

بررسی ریزازدیادی چغندر قند و تولید ریزگیاهچه های 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 ریزگیاهچه های فتواتوتروفیک. چغندر قند ۲۱(۲):

۱۶۵-۱۷۸

چکیده

چغندر قند یک گیاه ترجیحاً دگرگشن و در بسیاری موارد خود نابارور است که با ازدیاد غیرجنسی یا رویشی آن، می‌توان بوتله‌های مشابه بوتله اولیه تولید نمود. ریزازدیادی کلونی چغندر قند با استفاده از بافت مریستمی ساقه گل‌دهنده جوان انجام می‌گیرد. ریز نمونه‌های مریستمی از ساقه گل‌دهنده بوتله‌های نرعیتم 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 NAA, GA3 و BA به ترتیب در مقادیر ۱، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم/لیتر از نظر ازدیاد ریزجوانه 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 کشتهای اصلی و ترکیب ژنوتیپ و محیط در کشتهای فرعی منظور شد. میانگین تیمارها به صورت فاکتوریل دو

۱- اعضاء هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندر قند
۲- کارشناس ارشد بخش آمار و کامپیوتر- مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

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 ریزجوانه در یک گروه قرار گرفتند. 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 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
مقدمه

بخشید (یاوری و صادقان
۱۳۷۵).

ریزازدیادی چغندر قند با استفاده از بافت مریستمی ساقه گل‌دهنده جوان انجام می‌گیرد. 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

چغندر قند 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

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*, *Acinetobacta*, *Bacillus*, هم‌چنین *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

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 از میان 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 به‌روز 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

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 Skoog 1962). اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و ژبرلین‌ها 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 چغندر قند شامل سیتوکینین و اسید ژبرلیک (Atanassov 1980)، اکسین و اسید ژبرلیک (Coumains et al. 1982)، سیتوکینین به تنهایی و سیتوکینین و اکسین پس از تیمار آنتی اکسین (Saunders 1982; Tsai and Saundres 1995) می‌باشند.

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 می‌باشند. 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

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 ۳۵-۷۵ درصد از هزینه کل ریزازدیادی گیاهان برآورد می‌گردد

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 ژیلبرلین (GA3) به ترتیب در مقادیر ۱/۰، ۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر، ۳ درصد قند و ۰/۸ درصد آگار و ازدیاد ریزجوانه‌های رویشی در محیط پایه، حاوی اکسین‌های IBA، NAA و سیتوکینین BA به ترتیب به مقادیر ۱/۰، ۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر قابل اجرا می‌باشد (مصبح 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 هم‌گروه، دینامیک هورمون‌های گروه‌های متفاوت و

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 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، حاوی ۳ درصد قند، ۰/۸ درصد آگار و هورمون‌های BA/IBA/GA3 به ترتیب در مقادیر ۰/۱،

(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 محرك 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

مورد توجه قرار گرفت. هسته‌های کلونی سپس در مرحله ازدیاد قرار داده 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

(paclobutrazol) برای تیمار برگ‌های ریزگیاهچه‌های کامل در مرحله انتقال به گل‌دان استفاده گردید

ز- تطبیق‌پذیری در دستگاه آب کشت

ریزگیاهچه‌های 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،

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 حرکت‌تر) نزدیک به یکدیگر و پایین‌تر می‌باشد.

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 پس‌از 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 پس‌از 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 پس‌از کشت) فاصله گروه اول متمایزتر و ژنوتیپ ۴۲۸ در گروه اول و دو ژنوتیپ دیگر در گروه‌های بعد قرار گرفتند (جدول ۲).

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

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 **: به ترتیب معنی دار در سطح 5% و 1% respectively و احتمال 5 و 1 درصد

اثر متقابل محیط کشت، ژنوتیپ و

زمان

گروه بندی تیمارهای حاصل از ترکیب سه فاکتور مورد بررسی نشان می دهد که ژنوتیپ های ۴۴۵ و ۴۲۸ در فاصله زمان ۱۰ روز پس از کشت، در هر دو محیط، در گروه های 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. ژنوتیپ های 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 زمان از دوره کشت، دو

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 ریزجوانه ها می باشد.

تولید ریزجوانه های قابل انتقال برای ریشه زایی

نتایج بررسی آماری در خصوص اثر دو ترکیب هورمونی بر روی روند تولید تک جوانه های قابل جداسازی برای ریشه زایی و انتقال به گلدان برای سه ژنوتیپ نشان می دهد که تفاوت دو محیط کشت و سه ژنوتیپ از نظر تولید ریزجوانه قابل جداسازی، معنی دار می باشد ولی اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ معنی دار نبود (جدول ۳).

ژنوتیپ دیگر در گروه های بعدی دیده می شوند (جدول ۲). پیش از این، در بررسی ازدیاد ریزجوانه های رگه های تتراپلوئید کرده افشان که در محیط ازدیاد اول این آزمایش انجام گرفت، پاسخگویی ژنوتیپ های چغندر قند برای تولید ریزجوانه با تفاوت معنی دار همراه شده بود (Yavari and Sadeghian 1997).

از نتایج فوق چنین بر می آید که تأثیر ترکیب هورمونی محیط کشت بر ژنوتیپ های چغندر قند دارای پاسخ ویژه در زمان یا مرحله از دوره کشت ازدیاد می باشد. در این بررسی، دو ژنوتیپ برتر (۴۴۵ و ۴۲۸) از نظر تولید ریزجوانه در یک گروه

جدول ۲ اثر تیمارهای آزمایش ترکیب هورمون های رشد بر تعداد ریزجوانه 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 ریزجوانه ها Mean No. microshoots	ژنوتیپ enotype G	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
	2.487 b	428	1	
2.180 e	445	1		
اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ Media * genotype	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

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 معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ به ترتیب. * و **: Significant at p<5% and 1% respectively
و درصد

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

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

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.

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

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
2.350 b		1	محیط‌های کشت (media)
2.610 a		2	
2.652 a	428		ژنوتیپ‌ها (genotype)
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 $p < 0.05$

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

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

بررسی ریزازدیادی چغندر قند و
 رطوبت نسبی کافی و یکنواخت،
 توانایی رشد «فتواتوتروفیک»
 را، بدون هیچگونه ضایعات
 گیاهی، بازیافتند (شکل‌های
 ۵ و ۴).

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 ریزگیاهچه‌ها گزارش شده
 است (احسانی مقدم، ۱۳۷۷).
 سیستم بررسی شده در این
 پروژه، با تأمین امکانات

گلدانی ضایعات زیاد 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.

بهره‌برداري 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، 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،

مصوب شوراي پژوهش‌هاي علمي کشور به دست آمده است. در اجراي اين طرح، يافته‌هاي زير براي نخستين بار در ايران به دست آمد: (۱) دستيابي به تركيب هورموني جديد براي ازدياد درون شيشه‌اي چغندر قند، (۲) طراحي و ساخت دستگاه آبکشت و به کارگيري آن در برنامه ريزازدياد کلوني گياهان در ايران و (۳) فراهم نمودن پارامترهاي فتو اتوتروفيسم مؤثر در تطبيق پذيري ريزگياه‌چه‌هاي چغندر قند.

آبرساني و تغذيه کودي همزمان تأمين پارامترهاي رشد فتواتوتروفیک براي توليد ريزگياه‌چه در سطح وسيع داراي امتياز مي باشد. نتايج بررسي‌هاي به عمل آمده در اجراي اين طرح، نشان داد که با فراهم آمدن امکانات و تجهيزات مناسب، توليد نيمه صنعتي گياهان به روش ريزازديادي قابل حصول است. اين نتايج براي نخستين بار و در ايران در چارچوب اجراي پروژه ملي شماره ۱۲۴۲



شکل ۱ ازدياد ريزجوانه در محيط A

Fig. 1 Shoot multiplication in medium A

شکل ۲ ازدیاد ریزجوانه در

محیط PII

Fig. 2 Shoot multiplication in medium PII



شکل ۳ ریشه زایی طبیعی
ریزگیاهچه ها در سیستم " آب کشت "

Fig. 3 Rooting in "water culture" device



شکل

واتوتروفیک به گلدان، بدون ضایعات

Fig. 4 Autophototrophic micro plants transferred into pots



شکل ۵ استقرار کلون های 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*)، 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 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