قند.
- Andersen JM, Larsen B (1990) Endogenous level of cytokinins and rooting capacity of *Beta* interspecific hybrids produced via embryo rescue technique. Abstracts of International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, Netherlands 24-29 pp.
- Bhojwani SS, Razdan MK (1983) Zygotic embryo culture, In: Plant tissue culture: Theory and Practice 199-237 pp
- Brown TA (1996) Gene cloning: an introduction. Third edition. Chapman & Hall Publications.
- Bruun L (1991) A statistical analysis of some genetical, physiological and anatomical parameters of the development of *In situ*- and *In vitro*- grown ovules from intra- and inter specific crosses in the genus *Beta*. Sex Plant Report 4: 118-125
- Clark SM (1997) Plant molecular biology. A laboratory Manual. Springer. Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 3-14, 54-63, 305-328
- Chen JF, Staub JE, Tashio Y, Isshiki S, Miyazaki S (1997) Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrox* Chakr. Euphytica 96:413-414
- Chu CC (1978) The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. Proc Symp Plant Tissue Culture. Science Press. Peking, 43-50 pp
- De Bock Thsm (1986) The *Genus Beta* domestication, taxonomy and interspecific hybridization for plant breeding. Acta Hort 182: 335-343
- Honda K, Tsutsui K (1997) Production of interspecific hybrids in the *genus Delphinium* via ovule culture. Euphytica 96: 331-337

- Ishizaka H, Uemetsu J (1995) Interspecific hybrids of *Cyclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture. *Euphytica* 82:31-37
- Johnson RT, Wheatley GW (1961) Studies on backcross generation and advanced generations of interspecific hybrids between *B. vulgaris* and *B. webbiana*. *Journal of the A.S.S.B.T.* 6(5): 429-435
- Klink A, Muller J, Wricke (1996) Characterization of nematode resistance gene in the section procumbentes genus *Beta*: response to two populations of *Heterodera schachtii*. *Theor. Appl. Genet.* 93:773-779
- Kumlehn J, Schieder O, Lorz H (1997) *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture. *Plant Cell Reports* 16: 663-667
- Pierik RLM (1987) Embryo culture. In: *In vitro* culture of higher plants .Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht 139-148 pp
- Ram T, Mahapatra D, Ramos J, McNally R, Brar D S (2004) Production of advanced backcross progenies and monosomic alien addition lines from *O. sativa* × *O. ridleyi*. *Rice Genetic Newsletter*, Vol 20: 1-3
- Savitsky H (1960) Viable diploid triploid and tetraploid hybrids between *Beta vulgaris* and species of the section Patellares. *Journal of the A.S.S.B.T.* Vol (XI) No,3: 215-235
- Savitsky H (1975) Hybridization between *Beta vulgaris* and *B. procumbens* and transmission of nematode (*Heterodera schachtii*) resistance to sugar beet. *Can . J Genet. Cytol.* 17: 197-209
- Shanchi H (2002) The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific crosses of *Lilium*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 139-146
- Sharma D R, Kaur R & Kumar K (1996) Embryo rescue in plants. A review. *Euphytica.*89:325-337
- Simmonds NW (1979) Principles of crop improvement. Longman Group Limited. 278-311

- Sing DBK (1990) Plant breeding: Principles and Methods, Kalyani Publishers; New Delhi, India 138-145, 475-501 pp
- Smith G A (1980) Sugar beet in hybridization of crop plants. edited by: W. R. Fehr and H. H. Hadle ASA. Madison, Wisc:601-616
- Van Geyt JPC, Lange W, Oleo M, De Bock ThSM (1990) Natural variation within the *genus Beta* and its possible use for breeding sugar beet: A review. Euphytica 49: 57-76
- Van Ripley L, Arnison P G (1990) Hybridization of *Sinapis alba* L and *Brassica napus* L via embryo rescue. Plant Breeding 104: 26-33
- Yavari N (1979) Contribution a l'etude du fenouil porte-graines. Travail de Diplome d'ingenieur Horticole ETS, Centre Horticole de Lullier, Geneve, Suisse. 33 pp
- Yu MH (1984) Resistance to *Heterodera schachtii* in Patellares section of the *genus Beta*. Euphytica 33: 633-640