جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

هیبریدهاي بین گونه‌اي در چغندرقند (جنس *Beta*) با استفاده از روش نجات جنین

Inter-specific hybrids in Beta genus using embryo rescue technique

فرانک روزبه [۱]، سید یعقوب صادقیان [۱]، نسرین یاوری [۱] و محمود مصباح [۱]

ف. روزبه، س.ی. صادقیان، ن. یاوری و م. مصباح. ۱۳۸۴. هیبریدهاي بین گونه‌اي در چغندرقند (جنس *Beta*) با استفاده از روش نجات جنین. **چغندرقند ۲۱(۱): ۳۰-۱۵**

چکیده

تلاقي بین گونه‌اي یا بین جنسي در چغندرقند 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 جنین‌هاي هیبرید قبل از نابود شدن در شرایط درون شیشه‌اي کشت و نگه‌داري مي‌شود. دستیابي به تلاقي بین گونه‌اي چغندرقند با گونه‌هاي وحشي به‌دلیل عدم تشابه کروموزومي با روش‌هاي متداول به‌نژادي میسر نیست. در این بررسي، براي تهیه هیبریدهاي بین گونه‌اي، تلاقي یک توده تتراپلوئید 37RT به عنوان والد مادري با دو گونه وحشي *Beta.webiana* و *Beta procumbens* به‌عنوان والد پدري به‌صورت دستي انجام شد. پس از مطالعه روند رشد جنین توسط محلول یک درصد تترازولیوم کلراید، جنین‌هاي هیبرید ۲۰ روزه در محیط غذائي N6 در سه آزمایش با ترکیبات مختلف هورمونی در شرایط آزمایشگاهي کشت و در تاریکي و دماي ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چهار هفته قرار گرفتند. آزمایش سوم با ترکیب محیط N6 وهورمون‌هاي GA3, BA, NAA به‌ترتیب به‌میزان ۱، ۰/۲، ۰/۵و P.V.P به‌میزان ۳۰۰ میلي‌گرم 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 جنین‌هاي جوانه‌زده جهت ازدیاد به محیط N6 حاوي BA وGA3 به ترتیب به‌میزان ۰/۵ و یک میلي‌گرم در لیتر منتقل

۱- اعضا هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندرقند- کرج

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

و در شرایط ۱۶ ساعت روشنایي و دماي۲۵ درجه سانتيگراد قرار داده شدند. نتايج نشان داد كه درصد جوانه‌زني و دانهال هيبريد دو نوع تلاقي *B.vulgaris×B.procumbens* و *B.vulgaris×B.webbiana* به‌ترتيب ۱۰درصد و ٤۰درصد است.

واژه‌هاي كليدي: تلاقي بين گونه اي، چغندرقند، محيط كشت، نجات جنين

اختصارات: GA3: اسيد جيبرليك، BA: بنزيل آمينو پورين، NAA: آلفا نفتالين استيك اسيد، P.V.P: پلي وينيل پيروليدون

مقدمه

سطح زير كشت چغندرقند (*B.vulgaris* L.) در كشور بالغ بر ۱۹۲۰۰۰ هكتار است كه بر اساس آمار سال ۱۳۸۱با توليد ۵/۱۷ تن در هكتار شكر، پنجاه و يك درصد از نياز مصرف داخلي از محل كشت چغندر قندتامين شد. (انجمن صنفي كارخانه هاى قند و شكر كشور ۱۳۸۲). افزايش توليد در واحد سطح مي‌تواند به‌طور مستقيم از طريق بهبود پتانسيل ژنتيكي گياه با افزايش عملكرد در واحد سطح انجام پذيرد و يا اين كه به‌طور غيرمستقيم با مقاوم‌تر كردن گياه در مقابل عوامل بيماريزا و شرايط نامناسب محيطي و در نتيجه آسيب‌پذيري كمتر صورت گيرد.

شناسايي منابع ژنتيكي مقاومت به آفات و بيماری‌ها از ديرباز در برنامه‌هاي به‌نژادي چغندرقند جايگاه ويژه اي داشته است. گزارش‌هاي متعددي مبني‌بر وجود صفات مقاومت به سركسپورا، نماتد چغندرقند، سفيدك حقيقي و دروغي، ويروس موزائيك چغندرقند و ويروس كرليتاپ در گونه‌هاي

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خویشاوند چغندرقند 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 گونه‌ای 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 (*Lycopersicom esculentum*) که به‌راحتی با گونه *L. pimpinellifolicm* 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 می‌شود (Simmonds 1979). در جنس *Beta*، بیشترین مطالعات تلاقی دور بین گونه *B.vulgaris* و گونه‌های گروه *Procumbenes* 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 چغندرقند (*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) یا عدم ارتباط بین سیستم آوندی ساقه به ریشه، نتاج

حاصل از بین می‌رود (Van Ripley and Arnison1990). 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 چغندرقند 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 ازگونه‌های وحشی و چغندرقند تلاش زیادی انجام دادند (Johnson and Wheatley 1961; Savistsky 1960 and 1975; De Bock 1986; Bruun 1991).

تکنیک نجات جنین به‌عنوان 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 ازجمله 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

جنسي ارقام تجارتي توت فرنگي و هيبريداسيون بين گونه اي در كيوي با استفاه از نجات جنين ميسر شده است (Sharma et al. 1996). مقاومت به ويروس پيچيدگي برگ سيب‌زميني (RLRV) با موفقيت از *Solanum etuberasum* به *S. tuberosum* از طريق نجات جنين انتقال داده شد (Sharma et al. 1996). نجات جنين در توليد هيبريدهاي بين گونه اي غلات نيز به كار رفته است (Kumlehn et al. 1997). *Oriza minuta* (برنج وحشي) يك رقم تتراپلوئيد با مقاومت به آفات و بيماري‌هايي چون بلاست و بلايت باكتريايي است. مقاومت به اين بيماري‌ها از گونه وحشي به برنج زراعي با روش نجات جنين منتقل شده است.

مشكل تلاقي بين چغندرقند و گونه هاي وحشي گروه *Procumbentes* به‌طور عمده در مراحل بعد از تشكيل جنين بروز مي‌يابد. در اين نوع تلاقي، جنين تشكيل مي‌شود اما رشد آن به‌دليل عدم تشكيل ريشه متوقف مي‌شود (Savitsky 1975; Savitsky 1960). تلاقي بين *B.vulgaris* و *B.webbiana* به‌منظور انتقال ژن مقاومت به نماتد (*H. schachtii*) به گونه هاي زراعي توسط يوهانسن و ويتلي (Wheatley and Yohanson 1961) انجام گرفت. گياهچه هاى F1 به‌عنوان پيوندك روي چغندرقند ريشه‌دار به‌عنوان پايه پيوند زده شد و از اين طريق، تقريباً تعداد زيادي از گياهان F1 زنده ماندند، اما پس از آزمون نسل چهارم تلاقي برگشتي (BC4) براي مقاومت به نماتد هيچگونه مقاومتي مشاهده نشد (De Bock 1986).

بالاخره مطالعات گسترده اي جهت انتقال ژن مقاومت به نماتد از گروه *Procumbentes* به چغندرقند

توسط ساویتسکي در سال ۱۹۶۰ شروع شد(Savitsky 1960) . در این بررسي، از تلاقي گیاهان دیپلوئید *B.vulgaris* با *B.webbiana* و *B. procumbens*، هیبریدهاي دیپلوئید و از تلاقي *B. vulgaris* تتراپلوئید با *B.patellaris* تتراپلوئید، هیبرید تتراپلوئید تولید شد. در تمام گیاهان F1، خواص چغندر وحشي غالب بود. پرچم‌ها در هیبریدهاي دیپلوئید خیلي کوچك و تقریباً خالي بود. هیبریدهاي تتراپلوئید حدود ۱۵ الي ۱۰۰ بذر تولید کردند (Savitsky 1975; YU 1984; Van Geyt et al. 1990). ساویتسکي(۱۹۷۵) اولین کسي بود که با استفاده از چغندر زراعي تتراپلوئید به هیبریدهاي زنده و بارور دست یافت و از تلاقي این هیبریدها و چغندر زراعي دیپلوئید، گیاهانی با یك کروموزوم اضافي (2n+1) با هدف انتقال ژن مقاومت به نماتد به‌دست آمد (Savitsky 1975). همچنین براون (Bruun 1991) مطالعات ساختاري روي تخمدان‌هاي حاصل از تلاقي‌هاي داخل و بین گونه‌اي چغندر انجام داد، وي نشان داد که آندوسپرم در شرایط آزمایشگاهي خیلي سریع‌تر نسبت به شرایط طبیعي رشد کرده و توسعه مي‌یابد. به علاوه، وي با بررسي‌هاي آناتومیکي جنین‌هاي هیبرید، تجزیه زودرس سوسپانسور(suspensor) را عامل احتمالي عدم ریشه‌دهي قلمداد کرد. تلاقي‌هاي دور حاوي ژن‌هاي مفید، مي‌تواند در برنامه‌هاي به‌نژادي چغندرقند مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین در این مطالعه امکان کاربرد تکنیك نجات جنین در تلاقي‌هاي دور گونه‌هاي زراعي با گونه‌هاي *B.*

procembors و *B. webbiana* از گروه *Procumbentes* مورد بررسي قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گياهي: در اين بررسي به‌منظور تلاقي بين گونه‌اي، توده تتراپلوئيد زراعي چغندرقند به نام 37RT به‌عنوان والد مادري و گونه‌هاي وحشي *Beta procumbens* و *B.webbiana* ديپلوئيد به‌عنوان والد پدري انتخاب شدند. تعداد ۱۰۰ عدد بذر از گونه زراعي چغندرقند در گلدان كاشت و جهت رشد به گلخانه انتقال داده شد. گياهچه‌هاي حاصل پس از ٦ تا ۸ هفته (مرحله ۸ تا ۱۰ برگي) به سردخانه (دماي ٤ تا ۷ درجه سانتيگراد) و نور دائم جهت بهاره‌شدن منتقل شدند. پس از ۱۰ هفته، گياهان بهاره شده جهت گلدهي به گلخانه انتقال يافتند. در گلخانه، علاوه بر نور طبيعي در هر مترمربع يک لامپ ۲۰۰ وات در ارتفاع ۸۰ سانتيمتری گياهان قرار داده شد. طول روز در گلخانه ١٦ ساعت و دماي گلخانه در روز حدود ۲۰ تا ۲۵ درجه و در شب حدود ۱۵ درجه سانتيگراد بود. در طي اين مدت، هر ۱۵ روز گياهان با محلول هوگلند و همچنين محلول‌هاي فسفاته تغذيه شدند (ياوري، ۱۳۸۳).

گونه‌هاي وحشي گروه *Procumbentes* يكساله هستند و احتياج به بهاره‌شدن ندارند، اما به‌دليل پوسته بسيار سخت بذر، زمان جوانه‌زني آن‌ها بسيار طولاني است. بر اين اساس، هم‌زمان با گونه زراعي،كاشت بذور وحشي نيز انجام گرفت.

دورگ گيري: پايه‌هاي مادري پس از ساقه‌دهي و رشد

گل‌آذین برای اخته کردن گل‌ها و دورگگیری دستی آماده شد. بدین منظور، در هر گل‌آذین تمام گل‌های شکفته‌شده قسمت پائین ساقه، حذف شدند و تنها گل‌های نشکفته در قسمت میانی گل‌آذین جهت عقیم کردن، انتخاب شدند. چون والد مادری یک رقم مولتی‌ژرم بود، در هر کلاستر گل که کنار هم روی ساقه قرار داشتند، به‌غیر از یک گل، بقیه حذف شدند. عقیم نمودن به‌صورت دستی و با پنس‌های کوچک نوک تیز صورت گرفت (شکل۱). بدین صورت که کاسبرگ‌ها به‌آرامی کنار زده شد و بساک‌ها به طوری که به نوک کلاله آسیب وارد نشود، با پنس برداشته شدند. سپس جهت جلوگیری از آلودگی با گرده‌های ناخواسته، گل‌آذین اخته شده با پاکت‌های شفاف کاغذی پوشانده شدند. ٤ تا ٦ روز پس از اخته کردن گل‌ها، گرده گونه‌های وحشی به‌طور مجزا جمع‌آوری گردیده و توسط قلم‌مو در روی کلاله گل‌های اخته شده قرار داده شد (شکل۲) و مجدداً گل آذین مربوطه با پاکت شفاف کاغذی پوشانده شد (شکل۳). عمل گرده‌دهی در ساعت ۸ تا ۱۰ صبح و با دو تکرار به‌فاصله دو روز پس از اولین گرده‌دهی انجام شد.

شکل۱ عقیم سازی والد مادری

Fig. 1 Emasculation of female parent

شکل۲ انتقال گرده به والد مادری

Fig. 2 Pollination of the female plant

شکل۳ پوشاندن گل‌آذین‌های والد مادری پس از گرده‌دهی

Fig. 3 Isolation of female plants after pollination

نجات جنین: مشخص کردن مرحله رشد جنین از زمان تلقیح تا برداشت و تایید میزان موفقیت تلاقي بین گونه‌اي، توسط ترازولیوم کلراید صورت گرفت(Yavari 1979) براي این کار، مادگي جدا شده در محلول یک درصد ترازولیوم کلراید به‌مدت ۲٤ ساعت در دماي ۳۰ درجه سانتي‌گراد جهت رنگ‌آمیزي قرار گرفت. در این آزمایش، تعداد ۳۰ جنین (از هر تلاقي ۱۵ عدد) مورد آزمون قرار گرفت و هم چنین جنین‌ها در سن‌هاي ۷، ۱٤، ۲۰ و ۲۵ روزه پس از لقاح، جدا و به محلول ترازولیوم کلراید انتقال داده شد. قدرت حیاتي جنین با قرمز شدن در مجاورت این ماده مشخص مي‌شود. هم‌چنین با این بررسي، میزان رشد و نمو جنین نیز نشان داده مي‌شود. (شکل ۵)

۲۰ تا ۲۵ روز پس از اولین گرده‌دهي، گل‌هاي تلقیح شده از گیاه پایه مادري جداو پس از انتقال به آزمایشگاه، برگچه‌هاي اضافي حذف و ضدعفوني سطحي انجام شد. تیمار ضد عفوني شامل شستشو با آب معمولی به مدت ۲ دقیقه، قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، غوطه ور 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 استرویومیکروسکوپ در شرایط کاملاً استریل لامین ایر،توسط اسکالپل و پنس

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

جدول ۱ ترکیب محیطهاي کشت جنین

Table 1 Composition of embryo culture media

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

در تمام آزمایش‌ها، در هر پتري‌ديش (با قطر ۹ سانتي‌متر) كه حاوي ۱۵ سي‌سي محيط غذائی بود تعداد ۱۰ جنين از يک نوع تلاقي كشت و تحت شرايط تاريكي و دماي ۲۰ درجه سانتي‌گراد تا زمان جوانه‌زني (در حدود ۱۵ الي ۳۰ روز) نگه‌داري شدند. جنين‌هاي جوانه‌زده بلافاصله پس از ظهور علائم جوانه‌زني در شرايط محيطي ۱٦ ساعت روشنايي و شدت نور ۲۰۰۰ لوكس و دماي ۲۵ درجه سانتي‌گراد قرار داده شدند. پس از يک هفته جنين‌هاي جوانه زده جهت رشد در محيط غذايي N6 حاوي ۰/۵ ميلي‌گرم در ليتر هورمون BA و يک ميلي‌گرم در ليتر GA3 تحت شرايط نوری فوق‌الذكر قرار گرفتند. براي دستيابي به دانهال هيبريد، دانهال‌هاي كوچك اوليه بار ديگر در اين محيط واكشت شدند.

نتايج و بحث

علی رغم اين كه گرده افشاني طبيعي در چغندر زراعي به وسيله باد انجام مي‌شود، اما اين روش و ساير روش‌های طبيعی به‌دليل عدم تشابهات كروموزومي گونه‌هاي دور در چغندرقند مؤثر نيست. توليد تعداد كم بذر در تلاقي بين گونه‌اي چغندرزراعي و گونه‌هاي وحشي *Procumbentes* توسط محققين گزارش شده است (Savitsky1960; Johnson and Wheatley 1961; Savitsky 1975; De Bock 1986) هم‌چنين در مطالعاتي كه روی جوانه‌زني بذر صورت گرفته است مشخص شده است كه عدم موفقيت كامل در تلاقي بين *B. vulgaris* و گونه‌هاي وحشي *Procumbentes* در نتيجه عدم نفوذ لوله‌گرده به داخل خامه چغندرزراعي بوده است (Bhojwani and Razdan 1983; Bruun 1991; Brown 1996; Clark 1997).

گل‌هاي چغندرقند كوچك و فنجاني شكل هستند و به همين علت، عقيم‌سازي دستي آن‌ها بسيار مشكل است. هر چند كه تكنيک اخته‌سازي دستي براي دورگگيري كمتر مورداستفاده قرار مي‌گيرد (Smith 1980)، اما به علت بالا

بودن ضریب اطمینان در انجام تلاقي و تهیه دورگ موردنظر از روش اخته‌سازي گل‌هاي نر و گرده افشاني دستي استفاده و بدین‌ترتیب درصد مطلوبي جنین هیبرید تهیه شد (شکل٤).

شکل٤ گل‌های تلقیح شده در والد مادری (١٤روز پس از عمل گرده افشانی)

Fig. 4 Fertilized flowers (14 days after pollination)

رنگ‌آمیزي با ترازولیوم کلراید، به دو منظور انجام شد: اول سنجش قدرت حیاتي جنین و دوم،بررسي روند رشد و نمو جنین. تعداد ۳۰ عدد جنین در ترازولیوم کلراید یک درصد قرار گرفتند. تمام جنین‌ها در مجاورت این ماده قرمز شدند که علت آن تنفس جنین و آزادکردن دی‌اکسیدکربن و نشانه زنده بودن تمام جنین‌ها بود (شکل٥). هم چنین بین سن‌هاي متفاوت جنین که در این رنگ قرار داده شدند جنین ۲۰ روزه داراي ساختمان کامل دو قطبي با ساختار اولیه کوتیلدون و ریشه بود.

شکل ٥ جنین هیبرید پس از تیمار با ترازولیوم کلراید

Fig. 5 Hybrid embryo treated with tetrazolium chloride

در کشت درون شیشه اي جنین، محیط پایه N6 محیط اصلي بود. در عین حال، تأثیر ترکیبات تکمیلي بر رشد بهینه جنین در شرایط آزمایشگاهي بررسي شد که نتایج آن در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول ۲ نوع تلاقي، تعداد گل‌هاي تلقيح شده، تعداد مادگي بارورشده، درصد باروري، تعداد جنين‌هاي كشت شده و درصد جنين‌هاي جوانه‌زده در سه آزمايش مختلف كشت جنين

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

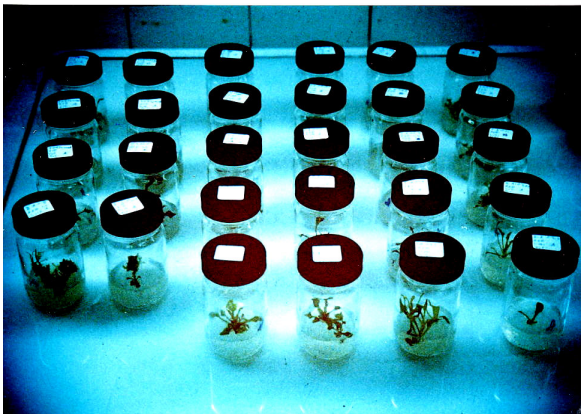
آزمايش‌ها No. experiment	نوع تلاقي Crossing type	تعداد غنچه گل‌هاي تلقيح شده Number of fertilized flower	تعداد مادگي بارور Number of fertilized ovule	درصد باروري Fertilization (%)	تعداد جنين‌هاي كشت شده Number of cultured embryos	درصدجوانه‌زني Germination (%)
اول First experiment	37RT(4n) × *B. webbiana*(2n)	210	60	28	60	-
	37RT(4n) × *B. procumbens*(2n)	210	70	33	60	-
دوم Second experiment	37RT(4n) × *B. webbiand*(2n)	155	45	29	45	-
	37RT(4n) × *B. procumbens*(2n)	155	47	30	45	-
سوم Third experiment	37RT(4n) × *B. webbiand*(2n)	450	100	22	100	40
	37RT(4n) × *B. procumbens*(2n)	450	200	44	100	10

در آزمايش اول، محيط كشت فاقد هورمون و P.V.P. بود. همچنين غلظت آگار و ساكارز در اين محيط به ترتيب به‌ميزان ۰/۸ و ٦ درصد بود. در اين محيط، تمام جنين‌هاي كشت شده پس از ۳ الي ٤ روز قهوه‌اي شدند و درصد جوانه‌زني صفر بود. در آزمايش دوم، محيط كشت پايه N6 حاوي هورمون‌هاي BA و NAA به‌ترتيب به‌مقدار ۰/۲ و ۰/۵ ميلي‌گرم در ليتر بود و ساير عوامل مشابه آزمايش اول بود. در اين محيط نيز درصد بالائي از جنين‌ها بعد از سه روز قهوه‌اي شدند و در تعداد كمي نشانه‌هايي از پاسخ جنين‌هاي كشت شده به‌صورت توده‌هاي نامتمايز سلولي در اطراف آن به‌وجود آمد. اين

توده‌هاي نامتمايز سلولي پس از چند روز، قهوه‌اي شده و از بين رفتند. عدم جوانه‌زني در آزمايش اول به‌علت بازدارندگي ناشي از ترشح مواد فعلي در كشت جنين هيبريد بود كه محدوديت رشد با وجود استفاده از هورمون‌ها در آزمايش دوم نيز برطرف شد. در آزمايش سوم، علاوه بر هورمون‌هاي BA و NAA به ترتيب به‌ميزان ۰/۲ و ۰/۵ ميلي‌گرم در ليتر، هورمون GA3 (غلظت ۱ ميلي‌گرم در ليتر) نيز افزوده شد. هم‌چنين P.V.P به مقدار ۳۰۰ ميلي گرم در ليترافزوده شد. در اين محيط، غلظت ساكارز به ۳ درصد و هم‌چنين آگار به ۰/۶ درصد كاهش يافت و جوانه‌زني مشاهده شد (شكل۶). براين اساس، مناسبترين تركيب محيط كشت آزمايش سوم تعيين شد، زيرا بالاترين ميزان جوانه‌زني به‌دست آمد (جدول ۲).

شكل۶ جوانه‌زنی جنین‌های کشت شده در شرایط درون شیشه

Fig. 6 Germination of embryos *In vitro*



شکل۷ دانهال‌های هیبرید

Fig. 7 Hybrid seedlings

عوامل بسیاري در موفقیت کشت جنین مؤثر هستند که مهم‌ترین آن‌ها شامل ژنوتیپ، مرحله رشد جنین در زمان جداسازي، شرایط محیطي والد مادري، ترکیب‌های مختلف محیط کشت، هورمون‌ها، ساکارز، اکسیژن، دما و نور است (Kumlehn et al 1997). در این تحقیق، یکي از عوامل مؤثر بر عدم جوانه‌زني جنین‌ها، ترشح ترکیبات فنلي و قهوه‌اي شدن آن‌ها بود. تیمارهاي متفاوتي براي جذب مواد زائد از جمله ترکیبات فنلي در جلوگیري از قهوه‌اي شدن به‌کار مي‌رود که معمول‌ترین آن‌ها زغال فعال است (1983, Honda and Tsutsui 1997, Bhojwani and Razdan Pierie 1987). زغال فعال در غلظت به‌کار گرفته قادر به برطرف کردن مشکل نبود و هنگامي که P.V.P که یک جاذب ترکیبات فنلي است به محیط کشت اضافه شد و میزان آگار به ۰/۶ درصد تقلیل یافت، جنین‌ها قهوه‌اي نشده و در حضور جیبرلیک اسید، جوانه‌زنی به‌طور طبیعي انجام شد.

با تیمار ترازولیوم کلراید مشخص شد که جنین‌هاي ۲۰ روزه بالغ هستند و

نیازي به غلظت بالاي ساکارز ندارند. ساکارز علاوه بر تامین کربن، تثبیت کننده فشار اسمزي نیز است و اهمیت ایجاد فشار اسمزي از اهمیت غذایي آن بیشتر است. جنین‌هاي نارس در محیط کشت نیاز به فشار اسمزي بالا دارند. آندوسپرم این جنین‌ها در حالت طبیعي داراي فشار اسمزي بالائي است (Pierik 1987). معمولاً غلظت آگار در کشت جنین بین ۰/۶ تا ۰/۸ درصد است و غلظت بیشتر، از رشد جنین جلوگیري به‌عمل مي‌آورد و این در حالي است که در برخي موارد، استفاده از محیط کشت مایع جوانه‌زني و رشد جنین را بهبود بخشیده است (Pierik 1987).

کاهش غلظت آگار موجب حرکت ترکیبات منفي مترشحه به سمت پائین محیط کشت شده و از تجمع آن‌ها در محل تماس جنین با محیط کشت جلوگیري به‌عمل مي‌آید. بنابراین، به‌نظر مي‌رسد که کاربرد هم زمان P.V.P و کاهش غلظت آگار و هم‌چنین اسید جیبرلیک که داراي 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 زیادي در زمینه مشکلات موجود در تهیه دورگهاي بین گونه‌اي چغندر و زنده ماندن آن‌ها پس از مرحله دانهال در چند دهه اخیر صورت گرفته است و علت عدم دستیابي به گیاه تلاقي نیز موضوع چندین تحقیق بوده است (Bruun 1991; De Bock 1986; Johnson and Wheatley 1961; Savitsky 1960).

اندرسون و لارسن (Andersen and Larsen 1990) براي بررسي عوامل فیزیولوژیکي ناتواني در تولید ریشه، تعدادي نتاج حاصل از تلاقي چغندر زراعي و گونه وحشي *B. webbiana* با

استفاده از تکنیک نجات جنین تهیه کردند. شاخه‌هاي این دورگ‌ها که فاقد ریشه بود و شاخه‌هاي طبیعي ریز ازدیاد شده چغندرقند براي اندازه‌گیري و مقایسه میزان سیتوکینین داخلي به‌کار رفتند. مطالعات براي اندازه‌گیري میزان سیتوکنین داخلي انجام شد تا زماني که میزان آن در پائین‌ترین حد است جهت تعیین مناسبترین زمان براي تیمار ریشه‌دهي مشخص شود. شاخه‌هاي هیبرید تولید شده با استفاده از روش نجات جنین در مقایسه با شاخه‌هاي طبیعي ریشه‌دار داراي میزان بیشتري زآتین داخلي بودند. این نشان مي‌دهد که میزان زآتین زیاد در شاخه‌هاي دورگ، مي تواند عامل عدم ریشه‌دهي آن‌ها باشد. در این مطالعه، همبستگي بین میزان سیتوکنین‌هاي داخلي و قابلیت ریشه‌زائي توضیح داده شده است.

مشکلات موجود در تهیه هیبریدهاي بین گونه‌اي چغندرقند و عدم تولید بذر کافي در گیاهان دورگ و هم‌چنین عدم وجود گیاهان هیبرید حاصل از تلاقي چغندر زراعي با گونه‌هاي وحشي 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 برنامه‌هاي اصلاحي، راندمان دستیابي به جنین‌هاي جوانه‌زده و نهایتاً دانهال‌هاي هیبرید افزایش مي‌یابد (شکل۷). همان گونه که قبلا نیز ذکر شد، یکي از مشکلات جوانه‌زني بذور به علت سختي پوسته آن‌ها است که این مانع به‌راحتي با کشت جنین برداشته مي‌شود. علاوه بر این، طبق مطالعات انجام

شده (Anderson and Larsen 1990) یکي از موانع تشکیل ریشه در هیبریدهاي بین گونه‌اي *B.vulgaris* × *B.webbiana* بالا بودن زآتین داخلي در آن‌ها است، برطرف کردن این مشکل از طریق کشت جنین، ایجاد شرایط محیطي مناسب از نظر هورمون‌ها و با تاکید به نقش اکسین‌ها محتمل به نظر مي‌رسد. همان طور که بررسی شد، ترکیب مناسب محیط کشت در رشد جنین هیبریدهای بین گونه‌ای چغندر مؤثر است و در مواردی، اگر ژن مطلوبی در گونه‌های دور چغندرقند وجود داشته باشد ،امکان انتقال ژن در تلاقی‌های بین گونه‌ای پس از رشد جنین‌ها در محیط کشت حاصل از تحقیق امکان‌پذیرخواهد بود.

منابع مورد استفاده:

References:

انجمن صنفي كارخانه‌هاي قند و شكر ايران. ۱۳۸۲. آمار بهره‌برداري كارخانه‌هاي قند و شكر كشور.

ياوري. ن، ۱۳۸۳. نشريه فني كشت بافت گياهي. مؤسسه تحقيقات چغندرقند.

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 C*yclamen 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. ridley*i. 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 letude du fenouil porte- graines. Travail de Diplome dingenieur Horticole ETS, Centre Horticole de Lullier, Geneve, Susse. 33 pp

Yu MH (1984) Resistance to *Heterodera schachtii* in Patellares section of the *genus Beta.* Euphytica 33: 633-640