دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تأثیر دو نوع هورمون سیتوکینین بر باززایی مستقیم ریزنمونه‌های مختلف گیاه چغندرقند در شرایط کشت بافت

میترا زمانی‌فر[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲] و احمد اسماعیلی[۳]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه لرستان
۲- دانشیار، دانشگاه لرستان (نویسنده مسوول: nazarian.f@lu.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۳

چکیده

استفاده از راهکارهای ژنتیک مولکولی، نوید مبارزه با تنش‌های زنده و غیرزنده گیاهی را می‌دهد. چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان بدقلق از نظر پذیرش روش‌های دست‌ورزی مولکولی به‌خصوص کشت بافت است. به‌منظور بررسی و بهینه‌سازی کشت بافت چغندرقند برای بیان سامانه‌های ژنی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل ۲×۲×۳ با ۱۲ ترکیب تیماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار و در هر تکرار ۱۰ ریزنمونه، در آزمایشگاه انجام شد. فاکتورهای این آزمایش سه نوع ریزنمونه‌ی پهنک برگ، دمبرگ و جوانه‌ی رأسی، دو محیط کشت A (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون kinetin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA) و محیط کشت B (۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون kinetin و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA) و دو لاین چغندرقند (SBSI-04 و SBSI-02) بودند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های درصد جوانه‌زنی نشان داد که اثر نوع ریزنمونه، لاین و اثر متقابل ریزنمونه×لاین روی درصد جوانه‌زنی معنی‌دار (P≤0.01) گردید. با توجه به نتایج مقایسات میانگین به روش دانکن (P≤0.01)، ریزنمونه‌ی جوانه‌ی رأسی در هر دو لاین با ریزنمونه‌ی پهنک لاین SBSI-04 تفاوت معنی‌داری از نظر درصد تولید جوانه نداشتند. همچنین، تفاوت معنی‌داری (P≤0.05) بین درصد جوانه‌زایی ریزنمونه‌ی پهنک لاین SBSI-02 با ریزنمونه‌ی دمبرگ لاین SBSI-04 وجود نداشت. به‌علاوه، ریزنمونه‌ی دمبرگ لاین SBSI-02 با تولید کمترین درصد جوانه با سایر ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌داری (P≤0.05) داشت.

واژه‌های کلیدی: جوانه رأسی، کشت‌بافت، چغندرقند، لاین

مقدمه

چغندرقند مهم‌ترین گیاه تولید کننده‌ی شکر است که در مناطق معتدل کشت می‌شود و در حدود ۴۰درصد شکر کل جهان را تأمین می‌کند (۲). علاوه بر شکر، چغندرقند به دلیل تولید مقادیر قابل توجهی برگ و ملاس به عنوان غذای حیوانات و همچنین توانایی تجمع مواد یا متابولیت‌های ارزشمند در بافت‌های ذخیره‌ای (بیوراکتور سبز) از ارزش بالایی برخوردار است. در کنار عدم امکان گلدهی و تولید بذر، بهره‌وری محصول به دلیل آسیب‌های گسترده‌ی ناشی از عوامل بیماری‌زا بالا است. همچنین از آنجا که چغندرقند گیاهی دو ساله است و رقم‌های کنونی بسیار هتروزیگوت و به‌طور طبیعی دگرگرده‌افشان هستند، توسعه‌ی رقم‌های جدید توسط روش‌های متداول بهنژادی بسیار دشوار است (۲). بنابراین، راهکارهای بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک می‌تواند در معرفی صفات خاص در ژنوتیپ‌های با ارزش تجاری مؤثر باشند (۴). بهبود ژنتیکی چغندرقند غالباً به روش‌های بهنژادی کلاسیک صورت می‌گیرد، اما در دو دهه‌ی گذشته استفاده از تکنیک‌های مولکولی، به‌خصوص فن‌آوری‌های انتقال ژن، به شدت افزایش یافته است (۴۴،۲،۳،۷،۸،۲۷). یکی از اولین پیش‌شرط‌های تولید گیاهان تراریخت، استفاده از فنون کشت سلول و بافت برای تولید سلول‌های تراریخت بافت، اندام و در نهایت گیاه کامل است (۳۷). لازمه‌ی هر نوع روش انتقال ژنی، کشت سلول، بافت و یا اندام‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی است. همه‌ی گیاهان و ریزنمونه‌ها در پاسخ به اعمال شرایط مصنوعی کشت بافت یکسان عمل نمی‌کنند. برخی از گیاهان به‌راحتی در محیط کشت بافت، گیاهچه تولید کرده و برخی دیگر اصطلاحاً مقاوم یا ریکالسیترانت[۱] هستند. چغندرقند یکی از گونه‌های مقاوم از نظر کشت بافت و تراریزش ژنتیکی است (۴۲،۲۷،۱۲).

به دلیل اهمیت مهندسی ژنتیک گیاه چغندرقند، روش‌های تراریزش DNA، عمدتاً به دلیل مشکلات تکنیکی در باززایی گیاه از سلول‌های دارای قابلیت تراریزش محدود است. مروری بر اطلاعات موجود نشان می‌دهد که یکی از موانع مهم در تراریزش این گیاه میزان کم باززایی مستقیم گیاه تراریخت از قطعات ریزنمونه می‌باشد. عمده‌ترین علل چنین رفتاری ممکن است ناشی از محدودیت ریزنمونه‌ها، میزان باززایی کم و وابسته بودن تولید گیاهچه‌ها به ژنوتیپ باشد (۶،۱۱،۲۳،۲۹ و ۳). از ریزنمونه‌های مختلفی از جمله کوتیلدون (۲۶،۲۳)، هیپوکوتیل (۲۱)، کالوس جنین‌زا (۴۰، ۴۷)، برگ (۴۵) برای تراریزش چغندرقند استفاده شده است. اکثراً باززایی گیاه از این ریزنمونه‌ها به صورت غیرمستقیم و شامل فاز کالوس بوده است که این امر در پاره‌ای از مواقع باعث ایجاد تنوع سوماکلونی می‌شود. به همین منظور از روش باززایی مستقیم به دلیل سهولت تهیه ریزنمونه، کاهش زمان و قابلیت باززایی بالا استفاده می‌شود (۲۴). تراریزش هر گیاهی و از آن جمله چغندرقند ضمن پایین بودن کارایی، سبب ایجاد مشکلاتی برای سلول‌های در حال باززایی شده و در نهایت کارایی تولید گیاهچه‌های تراریخت را به شدت

1- Recalcitrant

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-21]

کاهش می‌دهد. تلاش‌های انجام شده برای ترازیزش غندرقند با استفاده از اگروباکتریوم موفقیت کمی داشته است. هارپستر و همکاران (۱۸) و کرنز و همکاران (۲۶) کالوس‌های ترازیزش شده‌ی اگروباکتریوم تومفاسینس را به‌دست آوردند. با این حال آن‌ها نتوانستند از این کالوس‌ها گیاه تولید کنند. لیندسی و گالویس (۲۹) تولید گیاهان چغندرقند تراریخت را پس از ترازیزش با اگروباکتریوم تومفاسینس و باززایی از پایه‌ی ساقه را گزارش کردند. بر اساس این مطالعه ریزنمونه‌ی ساقه در مقایسه با دمبرگ و بافت برگ توانایی باززایی سریع و بیشتر را نشان داد. در مطالعات روی باززایی چغندرقند از انواع مختلف ریزنمونه با هر دو روش باززایی مستقیم و غیرمستقیم استفاده می‌شود. باززایی مستقیم سودمندتر از باززایی غیرمستقیم است زیرا گیاهان حاصل از این روش دارای ثبات ژنتیکی بالایی هستند (۱،۹،۱۰،۱۹،۳۲). فراوانی باززایی ساقه از سلول‌های سوماتیک و بافت واریانت‌های مختلف چغندرقند بسته به نوع ریزنمونه، ترکیب محیط کشت و ژنوتیپ متفاوت است (۳۴).

به منظور توسعه‌ی روشی برای بدست آوردن گیاه چغندرقند با باززایی مستقیم، بدون مرحله‌ی کالوس، انواع مختلف جداکشت‌ها شامل سلول‌های مریستمی توانا در باززایی ساقه در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳،۱۴،۲۵،۴۳). در این مطالعات برای باززایی مستقیم شاخساره، از دمبرگ (۱۳ و ۲۵)، کوتیلدون (۱۴)، برگ‌ها (۳)، گره‌های لپه (۲۵) و لایه‌ی نازک تشکیل شده اپیکوتیل (۴۳) استفاده شده است. فراوانی باززایی در این آزمایشات بسته به نوع ریزنمونه، ژنوتیپ و ترکیب محیط کشت متفاوت بوده است (۳۴). هدف از اجرای این تحقیق، مطالعه‌ی چگونگی عکس‌العمل ریزنمونه‌های متفاوت و تأثیر ترکیبات دو نوع سیتوکینین بر فراوانی تولید جوانه‌های جوان روی ریزنمونه‌های مختلف در دو لاین SBSI-04 و SBSI-02 از گیاه چغندرقند است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از دو ژنوتیپ چغندرقند به نام‌های SBSI-04 و SBSI-02 استفاده شد. این دو ژنوتیپ، لاین‌هایی هستند که به عنوان بهترین لاین‌های والدی برای تولید بذر هیبرید در کشور از آن‌ها استفاده می‌شود. برای تولید گیاهچه‌های استریل، از روش نوروزی (۲۴و۳۶) استفاده شد. به‌طور خلاصه: بذرها در محلول اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۳۰ دقیقه تیمار گردیدند. بذرها پس از شستشو در آب و تیمار با الکل ۷۰ درصد، به مدت یک دقیقه، با آب مقطرشستشو شدند. پس از آن بذور با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و بار دیگر برای زدودن باقیمانده‌ی مواد ضدعفونی کننده، سه بار با آب مقطر هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. بذرها جهت ریشه‌دار شدن بر روی کاغذ صافی استریل درون پتری‌دیش در تاریکی قرار داده شدند. بعد از ۲ روز، بذور ریشه‌دار به محیط آب آگار برای تولید گیاهچه منتقل شدند. پس از گذشت یک هفته، قسمت کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه بذور جوانه زده حذف شد و جوانه انتهایی جهت تولید گیاهچه و برگ جوانه‌دار در محیط مصنوعی شامل محیط پایه MS (Murashing & Skoog) و ساکارز۳ درصد و آگار ۰/۸ درصد قرار داده شد. پس از گذشت ۳ هفته، مقدار مورد نیاز از محلول ذخیره‌ای تنظیم‌کننده‌های رشد (۲ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA) به محلول اضافه شد. ریزنمونه‌ها به مدت چهار هفته و هر دو هفته یک بار واکشت شدند. پس از تولید جوانه روی سطح برگ‌ها، ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های تولیدی تهیه شدند. یک آزمایش فاکتوریل ۲×۲×۳ با ۱۲ ترکیب تیماری در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و در هر تکرار ۱۰ ریزنمونه در آزمایشگاه اجرا شد. سه نوع ریزنمونه‌ی پهنک برگ، دمبرگ و جوانه‌ی رأسی، دو محیط کشت A (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون kinetin و ۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA) و B(۱ میلی‌گرم بر لیتر هورمون kinetin و ۵/ ۰میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA) و دو لاین چغندرقند (SBSI-04 و SBSI-02) فاکتورهای این آزمایش بودند. ریزنمونه‌ها به مدت شش هفته و هر دو هفته یک بار واکشت شدند. سپس تعداد جوانه‌های تولیدی شمارش و مورد مقایسه قرار گرفتند. صفت تعداد جوانه‌های تولیدی پس از بررسی آزمون توزیع نرمال داده‌ها (تبدیل لگاریتمی) با نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین‌ها در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح معنی‌دار مربوط با هم مقایسه شدند.

نتایج و بحث

استفاده از روش‌های کشت بافت و سلول از دستاوردهای بیوتکنولوژی است (۳۸). تولید گیاهچه، به‌خصوص گیاهچه-های تراریخت پس از عمل ترازیزش در چغندرقند با چالش مواجه است. کشت بافت ریزنمونه‌ها در هر دو محیط کشت منجر به ظهور جوانه‌هایی شد که می‌توان از آن‌ها برای انجام ترازیزش و تولید گیاهان تراریخت با استفاده از اگروباکتریوم و یا تفنگ ژنی استفاده کرد (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از شمارش، درصد تولید جوانه را نشان داد که نوع ریزنمونه، لاین و اثر متقابل ریزنمونه×لاین روی درصد جوانه‌زنی معنی‌دار ($P\leq0.01$) گردید (جدول ۱). همانطور که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، سایر اثرات ساده، دو جانبه و سه جانبه معنی‌دار نشدند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-21]

شکل ۱- تولید جوانه روی ریزنمونه‌های مختلف پس از اعمال تیمار هورمون‌های رشد. (A) جوانه‌ی تشکیل شده روی ریزنمونه‌ی دمبرگ. (B) تشکیل جوانه از جوانه‌های رأسی و C) (تولید جوانه روی پهنک برگ، پیکان‌ها جوانه‌های تولید شده را نشان می‌دهند.

Figure 1. Shoot formation on different explants after being treated with phytohormones. (A) Petiole (B) Shoot apex and (C) Leaf blade. Arow heads show regenerated new shoots

جدول ۱- تجزیه واریانس صفت باززایی ریزنمونه‌ها

Table 1. Analysis of variance for plantlet regeneration in sugar beet plants

منبع تغییرات	درجه‌ی آزادی	میانگین مربعات
ریزنمونه	۲	۳۰/۵۸**
محیط	۱	۰/۰۸^{ns}
محیط×ریزنمونه	۲	۰/۵۸^{ns}
لاین	۱	۸/۳۳**
لاین×ریزنمونه	۲	۲/۰۸**
لاین×محیط	۱	۰/۰۰۷^{ns}
محیط×لاین×ریزنمونه	۲	۰/۲۵^{ns}
خطا	۳۶	۰/۱۸
کل	۴۷	
CV	۱۴	

ns و**: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱ درصد

جدول ۲- مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل ریزنمونه× لاین

Table 2. Mean analysis of line × explant

ریزنمونه	لاین	میانگین
جوانه‌ی رأسی	SBSI–02	۹^{a}
	SBSI–04	۹^{a}
پهنک برگ	SBSI–04	۸/۵^{a}
	SBSI–02	۷/۲۵^{b}
دمبرگ	SBSI–04	۶/۸۷^{D}
	SBSI–02	۵/۶۲^{c}

میانگین های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل ریزنمونه × لاین به کمک آزمون دانکن (P≤0. 01) در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود، ریزنمونه‌ی جوانه‌ی رأسی در هر دو لاین با ریزنمونه‌ی پهنک لاین SBSI-04 تفاوت معنی‌داری از نظر درصد تولید جوانه با هم ندارند. ریزنمونه‌ی پهنک لاین SBSI-02 با ریزنمونه‌ی دمبرگ لاین SBSI-04 تفاوت معنی‌داری با هم ندارند (P≤0.05). همچنین ریزنمونه‌ی دمبرگ لاین SBSI-02 با تولید کمترین درصد تولید جوانه با سایر ریزنمونه‌ها اختلاف معنی‌داری (P≤0.01) دارد. با توجه به نتایج جدول ۲ ریزنمونه‌ی جوانه‌ی رأسی صرف نظر از نوع لاین در دو محیط بهترین درصد جوانه‌زنی را نشان داد.

مقایسه‌ی نتایج مطالعه‌ی حاضر با تحقیقات میکامی و همکاران (۳۱) مبنی بر کشت مریستم انتهایی گیاه در محیط حاوی ۲/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA، تولید ۴۸ درصد جوانه نشان می‌دهد. با افزودن هورمون Kinetin علاوه بر BA، میزان جوانه‌زایی افزایش یافت. همچنین بر اساس نتایج نوروزی و همکاران (۳۷) جوانه‌ی رویشی حاصل از کشت دمبرگ در ترکیب هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حالت طبیعی داشته و اکثراً از نواحی برش یافته‌ی نزدیک به مریستم رأسی ظاهر شده بودند. به نظر می‌رسد این منطقه دارای سلول‌های با قابلیت بازگشت به حالت مریستمی و باززایی بیشتری باشد. همچنین نتایج این محققان نشان داد که هورمون تعیین‌کننده‌ی جوانه‌زنی از برگ، هورمون BA به همراه غلظت‌های متفاوتی از NAA می‌باشد و جوانه‌های رویشی به‌طور عمده روی سطح فوقانی برگ و در نواحی نزدیک به محل اتصال دمبرگ به پهنک تولید شده بود. در مطالعه‌ی حاضر نیز وجود هورمون BA در هر دو محیط کشت باعث تولید جوانه‌های رویشی بر روی سطح فوقانی برگ و در نواحی نزدیک به محل اتصال دمبرگ به پهنک ریزنمونه‌ی برگ گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که بافت‌های با تمایز کمتر، پتانسیل بیشتری برای باززایی دارند و می‌توان با استفاده از سیتوکینین‌هایی نظیر BA فرآیند تمایز بافتی را تحریک نمود. ژانگ و همکاران (۴۸) گزارش دادند که ریزنمونه‌های دمبرگ دو رقم چغندرقند پس از اعمال تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-21]

بیشترین باززایی شاخه را نشان داد، این در حالی است که ریزنمونه‌های تیمار شده با Kinetin باززایی کمی را نشان دادند. دلیل اختلاف نتایج مطالعه‌ی حاضر با نتایج آزمایش ژانگ و همکاران را می‌توان در توانایی بالاتر جوانه‌ی رأسی در تولید جوانه‌های جدید جستجو کرد. استفاده از مقادیر هورمون‌های گروه سیتوکینین از جمله کینتین در مطالعه‌ی حاضر می‌تواند در القای تولید جوانه‌ها مؤثر باشد. همسو با نتایج این مطالعه بخیت و همکارن (۴) نیز بالاترین درصد اندام‌زایی مستقیم را از کشت ریزنمونه‌ی پایه‌ی جوانه بدست آوردند. با توجه به نوع تنظیم‌کننده‌های اضافه شده به محیط کشت، سیتوکینین (BA , Kinetin) در ترکیب با NAA بیشترین اثر را روی باززایی مستقیم از ریزنمونه‌ی جوانه‌ی رأسی (۹۳درصد) در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون NAA نشان داد. در آزمایش حاضر بیشترین باززایی مربوط به ریزنمونه‌ی جوانه‌ی رأسی و در هر دو محیط A وB بود. از آن‌جا که سیتوکینین‌ها نقش مهمی در القاء ساقه دارند، احتمالاً این موضوع بدون نیاز به اکسین‌ها سبب باززایی مستقیم شده است. مطالعات نشان می‌دهد که باززایی شاخه از دمبرگ به نوع ژنوتیپ وابسته است (۳۴). نتایج این مطالعه درستی این نتیجه را نشان داد زیرا نوع ریزنمونه روی میزان تولید جوانه تأثیر معنی‌داری داشت و ثابت نمود که برای تولید گیاهچه‌ی جدید و در نتیجه استفاده از آن‌ها، جوانه‌ی رأسی کارایی بیشتری دارد. نتایج خادمی و نظریان (۲۴) نشان داد که بیشترین جوانه تولیدی در لاین‌های SBSI-04 و SBSI-02 به ترتیب در سطوح هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از بنزیل آدنین (BA) تولید شدند. همچنین از نظر صفت نسبت تعداد جوانه به برگ، لاین SBSI-04 در سطح ۲ میلی‌گرم بر لیتر و در مرتبه بعدی لاین SBSI-02 در سطح ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA بیشترین جوانه‌ها را تولید نمودند. به طور کلی لاین SBSI-04 بیشترین قابلیت القاء جوانه بر روی برگ را نشان داد. با این حال، این نتایج در تضاد با نتایج قبلی ما است.

نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی مربوط به ریزنمونه‌ی جوانه‌ی رأسی، پس از آن مربوط به پهنک و دمبرگ است. این اختلاف نتایج بین جوانه‌زنی پهنک و دمبرگ را می‌توان به ترکیب محیط کشت و وجود اکسین ذاتی در برخی از ریزنمونه‌ها مرتبط دانست.

به‌طور کلی مقایسه نتایج این مطالعه با تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که درصد باززایی و تولید جوانه‌ها به نوع ریزنمونه، ژنوتیپ و محیط کشت بستگی دارد. یکی دیگر از عوامل تأثیرگذار بر موفقیت تولید گیاهچه و باززایی، شرایط فیزیکی گیاه است، به طوری که بافت‌های جوانتر عکس‌العمل بهتری در مقایسه با بافت‌های مسن‌تر از خود نشان می‌دهند (۴۶،۳۳،۲۸،۲۲،۱۷،۱۶،۱۵،۵،۴۰،۴۱). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از ریزنمونه‌های برگ حاوی پایه جوانه می‌توان برای انجام تراریزش چغندرقند استفاده کرد. دلیل این امر می‌تواند مزیت‌هایی چون سادگی تهیه، منبع قابل دسترسی و دائمی با قابلیت باززایی بالا، کاهش زمان لازم برای باززایی جوانه‌ها به دلیل باززایی مستقیم و نیز به حداقل رسیدن تنوع سوماکلونی به دلیل نداشتن فاز کالوس و نیز جوان بودن این ریزنمونه برشمرد. با این حال، این احتمال هم وجود دارد که تعادل هورمون‌ها در این مورد حائز اهمیت باشد (۳۹).

منابع

1. Atanassov, A. 1980. Method for continuous bud formation in tissue cultures of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung, 84: 23-29.
2. Atanassov, A. 1986. Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. 2: 46-47.
3. Bannikova, M. A. , A.E. Golovko, O.A. Khvedynich, N.V. Kuchuk and Y. Gleba. 1994. *In Vitro* Organogenesis and Protoplast Cultivation of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). Cell Biology International, 18: 546.
4. Bekheet, S., H. Taha, I. Usama and M. Matter. 2007. *In vitro* regeneration of sugar beet propagules and molecular analysis of the Regenerants. Plant Biotechnology, 10: 321-332.
5. Bhat, S., B. Ford-Lloyd and J. Callow. 1985. Isolation of protoplasts and regeneration of callus from suspension cultures of cultivated beets. Plant Cell Reports, 4: 348-350.
6. Brears, T., G. Curtis and D. Lonsdale. 1989. A specific rearrangement of mitochondrial DNA induced by tissue culture. Theoretical and Applied Genetics, 77: 620-624.
7. Cai, D. , M. Kleine, S. Kifle, H.J. Harloff, N.N. Sandal, K.A. Marcker, R.M. Klein-Lankhorst, E.M. Salentijn, W. Lange and W.J. Stiekema. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Science, 275: 832-834.
8. D'Halluin, K., M. Bossut, E. Bonne, B. Mazur, J. Leemans and J. Botterman. 1992. Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. Nat. Biotechnol, 10: 309-314.
9. Detrez, C., R. Sangwan and B. Sangwan-Norreel. 1989. Phenotypic and karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture. Theoretical and Applied Genetics, 77: 462-468.
10. Detrez, C., T. Tetu, R. Sangwan and B. Sangwan-Norreel. 1988. Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured in vitro. Journal of experimental botany, 39: 917-926.
11. Ehlers, U., U. Commandeur, R. Frank, J. Landsmann, R. Koenig and W. Burgermeister. 1991. Cloning of the coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy roots. Theoretical and applied genetics, 81: 777-782.
12. Elliott, M., D. Chen, M. Fowler, M. Kirby, M. Kubalakova, N. Scott, C. Zhang and A. Slater. 1996. Towards the perfect sugar beet via gene manipulation. Sugar Crops China, 1: 23-30.
13. Freytag , A., S. Anand, A. Rao-Arelli and L. Owens. 1988. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris L*. in vitro. Plant Cell Reports, 7: 30-34.
14. Fry, J., A. Barnason and M. Hinchee. 1991. Genotype-independent transformation of sugarbeet using Agrobacterium tumefaciens, In: Molecular biology of plant growth and development. Third International Congress of the International Society for Plant Molecular Biology. Tucson, AZ, USA, 84p.
15. Gurel, E. 1997. Callus and Root Development from Leaf Explants of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.): Variability at Variety, Plant and Organ Level. Turkish Journal of Botany, 21: 131-136.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-21]

16. Gurel, E. 1991. Callus development and organogenesis in cultured leaf explants 0f sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Ph. D thesis, University of Leeds, UK.
17. Gurel, E. and M. Wren. 1995. Measuring polyphenol oxidase activity in small leaf discs of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Turkish Journal of Botany, 19: 497-502.
18. Harpster, M.H., J.A. Townsend, J.D. Jones, J. Bedbrook and P. Dunsmuir. 1988. Relative strengths of the 35S califlower mosaic virus, 1′, 2′, and nopaline synthase promoters in transformed tobacco sugarbeet and oilseed rape callus tissue. Mol. Gen. Genet, 212: 182-190.
19. Hussey, G. and A. Hepher. 1978. Clonal propagation of sugar beet plants and the formation of polyploids by tissue culture. Annals of botany, 42: 477-479.
20. Ivic, S., R. Sicher and A. Smigocki. 2001. Growth habit and sugar accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) transformed with a cytokinin biosynthesis gene. Plant Cell Reports, 20: 770-773.
21. Jacq, B., O. Lesobre, R.S. Sangwan and B.S. Sangwan-Norreel. 1993. Factors influencing T-DNA transfer in Agrobacterium-mediated transformation of sugarbeet. Plant Cell Reports, 12: 621-624.
22. Jacq, B., T. Tétu, R.S. Sangwan, A. De Laat and B.S. Sangwan-Norreel. 1992. Plant regeneration from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). hypocotyls cultured in vitro and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants. Plant cell reports, 11: 329-333.
23. Joersbo, M., I. Donaldson, J. Kreiberg, S.G. Petersen, J. Brunstedt and F.T. Okkels. 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. Molecular Breeding, 4: 111-117.
24. Khademi, M. and F. Nazarian firouzabadi. 2013. The influence of two types of hormones on appearance of shoot base explants in sugar beet (*Beta vularis* L.). Biotechnology in Agriculture, 12.
25. Krens, F. and D. Jamar. 1989. The Role of Explant Source and Culture Conditions on Callus Induction and Shoot Regeneration in Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Journal of Plant Physiology, 134: 651-655.
26. Krens, F., C. Zijlstra, W. vd Molen, D. Jamar and H. Huizing. 1988. Transformation and regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) induced by 'shooter'mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. Euphytica, 39: 185-194.
27. Krens, F. A., A. Trifonova, L. Paul Keizer and R.D. Hall. 1996. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugar beet (Beta *vulgaris* L.). Plant Science, 116: 97-106.
28. Kuykendall, L.D., T. M. Stockett and J.W. Saunders. 2003. Rhizobium radiobacter conjugation and callus-independent shoot regeneration used to introduce the cercosporin export gene cfp from Cercospora into sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Biotechnol. Lett, 25: 739-744.
29. Lindsey, K. and P. Gallois. 1990. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris*) by Agrobacterium tumefaciens. Journal of experimental botany, 41: 529-536.
30. Mannerlöf, M., S. Tuvesson, P. Steen and P. Tenning. 1997. Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. Euphytica, 94: 83-91.
31. Mikami, T., T. Kinoshita and H. Saito. 1985. Clonal propagation of sugar beet plants by apical meristem culture. Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University, 62: 325-331.
32. Mikami, T., R. Sudoh, E. Nagao and T. Kinoshita. 1989a. Genotypic variation in the in vitro morphogenesis from leaf explants of *Beta vulgaris* L. and *B. maritima* L. Euphytica, 40: 271-273.
33. Mikami, T., Y. Yanai and T. Kinoshita. 1989b. High frequency of organogenesis in leaflet culture of sugar beet. Proc. of the Japanese Society of Sugar Beet Technol, 31: 145-150.
34. Mishutkina, Y.V. and A. Gaponenko. 2006. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) morphogenesis in vitro: effects of phytohormone type and concentration in the culture medium, type of explants ,and plant genotype on shoot regeneration frequency. Russian Journal of Genetics, 42: 150-157.
35. Nissen, O. 1989. MSTATC Users Guide. Michigan State University.
36. Norouzi, P., M.A. Malboobi, K. Zamani and H. Yazdi-Samadi. 2005. Using a competent tissue for efficient transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 41: 11-16.
37. Norouzi, P., M.A. Malboobi and H. Yazdi-Samadi. 1992. Effect of plant hormones on direct regeneration of sugar beet explants. Agronomic in Iran, 33: 233-239.
38. Norouzi, P. 2012. Regeneration and Transformation of Haploid Leaf and Embryogenic Tissues Derived from Ovule Culture in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). Journal of Crop Breeding, 4: 63-79.
39. Sadeghian, S., Ranjbar, G.A. and S.K. Kazemitabar. 2014. Consideration and Selection of Suitable Hormonal Composition for in vitro Shoot Regeneration and Propagation of Ocimum basilicum LJournal of Crop Breeding 6: 40-48.
40. Saunders, J. and W. Doley. 1986. One Step Shoot Regeneration from Callus of Whole Plant Leaf Explants of Sugarbeet Lines and a Somaclonal Variant for *in vitro* Behavior. Journal of plant physiology, 124:473-479.
41. Saunders, J. and K. Shin. 1986. Germplasm and physiologic effects on induction of high-frequency hormone autonomous callus and subsequent shoot regeneration in sugarbeet. Crop science, 26: 1240-1245.
42. Snyder, G., J. Ingersoll, A. Smigocki and L. Owens. 1999. Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by Agrobacterium or particle bombardment. Plant Cell Reports. 18: 829-834.
43. Tenning, P., E. Wremerth Weich, U.B. Kjärsgaard, M.A. Lelu and M. Nihlgård. 1992. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of sugar beet (Beta *vulgaris* L.). Plant Sci. 81: 103-109.
44. Tetu, T., R. Sangwan and B. Sangwan-Norreel. 1987. Hormonal Control of Organogenesis and Somatic Embryogenesis inBeta vulgarisCallus. Journal of experimental botany, 38: 506-517.
45. Toldi, O., G. Gyulai, J. Kiss, I.A. Tamas and E. Balazs. 1996. Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Reports, 15: 851-854.
46. Trifonova, A. and A. Atanassov. 1995. Genetic transformation of sugar beet by *Agrobacterium rhizogenes*. Biotechnology and Biotechnological equipment, 9: 23-26.
47. Wozniak ,C. A. and L.D. Owens. 1994. Native β-glucuronidase activity in sugarbeet *(Beta vulgaris)*. Physiologia Plantarum, 90: 763-771.
48. Zhang, C.L., D.F. Chen, M. C. Elliott and A. Slater. 2001. Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 37: 305-310.
49. Zhang, C., D. Chen, A. McCormac, N. Scott, M. Elliott and A. Slater. 2001. Use of the GFP reporter as a vital marker for Agrobacterium-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Molecular biotechnology, 17: 109-117.
50. Zhong, Z., H.G. Smith and T.H. Thomas. 1993. In vitro culture of petioles and intact leaves of sugar beet (*Beta vulgaris*). Plant growth regulation, 12: 59-66.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-21]

Comparative Study of two Different Cytokinins on Direct Regeneration of Different Sugar beet Explants in Tissue Culture Condition

Mitra Zamanifar[1], Farhad Nazarian Firouzabadi[2] and Ahmad Ismaili[3]

1 and 3- M.Sc. Student and Associate Professor, Lorestan University
2- Associate Professor, Lorestan University (Corresponding author: nazarian.f@lu.ac.ir)
Received: March 8, 2015 Accepted: July 25, 2015

Abstract

Molecular genetic techniques hold great promise to battle various plant biotic and abiotic stresses. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is an important recalcitrant crop plants in terms of applying genetic engineering techniques, especially transformation. In an attempt to investigate and optimize sugar beet tissue culture for plant transformation, a 3×2×2 factorial experiment in a completely randomized design with 4 replicates and 10 explants each, was performed in the laboratory. The factors were three types of explants including, Lamina, petiole and shoot base buds, two types of media, namely A (Kinetin 1mgL^{-1}, BA 0. 5mgL^{-1}) and B (Kinetin 0. 5mgL^{-1}, BA 1mgL^{-1}) and two sugar beet (SBSI-04 and SBSI-02) lines. Results of analysis of variance on percentage of germination showed that the effect of type of explant, line and explant × line interaction were highly significant (P≤0. 01). Duncan's multiple-range test (P≤0. 01), was used to compare the mean values. Result of mean analysis showed that there was no significant difference between shoot base buds of both line with that of SBSI-04 lamina. Furthermore, there was no significant (P≥0. 05) difference between lamina from SBSI-04 and that of SBSI-02 line. Lamina explants from SBSI-04 showed the lowest percentage of shoot base buds production in comparison to other explants.

Keywords: Cloning, Glucansucrases, Mutansucrase, Shoot tip

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-04-21]