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

بررسي ريزازديادي چغندرقند و توليد ريزگياهچه‌هاي فتواتوتروفيك

Study on sugar beet micropropagation and production of photoautotrophic micro plants

نسرين ياوري[1]، سيد يعقوب صادقيان[1]، محمود مصباح[1] و عبدالرسول غفاري جهرمي[2]

ن. یاوری، س.ی. صادقیان، م. مصباح و ع.ر. غفاری جهرمی . ۱۳۸٤. بررسي ريزازديادي چغندرقند و توليد ريزگياهچه‌هاي فتواتوتروفيك. چغندرقند ۲۱(۲): ۱۶۵-۱۷۸

چكيده

چغندرقند يك گياه ترجيحاً دگرگشن و در بسياري موارد خود نابارور است كه با ازدياد غيرجنسي يا رويشي آن، مي‌توان بوته‌هاي مشابه بوته اوليه توليد نمود. ريزازديادی كلوني چغندرقند با استفاده از بافت مريستمي ساقه گلدهنده جوان انجام مي‌گيرد. ريز نمونه‌هاي مريستمي از ساقه گلدهنده بوته‌هاي نرعقيم چغندرقند تهيه و در شرايط استريل كشت گرديد. دو محيط كشت پايه PGoB حاوي تركيب هورموني IBA, NAA و BA به ترتيب در مقادير ۰/۱، ۰/۱ و يك ميلي‌گرم/ليتر و تركيب هورموني NAA, GA3 و BA به ترتيب در مقادير ۱، ۰/۱ و ۰/۵ميلي‌گرم/ ليتر از نظر ازدياد ريزجوانه در سه ژنوتيپ شماره ٤٦٣، ٤٤٥ و ٤٢٨ پس از مدت۳۰،۲۰ و ۱۰ روز از آغاز كشت و در پايان چرخه ازدياد در مرحله جداسازي براي انتقال به محيط ريشه‌زايي مورد مقايسه قرارگرفت. آزمايش در هشت تكرار هر يك شامل يك ظرف كشت در طرح بلوك‌هاي كامل تصادفي در يك آزمايش اسپليت-فاكتوريل انجام گرديد. زمان كرت‌های اصلی و تركيب ژنوتيپ و محيط در كرت‌های فرعی منظور شد. ميانگين تيمارها به صورت فاكتوريل دو

۱ - اعضاء هيئت علمی مؤسسه تحقيقات چغندرقند
۲- كارشناس ارشد بخش آمار و كامپيوتر- مؤسسه تحقيقات اصلاح و تهيه نهال و بذر

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

عاملي در زمان، با روش دانكن مقايسه گرديد. نتايج تجزيه آماري داده‌ها نشان داد كه كليه فاكتورها (زمان، محيط و ژنوتيپ) داراي اثر معني‌دار هستند. دو ژنوتيپ برتر(٤٤٥ و ٤٢٨) از نظر توليد ريزجوانه در يك گروه قرارگرفتند. محيط دو نسبت به محيط يك با توليد ريزجوانه بيشتر، برتر بود و اين امر نمايانگر نقش تركيب هورموني در محيط كشت ازدياد ريزجوانه‌ها مي‌باشد. در اجراي اين پژوهش طراحي و ساخت يك دستگاه آب كشت مجهز به سيستم هوارساني انجام شد و ريزگياهچه‌هاي چغندرقند در شرايط ايجاد شده در سيستم آب كشت توانايي رشد فتواتوتروفيك را باز يافتند.

واژه‌هاي كليدي: آب كشت، تطبيق پذيري، چغندرقند، ريزازديادكلوني

مقدمه

چغندرقند يك گياه ترجيحاً دگرگشن و در بسياري موارد خود نابارور است. ازدياد يك بوته انتخاب شده براي مطالعه تركيب‌پذيري و نيز توليد بذور آزمايشي از طريق ازدياد جنسي ممكن نيست، اما با ازدياد غيرجنسي يا رويشي آن، مي‌توان بوته‌هاي مشابه بوته اوليه توليد نمود و به اين ترتيب، قدرت تشخيص و انتخاب ژنوتيپ‌ها را براي صفات مورد نظر در آزمايش‌هاي گوناگون در برنامه‌هاي بهنژادي ارقام جديد افزايش بخشيد (ياوري و صادقيان ۱۳۷۵).

ريزازديادي چغندرقند با استفاده از بافت مريستمي ساقه گل‌دهنده جوان انجام مي‌گيرد. نخستين مسئله زنده نگه‌داشتن ريزنمونه گياه است و براي دستيابي به اين امر، از يك سو جلوگيري از بروز آلودگي و نيز كنترل ترشح مواد فنلي از محل برش ريزنمونه اهميت بسيار دارد و از سوي ديگر، جهت دادن به روند رشد و نمو ريزنمونه به صورت هدفمند امر اساسي

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

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 Acinetobacta, Bacillus,* . هم چنین *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

قندهاي لاكتوز، گالاكتوز و يا عصاره‌هاي گياهي اختياري است. نمك‌هاي معدني متناسب با يون‌هاي مورد نياز گياه انتخاب و تركيب مي‌گردند. عناصر پر مصرف در غلظت ميلي مولار (mM) شامل نيتروژن، پتاسيم، فسفر، كلسيم، گوگرد، منيزيم و عناصر كم مصرف اما مهم در غلظت ميكرو مول (µM) شامل آهن، منگنز، روي، بر، كوبالت و مولبيدن مي باشند. براي ازدياد رويشي، منبع انرژي كربن معمولاًدر غلظت ۲ تا ۳ درصد در محيط غذايي گنجانده مي‌شود. كمپلكس ويتامين‌هاي B و ويتامين C معمولاًبيشتر در محيط‌هاي كشت به كار مي‌روند. انتخاب يك محيط غذايي براي كشت بافت يك گياه ويژه با استفاده از الگوهاي غذايي آزمون شده آغاز مي‌شود و بر طبق نيازهايي كه مشاهده مي‌گردد تغييرات كمي و كيفي در آن انجام تا با شرايط رشد آن گياه تطبيق داده شود (ياوري و مصباح ۱۳٦۸).

براساس يك اصل كلي پذيرفته شده مي‌توان با انتخاب نسبت هورمون‌هاي گياهي، روند رشد و نمو ريزنمونه را تعيين نمود (Murashige and Skoog1962). اكسين‌ها، سيتوكينين‌ها و ژيبرلين‌ها به عنوان مهم‌ترين گروه‌هاي هورموني، معرفي شده‌اند (Boxus 1995). توازن تركيب هورموني مورد استفاده بايد براساس نتايج تحقيقات پيشين و نيز مشاهدات دقيق در حين اجراي ريزازديادي، شناسايي و بهترين تركيب تعيين شود.

تركيب‌هاي هورموني استفاده شده در محيط ازدياد رويشي چغندرقند شامل سيتوكينين و اسيد ژيبرليك (Atanassov 1980)، سيتوكينين، اكسين و اسيد ژيبرليك (Coumains et al. 1982)، سيتوكينين به تنهايي و سيتوكينين و اكسين پس از تيمار آنتي اكسين (Saunders 1982; Tsai and Saundres 1995) مي‌باشند.

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، ازدیاد، ریشه‌زایی و یا جنین‌زایی رویشی تاکید دارد (Reuther 2000).

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

(Boxus 1995). استفاده از مواد بازدارنده رشد براي تقويت و استحكام بافت گياه در اين مرحله، نتايج مؤثري همراه داشته است (Smith et al. 1990).

در اين مقاله نتايج بررسي انجام شده براي بالا بردن كارايي روش ريزازديادي در آزمايشگاه ازطريق كنترل آلودگي‌ها، شناسايي و تنظيم عوامل محرك رشد ازديادي و تطبيق‌پذيري ريزگياهچه‌ها براي رشد خارج از شيشه، به عنوان عوامل دستيابي به افزايش توليد ريزگياهچه كلوني، ارائه مي‌گردد.

مواد و روش‌ها

الف- مواد گياهي

در اين بررسي از رگه‌هاي نرعقيم سيتوپلاسمي به شماره‌هاي IR ٤٦٣، IR ٤٤٥ و IR ٤٢٨ استفاده شد.

ب - نمونه‌برداري و آماده نمودن بافت گياهي براي كشت استريل

بافت ساقه گل‌دهنده با استفاده از تيمار زير آماده كشت استريل گرديد: جداسازي انتهاي ساقه گل در اندازه ۳-۲ سانتي‌متر، شستشو با محلول Detergent، آبكشي كامل با آب معمولي، شستشو با الكل ۹٦ درجه به مدت ۲۰ ثانيه، شستشو با محلول هيپوكلريت ۱/۵ درصد و آبكشي با آب مقطر استريل سه بار هر بار سه دقيقه، جدا نمودن قطعه انتهاي ريزنمونه به طول ۵ ميلي‌متر براى كشت اوليه و شستشو با محلول آب اكسيژنه ۳ درصد (dip) در زمان انتقال به محيط جديد.

ج- استقرار بافت ريزنمونه در شرايط كشت درون شيشه‌اي و القاء رشد رويشي

قطعه ريزنمونه ضدعفوني شده در محيط كشت اول ريز ازديادي با پايه PGoB، حاوي۳ درصد قند، ۰/۸ درصد آگار و هورمون‌هاي BA/IBA/GA3 به ترتيب در مقادير۰/۱ ،

۰/۱ و ۱ میلی‌گرم/ لیترکشت گردید به طوري که محل برش داخل محیط غذایي قرارگرفت. ظرف‌های کشت در شرایط اطاق رشد با دماي ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱٦ ساعت روشنایي قرارداده شد.

د- آزمایش ترکیب‌هاي هورموني محیط کشت تکثیر

این آزمایش شامل بررسي اثر دو محیط کشت، بر ازدیاد کلون‌هاي سه ژنوتیپ چغندرقند در زمان‌هاي ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از آغاز کشت و در زمان جداسازي ریزجوانه‌ها براي انتقال به مرحله ریشه‌زایي 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 حاوي هورمون‌هاي BA, IBA, NAA به ترتیب در مقادیر ۰/۱، ۰/۱ و ۱ میلي‌گرم/لیتر.

محیط۲: PGoB حاوي هورمون‌هاي BA, NAA, GA3 به ترتیب در مقادیر۱، ۰/۱و ۰/۵ میلي‌گرم/لیتر.

ه- محاسبه‌های آماري

ریزجوانه کلوني سه ژنوتیپ نرعقیم ٤۲۸, ٤٤٥ و٤٦۳ در هشت تکرار در طرح بلوک‌هاي کامل تصادفي در قالب آزمایش اسپلیت- فاکتوریل مورد بررسي قرار گرفت. یادداشتبرداري تعداد ریزجوانه‌هاي رویشي ازدیاد شده در سه زمان: ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت ریزجوانه اولیه و نیز در زمان جداسازي تک ریزجوانه‌ها جهت القاء ریشه‌زایي انجام گرفت. زمان کرت‌های اصلی و ترکیب ژنوتیپ و محیط در کرت‌های فرعی منظور شد. میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت.

و- افزایش مقاومت تطبیق‌پذیري ریزگیاهچه‌ها

محلول۰/۲ درصد پاکلوبوترازول (Mepiquat

paclobutrazol) براي تيمار برگ‌هاي ريزگياهچه‌هاي كامل در مرحله انتقال به گلدان استفاده گرديد

ز- تطبيق‌پذيري در دستگاه آب كشت

ريزگياهچه‌هاي كامل از ظروف كشت حاوي محيط ريشه‌زايي خارج و به مدت يك هفته با آب معمولي و سپس در هفته دوم با محلول ۱/٤ غلظت هوگلند در يك دستگاه آب كشت مجهز به هوارساني تغديه شدند.

نتايج و بحث

اجراي چرخه ريز ازديادي با كشت ريزنمونه‌هاي ساقه از بوته‌هاي نرعقيم چغندرقند در مرحله اوليه رشد ساقه گل انجام گرفت. باتوجه به عدم پاسخگويي مطلوب بافت به استريليزاسيون با محلول هيپوكلريت، استفاده از محلول آب اكسيژنه ۳ درصد براي استريليزاسيون مواد گياهي در زمان انتقال به محيط جديد، مورد توجه قرار گرفت. هسته‌هاي كلوني سپس در مرحله ازدياد قرار داده شد. در اين مرحله، دو محيط كشت جامد با تركيب پايه PGoB، حاوي هورمون‌هاي رشد متفاوت از نظر توليد ريزجوانه جانبي در زمان دوره ازدياد مورد مقايسه قرار گرفت. نتايج تجزيه آماري داده‌ها نشان داد كه اثركليه فاكتورها (زمان، محيط و ژنوتيپ) معنی‌دار است (جدول ۱).

اثر متقابل فاكتورهاي مورد آزمايش

از نظر گروه‌بندي ميانگين‌ها، ژنوتيپ‌هاي ٤٤٥ و ٤٢٨ از نظر ميزان توليد ريزجوانه رويشي تفاوت معني‌دار ندارند و در يك گروه قرار مي‌گيرند و ژنوتيپ ٤٦٣ در گروه دوم قرار مي‌گيرد (جدول۲). توليد ريزجوانه‌ها مشخصاً يك روند فزاينده را در مدت كشت دنبال نمود و توليد

ریزجوانه‌ها در سه زمان کشت به ترتیب در سه گروه مشاهده شد (جدول ۳).

اثرمتقابل زمان رشد و ژنوتیپ

در زمان اول شمارش ریزجوانه‌ها (۱۰ روز پس از کشت)، به ترتیب ژنوتیپ ٤٤٥ در گروه اول و ژنوتیپ‌های ٤۲۸ و ٤٦۳ در گروه بعد قرار مي گیرند. در زمان دوم شمارش ریزجوانه‌ها (۲۰ روز پس از کشت) ژنوتیپ ٤۲۸ در گروه اول، ژنوتیپ ٤٤٥ در گروه بعد و ژنوتیپ ٤٦۳ با فاصله زیاد در گروه سوم قرار گرفته است. در زمان سوم شمارش ریزجوانه‌ها (۳۰ روز پس از کشت) فاصله گروه اول متمایزتر و ژنوتیپ ٤۲۸ در گروه اول و دو ژنوتیپ دیگردرگروه‌هاي بعد قرار گرفتند (جدول ۲).

اثر محیط و ژنوتیپ

جدول ۲ نشان مي‌دهد که تولید ریزجوانه در ژنوتیپ‌هاي (٤٤٥ و ٤۲۸) در محیط دوم بالاترین میزان و در یك گروه قرار گرفته و تولید ریزجوانه در محیط یک در سه ژنوتیپ و نیز تولید ریزجوانه در ژنوتیپ ٤٦۳ در محیط دوم، پایین‌تر و نزدیك به یکدیگر است. به عبارتي، بیشترین تعداد ریزجوانه در ژنوتیپ‌هاي ٤۲۸ و ٤٤٥ در محیط کشت دوم مشاهده مي‌گردد، در حالي که تعداد ریزجوانه‌هاي این دو ژنوتیپ در محیط کشت اول با تولید ریزجوانه ژنوتیپ ٤٦۳ (ژنوتیپ ضعیف) در محیط کشت دوم (محیط کشت محرك‌تر) نزدیك به یکدیگر و پایین‌تر مي‌باشد.

جدول ۱ تجزیه واریانس تیمارهاي 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 آزادي df	ميانگين 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 معني دار در سطح احتمال ۵ و۱ درصد
*و **: Significant at p<5% and 1% respectively

اثر متقابل محیط کشت، ژنوتیپ و زمان

گروه‌بندي تیمارهای حاصل از ترکیب سه فاکتور مورد بررسي نشان مي‌دهد که ژنوتیپ‌هاي ٤٤٥ و ٤٢٨ در فاصله زمان ۱۰ روز پس از کشت، در هر دو محیط، درگروه‌هاي متفاوت قرار گرفتند، در حالي که این دو در محیط رشد با ترکیب هورموني اول در یك گروه قرار داشتند. در محیط رشد دوم، ژنوتیپ ٤٤٥ برتري دارد. ژنوتیپ‌هاي ٤٤٥ و ٤٢٨ در فاصله زمان ۲۰ روز پس از کشت در محیط دوم در یك گروه قرار گرفته است. بالاترین میزان ازدیاد ریزجوانه در زمان ۳۰ روز پس از کشت در محیط دوم و در ژنوتیپ ٤٢٨ مشاهده شده است. در این زمان از دوره کشت، دو

ژنوتيپ ديگر در گروه‌هاي بعدي ديده مي‌شوند (جدول۲).

پيش از اين، در بررسي ازدياد ريزجوانه‌هاي رگه‌هاي‌هاي تتراپلويد گرده افشان كه در محيط ازدياد اول اين آزمايش انجام گرفت، پاسخگويي ژنوتيپ‌هاي چغندرقند براي توليد ريزجوانه با تفاوت معني‌دار همراه شده بود (Yavari and Sadeghian 1997).

از نتايج فوق چنين بر مي‌آيد كه تأثير تركيب هورموني محيط كشت بر ژنوتيپ‌هاي چغندرقند داراي پاسخ ويژه در زمان يا مرحله از دوره كشت ازدياد مي‌باشد. در اين بررسي، دو ژنوتيپ برتر (٤٤٥ و ٤٢٨) از نظر توليد ريزجوانه در يك گروه قرارگرفتند و درمحيط ۲ نسبت به محيط ۱ به شرايط رشد پاسخ بهتري نشان دادند. اين امر نمايانگر نقش با اهميت‌تر تركيب هورموني در محيط كشت ازدياد ريزجوانه‌ها مي باشد.

توليد ريزجوانه‌هاي قابل انتقال براي ريشه‌زايي

نتايج بررسي آماري در خصوص اثر دو تركيب هورموني بر روي روند توليد تك جوانه‌هاي قابل جداسازي براي ريشه‌زايي و انتقال به گلدان براي سه ژنوتيپ نشان مي‌دهد كه تفاوت دو محيط كشت و سه ژنوتيپ از نظر توليد ريزجوانه قابل جداسازي، معني‌دار مي‌باشد ولي اثر متقابل محيط كشت و ژنوتيپ معني‌دار نبود (جدول ۳).

جدول ۲ اثر تیمارهاي آزمایش ترکیب هورمون هاي 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 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		
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 نتايج تجزيه واريانس ميانگين تعداد ريزجوانه ازدياد شده در محيطهاي كشت و ژنوتيپها در زمان انتقال براي ريشه‌زايي

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

منبع تغييرات Source		درجه آزادي df	ميانگين مربعات Mean Square
تكرار	Replication	7	0.225
محيط	Medium	1	0.809 *
ژنوتيپ	Genotype	2	2.742 ***
محيطxژنوتيپ	Medium x Genotype	2	0.097 ns
خطا	Error	35	4.640
CV		14.68% *	

*,** :Significant at p<5% and 1% respectively

* و**: به ترتيب معني دار در سطح احتمال ۵ و۱درصد

ژنوتيپهاي ٤٢٨ و ٤٤٥ نسبت به ٤٦٣، با ريزجوانه‌هاي قابل جداسازي بيشتر در يك گروه قرار گرفته‌اند. هم چنين، اثرمتقابل ژنوتيپ و محيط در اين مرحله براي ژنوتيپهاي ٤٢٨ و٤٤٥ مشابه بود در حالي كه ژنوتيپ ٤٦٣ در گروه دوم قرار گرفت(جدول ٤).

مشاهدات انجام شده نشان داد كه تراكم بيشتر توليد ريزجوانه در محيط۲ (شكل۲) نسبت به محيط ۱ (شكل ۱) موجب شده است تا در مرحله انتقال براي ريشه‌زايي، تعدادي از ريزجوانه‌هاي كوچكتر قابل جداسازي نباشند و از اين رو، تفاوت معني‌دار در ميانگين ريزجوانه‌هاي انتقال يافته از محيط كشت آزمايش ديده نشود.

در عين حال، با توجه به پاسخ مشابه ژنوتيپهاي ٤٢٨ و ٤٤٥ در توليد ريزجوانه‌هاي قابل جداسازي در مرحله نهايي چرخه ازدياد و به طور كلي، توليد بيشتر ريزجوانه در محيط

۲ نسبت به محیط ۱، میتوان چنین نتیجه‌گیري نمود که اثر ترکیب هورموني در محیط ۲ در افزایش تکثیر ریزجوانه‌هاي رویشي چغندرقند برتر میباشد. براي افزایش سودمندي این محیط ازدیاد در مرحله ریشه‌زایي، تغییر در سطح هورمون اکسین و یا استفاده از یك مرحله کشت براي تکمیل رشد ریزجوانه‌ها پیش‌بیني میگردد.

جدول ٤ اثر تيمارهاي آزمايش تركيب هورمون‌هاي رشد بر تعداد ريزجوانه جداسازي شده براي ريشه‌زايي

Table 4 The effects of growth regulators on no. of propagated shoots at root induction

تيمارها Treatments	محيط Media	ژنوتيپ Genotype	ميانگين تعداد ريزجوانه Mean no. of shoots
محيط‌هاي كشت (media)			
	1		2.350 b
	2		2.610 a
ژنوتيپ‌ها (genotype)			
		428	2.652 a
		445	2.781 a
		463	2.008 b

ميانگين‌هاى با حرف مشابه در يک گروه قرار دارند.

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

فراهم نمودن شرايط رشد فتواتوتروفيك

اجراي كشت در شرايط درون شيشه‌اي (*in vitro*) بافت گياه، به منظور تسريع روند ازدياد ريزجوانه‌هاي رويشي سالم، يكنواخت و به تعداد زياد انجام مي‌گيرد. بافت گياهي ازدياد شده در شرايط فوق، نمك‌هاي معدني، قند و هورمون‌هاي گياهي را از محيط غذايي جذب و به مصرف توليد بافت جديد مي‌رساند. در آخرين مرحله از چرخه ريزازديادي، ريز گياهچه‌هاي كامل (ريشه‌دار) توليد مي‌شود در حالي كه اين ريزگياهچه‌ها پس از خروج از شيشه، توانايي رشد در شرايط طبيعي را دارا نمي‌باشند (شكل ۳).

در اثر ويژگي‌هاي اين ريزگياهچه‌ها از جمله ظريف و نازك بودن لايه كوتيكول، باز بودن روزنه‌ها در برگ‌ها و نيز پايين بودن رطوبت نسبي (۳۵٪) در شرايط محيطي موجود و بروز نوسان در شرايط نوري و دمايي محيط، در مرحله رشد

گلداني ضايعات زيادي به ريزگياه‌چه‌هاتوليد وارد مي‌گردد. به منظور رفع اين معضل، فعال نمودن رشد فتواتوتروفيك ريزگياهچه‌ها و افزايش مقاومت آن‌ها در برابر تنش رطوبتي مورد بررسي قرار گرفت.

بهره‌برداري از سيستم‌هاي گوناگون كشت بدون خاك (هايدروپونيك) مورد بررسي قرار گرفت كه با در نظر گرفتن كليه عوامل و امكانات، يك دستگاه آب كشت مجهز به سيستم هوارساني طراحي و ساخته شد (شكل۳).

در شرايط دستگاه آب كشت، ريز گياهچه‌ها به مدت يك هفته با آب معمولي و سپس در هفته دوم با محلول ۱/٤ غلظت هوگلند تغذيه شدند. ريزگياه‌چه‌ها در اين سيستم به واسطه تأمين آب براي توليد ريشه‌هاي جديد، نور، رطوبت نسبي كافي و يكنواخت، توانايي رشد «فتواتوتروفيك» را، بدون هيچگونه ضايعات گياهي، بازيافتند (شكل‌هاي ٤و٥).

امكان استفاده از ماده بازدارنده رشد پاكلوبوترازول (۰/۲٪) براي نخستين بار در ايران به منظور افزايش مقاومت ريز گياه‌چه‌هاي توليد شده در شرايط درون شيشه، در زمان جا به جايي در گلدان انجام گرفت. برگ ريز گياه‌چه‌هاي تيمار شده، ۲٤ ساعت پس از تيمار به رنگ سبز تيره، با طراوت و داراي قامت كاملاً ايستاده مشاهده شد.

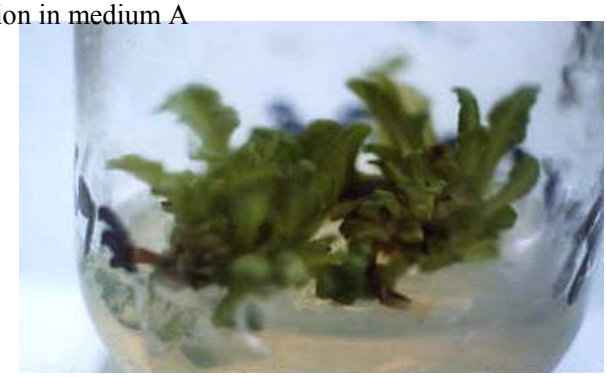
پيش از اين، موفقيت در استفاده از آب براي انتقال موقت ريزگياه‌چه‌ها گزارش شده است (احساني مقدم، ۱۳۷۷). سيستم بررسي شده در اين پروژه، با تأمين امكانات

آبرساني و تغذيه كودي هم‌زمان تأمين پارامترهاي رشد فتواتوتروفيك براي توليد ريزگياه‌چه در سطح وسيع داراي امتياز مي باشد. نتايج بررسي‌هاي به عمل آمده در اجراي اين طرح، نشان داد كه با فراهم آمدن امكانات و تجهيزات مناسب، توليد نيمه صنعتي گياهان به روش ريزازدیادي قابل حصول است. اين نتايج براي نخستين بار و در ايران در چارچوب اجراي پروژه ملي شماره ۱۲٤۲ مصوب شوراي پژوهش‌هاي علمي كشور به دست آمده است.

در اجراي اين طرح، يافته‌های زير براي نخستين بار در ايران به دست آمد: ۱) دستيابي به تركيب هورموني جديد براي ازدياد درون شيشه‌اي چغندرقند، ۲) طراحي و ساخت دستگاه آبكشت و به كارگيري آن در برنامه ريزازدياد كلوني گياهان در ايران و ۳) فراهم نمودن پارامترهاي فتو اتوتروفيسم مؤثر در تطبيق‌پذيري ريزگياه‌چه‌هاي چغندرقند.

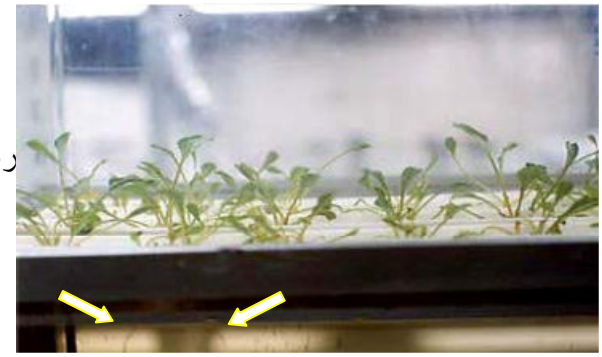
شكل۱ ازدياد ريزجوانه در محيط A

Fig. 1 Shoot multiplication in medium A



شکل ۲ ازدیاد ریزجوانه در محیط PII

Fig. 2 Shoot multiplication in medium PII



شکل ۳ ریشه‌زایی طبیعی ریزگیاهچه‌ها 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 کلون‌های چغندرقند در شرایط گلخانه

Fig . 5 Established sugar beet clones in greenhouse

منابع مورد استفاده:

References:

احساني مقدم، ب. ۱۳۷۷. استفاده از آب در انتقال گياهان چغندرقند از شرايط *in vitro* به خاك. گزارش كوتاه، مجله چغندرقند. جلد۱٤ :۱۱٥.

مصباح، م. ۱۳۷۰. بررسي مناسبترين روش ازدياد غير جنسي *in vitro*ژنوتيپهاي مختلف چغندرقند (جنس *Beta*)، پايان‌نامه كارشناسی ارشد. دانشكده كشاورزي. دانشگاه تهران.

ياوري ن. و م. مصباح. ۱۳٦۸. معرفي تكنيك كشت بافت گياهي *in vitro* و ازدياد كلوني ژنوتيپهاي برگزيده چغندرقند. مؤسسه تحقيقات چغندرقند. كرج. ۲۰ صفحه.

ياوري، ن. و س. ي. صادقيان. ۱۳۷٥. كاربرد فنون كشت « درون شيشه» در بهنژادي چغندرقند، موسسه تحقيقات چغندرقند. كرج.

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, 60th IIRB congress 30th June – 4th July – Cambridge. England. p 110