



## باززایی و تراریختی در برگ و بافت جنین‌زای هاپلوئید حاصل از کشت تخمک چغندر قند

ب. نوروزی<sup>۱</sup>

۱- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند نویسنده مسوول: Norouzi1389@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰

### چکیده

به منظور استفاده از بافت هاپلوئیدی گیاه چغندر قند برای تولید گیاهان تراریخته خالص از نظر ژن انتقالی، ابتدا یک سری آزمایش برای تکثیر و جوانه‌زایی جنین‌های هاپلوئید حاصل از کشت تخمک انجام گرفت. بدین ترتیب مشخص گردید که محیط کشت پایه MSB یا PGoB به همراه ۳ درصد ساکارز با ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA) می‌تواند برای تکثیر جنین‌های هاپلوئید و محیط کشت پایه MSB نصف غلظت به همراه یک درصد ساکارز برای تکامل جنین‌ها و تولید جوانه به کار رود. همچنین برای تولید جوانه رویشی از برگ هاپلوئید از محیط کشت PGoB حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA و یکی میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده گردید. پس از انجام آزمون‌های فوق از کالوس‌های جنین‌زا و نیز برگ جوانه‌های حاصل از جنین هاپلوئید برای تراریختی با آگروباکتریوم تومه‌فاسینس حامل ناقل دوگانه pBI121 استفاده گردید. بافت‌های تلقیح‌شده پس از دو روز نگه‌داری در کشت توام به محیط گزینش حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین منتقل شدند. پس از ۳-۵ هفته جوانه‌های حاصل از هر دو نوع جداکشت با سنجش Gus مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که برگ و جنین هاپلوئید هر دو قابلیت زیادی در تولید جوانه‌های تراریخته دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: هاپلوئید، جنین، آگروباکتری، چغندر قند، تراریختی

### مقدمه

کشاورزی است. چغندر قند یکی از گیاهان دولپه‌ای است که دارای ارزش اقتصادی فراوانی می‌باشد و منبع اصلی قند در مناطق معتدل جهان به شمار می‌رود. با این وجود دارای افت شدید

استفاده از روش‌های کشت سلول و بافت و همچنین انتقال ژن برای ایجاد صفات مفید و اقتصادی در گیاهان از دستاوردهای مهم بیوتکنولوژی در

محصول به دلیل تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد. از آنجا که اصلاح کلاسیک آن به مدت زمانی طولانی نیاز دارد، توسعه و کاربرد روش‌های مهندسی ژنتیک در تحقیقات چغندر قند راهی جدید را برای اصلاح این گیاه در زمانی کوتاه فراهم می‌نماید. استفاده از آگروباکتري برای انتقال T-DNA حاوی ژن (های) مورد نظر به ژنوم گیاهان دولپه‌ای از روش‌های موفق ایجاد گیاهان تراریخته به شمار می‌رود (۱).

مهندسی ژنتیک چغندر قند دارای مشکلاتی تکنیکی است و بعنوان یک گیاه سرسخت نسبت به تراریختی معرفی می‌شود (۷، ۱۳، ۲۳ و ۲۴). لیندسی و گالوئیس (۱۸) از پهنک برگ حاوی پایه جوانه، هالووین و همکاران (۱۲) از کالوس جنین‌زا و سیستم آگروباکتري برای تراریختی چغندر قند استفاده کردند. هال و همکاران (۱۱) با استفاده از روش پلی اتیلن گلیکول توانستند برای اولین بار از پروتوپلاست سلولهای محافظ روزه برگ چغندر قند به منظور تراریختی استفاده نمایند. کرنز و همکاران (۱۷) از گره کوتیلودن، مانرلوف و همکاران (۲۰) از برگ‌های کوتیلودنی، اشنایدر و همکاران (۲۶) از کوتیلودن و کالوس جنین‌زای حاصل از هیپوکوتیل و پهنک برگ، بیرسین و همکاران (۴) از برگ و کالوس حاصل از برگ، ژانگ و همکاران (۲۹) از جدا کشت جوانه، هیسانو و همکاران (۱۳) از پهنک برگ حاوی پایه جوانه، نوروزی و همکاران (۲۳) از پایه جوانه و

برگ حاصل از جوانه رأسی<sup>۱</sup>، یانگ و همکاران (۲۸) از غنچه‌های گل‌آذین با سیستم آگروباکتري برای تراریختی چغندر قند استفاده کرده‌اند. ایویک-هیمز و اسمیگوکی (۱۴) از پهنک برگ به طور مستقیم در بمباران ژنی به منظور تراریختی چغندر قند استفاده کردند. به طور کلی فراوانی تراریختی در این روش‌ها از ۳ درصد (۱۱) تا ۳۰ درصد (۱۳) متغیر است و بیشترین فراوانی تراریختی و درصد باززایی گیاهان تراریخت مربوط به روش‌های استفاده از جدا کشت برگ حاصل از پایه جوانه (حاصل از کشت جوانه راسی) با سیستم انتقال ژن توسط آگروباکتري می‌باشد. دای و همکاران (۵) و جلوین (۱۰) اظهار کردند که برای تراریختی گیاهان عالی، روش انتقال ژن بواسطه آگروباکتري نسبت به روش‌های انتقال مستقیم ژن مانند تراریختی بواسطه پلی‌اتیلن گلیکول، لیپوزوم، الکتروپوریشن و تفنگ ژنی (هزینه‌بر و مشکل از لحاظ تکنیکی) به دلیل درج تعداد نسخه‌های کمتر، نوآرایی کمتر تراژن و تظاهر پایدار ژن‌های منتقل شده در نسل‌های بعدی ارجحیت دارد.

سلول‌های گیاهان هاپلوئید دارای تنها یک سری کامل از کروموزوم‌ها بوده و کاربرد آنها در برنامه‌های اصلاح نباتات که به منظور انتخاب صفات مطلوب اجرا می‌شوند، بسیار مفید واقع می‌شود. فنوتیپ گیاهان هاپلوئید عبارت از تظاهر یک نسخه از اطلاعات وراثتی است که در آن نهفتگی صفات به وسیله ژن‌های غالب وجود ندارد. در گیاه چغندر قند برای تولید

## مواد و روشها

**مواد گیاهی:** در این تحقیق از کالوس جنین‌زای هاپلوئید حاصل از کشت تخمک رگه‌گرده دهنده منوژرم ۲۶۱ چغندر قند و برگ جوانه‌های جنینی آن استفاده گردید.

**سویه آگروباکتری:** از سویه آگروباکتری C58C1 فاقد و یا واجد پلاسمید دوگانه pBI121 که در درون مرزهای T-DNA خود حامل ژن‌های گزارشگر *gus-A* و انتخابگر *npt-II* تحت کنترل پیشبر 35S-CaMV بود استفاده گردید.

**محیط‌های کشت بافت:** محیط‌های کشت پایه جهت کشت بافت‌های گیاهی MSB شامل املاح MS (۲۱) و ویتامین‌های B5 (۹) و یا PGoB تغییر یافته (۶) با ترکیبات هورمونی مختلف با ۱-۳ درصد ساکارز و حدود ۰/۸-۰/۹ درصد آگار با pH= ۵/۵-۵/۸ بودند.

**احیاء بافت‌های جنین هاپلوئید:** کالوس‌های جنین‌زا که از کشت تخمک چغندر قند توسط آزمایشگاه کشت بافت مؤسسه تحقیقات چغندر قند تهیه شده بودند پس از نگهداری طولانی مدت در محیط کشت حاوی ترکیب هورمونی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA (بنزیل آدنین) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA (نفتالن استیک اسید) قدرت جنین‌زایی آنها کاهش یافته بود و بایستی احیاء می‌شدند. این کار با انتقال بافت کالوس جنین‌زا به محیط مایع PGoB فاقد هورمون به مدت ۲ هفته و سپس

هاپلوئیدی از کشت تخمک تلقیح نشده و تولید کالوس جنین‌زای هاپلوئید استفاده می‌گردد (۲). از بافت‌های هاپلوئیدی حاصل می‌توان برای تراریختی چغندر قند استفاده نمود و پس از تولید گیاهان هاپلوئید تراریخته با استفاده از کولتیسین اقدام به مضاعف نمودن تعداد کروموزم‌ها و تولید گیاه کاملاً خالص دابل هاپلوئید نمود که از نظر کلیه آلل‌های ژن‌ها از جمله ژن جدید وارد شده در نسل اول یکسان هستند. برای دستیابی به ژنوتیپ خالص ژن وارد شده نیازی به انتخاب در نسل‌های تفکیک نمی‌باشد. بدین ترتیب عملاً زمان صرف شده برای اعمال روش‌های اصلاحی در تولید گیاه تراریخته مورد نظر کاهش می‌یابد (۱). در منابع چغندر قند تا به حال گزارشی مبنی بر تراریختی بافت هاپلوئید دیده نشده است، ولیکن از کالوس جنین‌زای دیپلوئید چغندر قند برای تراریختی استفاده شده است (۱۲، ۱۹ و ۲۶).

در این تحقیق پس از دریافت بافت‌های جنین‌زای هاپلوئید حاصل از کشت تخمک از آزمایشگاه کشت بافت مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، ابتدا یک سری آزمون جوانه‌زایی و سپس تراریختی بافت‌های جنین‌زا و برگ جوانه هاپلوئید با آگروباکتریوم تومه‌فاسینس صورت گرفته است.

جیبرلیک اسید ( $GA_3$ ) طراحی گردید (جدول ۱). سپس بافتهای جنینی به این محیطها منتقل گردیدند. محیط کشت پایه برای ۶ تیمار شامل PGoB با ۳ درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار بود. نمونه‌های فوق پس از ۲ هفته به محیط تازه مشابه منتقل شدند و در این زمان مشاهدات میکروسکوپی از وضعیت جنین‌زایی صورت گرفت و نتایج پس از یک ماه از شروع کشت مشاهده و یادداشت برداری گردید.

انتقال آنها به محیط جامد دارای ترکیب هورمونی اولیه ( $0/2 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA} + 0/5 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$ ) صورت گرفت.

تیمار هورمونی برای تکثیر بافتهای جنینی: به منظور تعیین ترکیب هورمونی مناسب برای تولید جنین‌های ثانویه از بافتهای جنینی رشد یافته در محیط کشت حاوی  $0/2 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA} + 0/5 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA}$  در ۶ تیمار حاوی ترکیبات هورمونی NAA, BA و

جدول ۱- بررسی اثر ترکیبات هورمونی بر تکثیر بافتهای جنین‌زای هاپلوئید رگه ۲۶۱ چغندر قند پس از یک ماه رشد در محیط کشت PGoB با سه درصد ساکارز

وضعیت تمایز بافت‌ها	میزان رشد و تکثیر توده‌های کالوس جنین‌زا	ترکیب هورمونی (میلی‌گرم در لیتر)			تیمار
		$GA_3$	NAA	BA	
سه جوانه سبز مجتمع	متوسط	۰	۰	۰	۱
بافتهای سبز تمایز یافته زیاد	زیاد	۰	۰	۰/۲	۲
بافتهای سبز تمایز یافته زیاد	کم	۰	۰/۲	۰/۲	۳
مراحل مختلف تکامل جنین تا جوانه جنینی	متوسط	۰	۰/۵	۰/۲	۴
تکثیر سلول‌های تمایز نیافته و تعدادی کم جنین ریز	زیاد	۰	۱	۰/۲	۵
بافتهای تمایز یافته متوسط و ۳ جوانه سبز مجتمع	متوسط	۰/۲	۰/۵	۰/۲	۶

بررسی رشد جوانه‌های حاصل از بافتهای جنینی: این آزمون جهت یافتن محیط کشت مناسب برای رشد جوانه‌های حاصل از بافتهای جنینی انجام گرفت. در این آزمون، ۴ تیمار مختلف (جدول ۴) انتخاب و جوانه‌های حاصل از نتایج آزمون جوانه‌زایی به این محیطها منتقل گردیدند. جهت تبادل گازی بهتر در این مرحله از شیشه به جای ظروف پتری و جهت کاهش پدیده شیشه‌ای شدن (Vitrification) جوانه‌ها از غلظت ۰/۹

بررسی جوانه‌زایی از بافتهای جنینی: این آزمون در دو مرحله انجام گرفت: در مرحله اول از ۸ تیمار مختلف (جدول ۲) استفاده گردید. نمونه‌های کشت شده پس از ۸ روز به محیط مشابه (در مورد تیمار چهارم نیترات نقره از محیط حذف گردید) منتقل شدند. از نتایج مرحله اول آزمون برای طراحی مرحله دوم آزمون شامل ۴ تیمار (جدول ۳) استفاده شد. نتایج در هر دو مرحله از آزمون پس از ۳ هفته یادداشت برداری شدند.

میلی گرم در لیتر BA و یک میلی گرم در لیتر NAA جهت تولید جوانه رویشی از سطح برگ استفاده گردید. جوانه‌های تولید شده جهت ادامه رشد به محیط PGoB نصف غلظت با یک درصد ساکارز منتقل شدند. از برگ این جوانه‌ها برای تراریختی با آگروباکتریوم تومه‌فاسینس استفاده شد.

درصد آگار استفاده گردید. نتایج پس از ۳ هفته از شروع کشت یادداشت‌برداری شدند. بررسی جوانه‌زایی از برگ جوانه‌ها پلویئید: با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های انجام گرفته در خصوص جوانه‌زایی مستقیم از برگ حاصل از کشت بافت ارقام دیپلوئید چغندر قند، برای برگ هاپلوئید چغندر قند نیز مانند برگ دیپلوئید از ترکیب هورمونی یک

جدول ۲- نتایج جوانه‌زایی از بافت جنین هاپلوئید رگه ۲۶۱ چغندر قند در محیط کشت های گوناگون

تیمار	محیط کشت پایه	درصد ساکارز	سایر مواد افزودنی (میلی گرم در لیتر)	درصد توده‌های کالوس تولیدکننده جوانه سبز	مشخصات جوانه‌ها
۱	PGOB/۲	۱	-	۸۷ <sup>a</sup>	جوانه‌های جنینی یا نابجای ریز تا متوسط
۲	PGoB/۲	۳	-	۹ <sup>c</sup>	"
۳	PGoB/۲	۳	۰/۲ GA <sub>3</sub>	۱۰ <sup>c</sup>	"
۴	PGoB/۲	۳	۱۲ AgNO <sub>3</sub>	۹ <sup>c</sup>	"
۵	PGoB	۳	-	۱۴ <sup>bc</sup>	"
۶	MSB	۳	-	۱۹ <sup>bc</sup>	"
۷	MSB/۲	۳	-	۷/۵ <sup>c</sup>	"
۸	MSB/۲	۱	-	۹۰ <sup>a</sup>	جوانه‌های جنینی یا نابجای متوسط تا بزرگ

میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می باشند.

جدول ۳- اثر تیمارهای کشت کالوس جنین‌زا به منظور جوانه‌زایی بافت جنین هاپلوئید رگه ۲۶۱ چغندر قند

تیمار	محیط کشت پایه	درصد ساکارز	BA (میلی گرم در لیتر)	وضعیت جوانه‌زایی
۱	MSB/۲	۱	۰	بیش از ۳۰ توده مجتمع ۵-۱۰ تائی از جوانه‌های نابجا یا جنینی ریز
۲	MSB/۲	۱	۰/۵	۱۸ توده مجتمع ۵-۱۰ تائی از جوانه‌های نابجا یا جنینی ریز
۳	MSB/۲	۲	۰/۵	۱۸ توده مجتمع ۵-۱۰ تائی از جوانه‌های نابجا یا جنینی ریز
۴	MSB/۲	۳	۰/۵	۱۲ جوانه جنینی یا نابجا شامل ۴ جوانه زرد و حالت شیشه‌ای، زرد و نکروزه شدن اکثر بافت‌ها

همراه آنتی‌بیوتیک مناسب روی شیکر ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای C<sup>o</sup> ۲۸ استفاده گردید. کشت شبانه به طور مستقیم و یا پس از افزودن ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگان و ۵-۲

کشت باکتری و محیط القاء: برای بدست آوردن سوسپانسیون باکتری جهت استفاده در تلقیح بافت‌های جنینی و برگ جوانه‌ها پلویئید از کشت شبانه آگروباکتری در محیط LB به

آخر از ۱۵۰ به ۵۰ میلی گرم در لیتر کاهش یافت. همچنین در بعضی موارد در اولین زیرکشت از محیط‌گزینش فاقد کانامایسین استفاده گردید تا امکان رشد سلول‌های تراریخته و غیرتراریخته همزمان فراهم گردد.

**ارزیابی تظاهر ژن GUS:** برای تایید سلول‌ها و بافت‌های تراریخته در جوانه‌های تشکیل شده در محیط‌گزینش از روش تغییر یافته جفرسون و همکاران (۱۶) با سوبسترای 5-bromo-4-chloro-3-indolyl B-X-gluc (D-glucuronide) در ارزیابی بیان ژن GUS استفاده گردید.

**محاسبات آماری:** در آزمایشهایی که نتایج آنها نیاز به تجزیه واریانس داشته است از طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار استفاده شد. نرم افزار SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) جهت تجزیه واریانس داده‌ها به کار رفت و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام شد.

### نتایج و بحث

برای انجام تراریختی بافت‌های جنینی نیاز به مقدار زیادی بافت کالوس جنین‌زا بوده که از نظر تکاملی نیز ترجیحاً در مرحله‌ای مشابه بوده باشند تا بتوان به حداکثر جنین و جوانه‌های تراریخته از مقدار مشخصی بافت جنین‌زا دست یافت.

**تکثیر بافت‌های جنینی:** بررسی اثر ترکیبات هورمونی بر تکثیر بافت‌های جنینی در قالب ۶ تیمار انجام گرفت که نتایج آن در جدول یک آمده است.

ساعت تکان دادن، سانتریفوژ و سپس تعلیق رسوب در محیط‌القاه ژن‌های *Vir* (ویرولانوس) آماده گردید. محیط‌القاه شامل PGoB نصف غلظت با ۵ درصد ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگان بود.

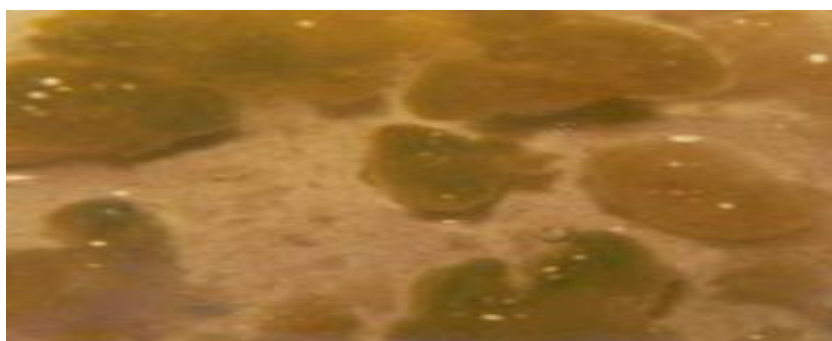
**تلقیح و کشت توام (Co-culture) بافت‌های گیاهی:** با انتقال بافت‌های گیاهی درون محیط‌القاه و نگهداری به مدت چند ثانیه عمل تلقیح بافت‌ها انجام گرفت. سپس باکتری‌های اضافی از سطح بافت توسط کاغذ صافی جذب گردید. بافت‌های گیاهی به محیط‌های کشت توام منتقل و در شرایط نوری و دمایی مختلف به مدت ۲-۳ روز در اتاق رشد نگهداری شدند (جدول ۵ و ۶).

**جوانه زائی در محیط‌های کشت:** جداکشت‌های مختلف پس از طی دوره کشت توام، ابتدا با محلول ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه شسته شده تا باکتری‌های اطراف جداکشت تا حد امکان از بین بروند، سپس به محیط‌های مختلف‌گزینش با ترکیبات هورمونی و آنتی‌بیوتیکی مختلف جهت جوانه زائی منتقل شدند. در این محیط‌ها برای جلوگیری از رشد مجدد آگروباکتری‌های متصل به جداکشت از آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم، ونکومایسین و به صورت جداگانه و یا ترکیبی با غلظت‌های مختلف و از آنتی‌بیوتیک کانامایسین با مقادیر متفاوت برای حذف سلول‌های غیرتراریخته استفاده گردید. روش‌های مختلفی برای گزینش سلول‌های تراریخته به کار رفت. بدین ترتیب که غلظت کانامایسین از زیرکشت اول تا زیرکشت

تاریکی و دمای  $26^{\circ}\text{C}$  منتقل شدند سپس برای سه هفته در شرایط نوری ۱۷ ساعت روشنایی، ۷ ساعت تاریکی در  $26^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند در این مرحله جنین‌های سماتیکی متعدد در مرحله گلوبولار و کوتیلدونی ایجاد گردید. با انتقال این جنین‌ها به PGo فاقد هورمون، تولید جنین‌های کوتیلدونی پس از ۲ هفته گردید (۲۷).

تعیین محیط مناسب برای جوانه‌زایی از بافت‌های جنینی: همانطور که در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شد مرحله اول این آزمون مشتمل بر ۸ تیمار بود که اثرات مربوط به نوع و غلظت محیط کشت پایه، درصد ساکارز، ترکیباتی همچون جیبرلیک اسید و نیترات نقره بر روند جوانه‌زایی از جنین‌های هاپلوئید به صورت عواملی مستقل بررسی شد. نتایج مرحله اول این آزمون سه هفته پس از شروع کشت یادداشت‌برداری شد (جدول ۲).

همانطور که از جدول ۱ بر می‌آید، تیمار ۴ بیشترین تولید جنین و تیمار ۵ بیشترین تکثیر کالوس جنین‌ها را داشته است. بنابراین افزایش غلظت NAA در تیمار ۵ باعث تولید و تکثیر کالوس بیشتر شده است (شکل ۱). ولی حالت تکوین جنینی کاهش یافته است. البته قبلاً نشان داده شده است که حضور یک شوک اکسینی برای القاء جنین معمولاً لازم است (۳، ۸ و ۲۷). کشت دمبرگ در محیط PGo (۲۲) یک میلی گرم در لیتر NAA و تولید کالوس پس از جداسازی کالوس و کشت در PGo حاوی یک میلی گرم در لیتر NAA و یک میلی گرم در لیتر BA و انجام ۲ تا ۳ زیر کشت منجر به تولید کالوس‌های سبز و شکننده گردید این کالوس‌ها در محیط PGo بدون هورمون برای ۴-۶ هفته نگهداری شده سپس به محیط PGo حاوی یک میلی گرم در لیتر NAA و BA به مدت ۱-۲ هفته در



شکل ۱- جنین‌های هاپلوئید تشکیل شده در محیط کشت حاوی ۰/۲ میلی گرم در لیتر BA و یک میلی گرم در لیتر NAA.

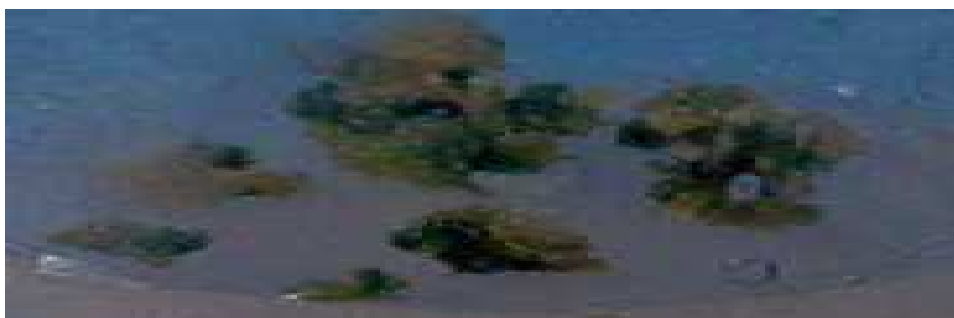
درصد ساکارز مناسب‌ترین محیط جهت تولید جوانه‌ها از بافت‌های جنینی و رشد آنها باشد.

با توجه به نتایج جدول ۲ به نظر می‌رسد استفاده از محیط کشت MSB/۲ به همراه یک

افزایش ساکارز (۹) به شدت جوانه زایی را کاهش می‌دهد. بنابراین با توجه به مجموع نتایج حاصل از مرحله اول و دوم آزمون جوانه زایی از بافت‌های جنینی به عنوان محیط کشت پایه در مرحله گزینش جوانه‌های تراریخته به کار رود (شکل ۲). آون و چنین به نظر می‌رسد که این محیط کشت بتواند همکاران (۲۵) با کشت جوانه‌های درون شیشه در MS حاوی ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر BA و جداسازی پهنک برگ و کشت در MS تغییر یافته حاوی یک میلی گرم در لیتر BA با ۰/۳ درصد ژلریت و سپس انتقال پهنک برگ‌ها به محیط تازه هر ۲ هفته یکبار برای یک ماه موفق به تولید کالوس و اندام زایی از کالوس به مقدار زیاد شدند.

البته در محیط کشت پایه PGoB/۲ نیز درصد مشابه‌ای جوانه تولید شده است ولی اندازه جوانه‌ها کوچکتر و تعداد آنها به ازای هر توده کالوس کشت شده نسبت به MSB/۲ کمتر است.

با توجه به نتایج مرحله اول بررسی تیمارهای مناسب برای جوانه‌زایی از بافت‌های جنینی و انتخاب مناسب‌ترین تیمار، مرحله دوم آزمون با ۴ تیمار انجام گرفت. نتایج این مرحله از آزمون در جدول ۳ آمده است. با مشاهده نتایج جدول ۳ مشخص می‌گردد که محیط کشت پایه MSB/۲ با یک درصد ساکارز در این آزمایش نیز نسبت به سایر تیمارها برتری داشته و حدود ۱/۷ برابر جوانه‌های بیشتر نسبت به تیمار ۲ و ۳ تولید نموده است. یعنی افزودن BA و همچنین



شکل ۲- تشکیل جوانه از جنین‌های هاپلوئید در محیط کشت MSB نصف غلظت به همراه یک درصد ساکارز.

جنین‌ها و جوانه‌های نابجای ریز به شکل جوانه‌های بزرگ و سبز در تیمار ۱ و ۲ مشهود است. البته در تیمار ۱ تعداد بیشتری جوانه سبز و در تیمار ۲ تعداد کمتری جوانه سبز

آزمون رشد جوانه‌های جنینی: رشد جوانه‌های حاصل از بافت‌های جنینی در ۴ تیمار مختلف (جدول ۴) نشان داد که اختلاف قابل مشاهده‌ای بین آنها وجود دارد. تکامل

و تاثیر مثبت آن در کاهش شیشه ای شدن جوانه‌ها، به نظر می‌رسد اگر این عامل را در محیط کشت پایه MSB/۲ تلفیق نماییم شاید بتوان به محیط مناسب‌تری جهت رشد جوانه‌های جنینی دست یافت.

ولی با اندازه‌ای بزرگتر ایجاد شده است. بنابراین به نظر می‌رسد با جداسازی و انتقال جوانه‌های تیمار ۱ به محیط تازه فرصت رشد بیشتر برای آنها فراهم گردد و به تعداد جوانه‌هایی بیشتر و با اندازه‌ای بزرگتر دست یافت. در ارتباط با کاهش غلظت املاح آمونیوم

جدول ۴- نتایج رشد جوانه حاصل از جنین هاپلوئید رگه ۲۶۱ چغندر قند در محیط‌های کشت مختلف

مشاهدات پس از ۳ هفته	BA (میلی گرم در لیتر)	درصد ساکارز	محیط کشت پایه	تیمار
جوانه‌های خیلی زیاد با اندازه متوسط، سبز تیره، رشد کم کالوس‌های متصل به جوانه	۰	۱	MSB/۲	۱
جوانه‌های زیاد، رشد متغیر، سبز روشن، تشکیل توده‌های کالوس از اطراف جوانه‌ها به میزان متوسط	۰	۱	PGOB/۲ با ۱/۴ غلظت آمونیوم	۲
جوانه‌های کم با رشد متوسط، رشد کم کالوس	۰/۵	۱	MSB/۲	۳
جوانه‌های کم با رشد متوسط، حالت زرد و شیشه‌ای شدن جوانه‌ها، تکثیر بافت‌های کالوس جنین‌زا	۰/۵	۲	PGoB	۴

۱٪ PGoB/۲ منتقل شده بودند در آن محیط به خوبی رشد کرده و تولید جوانه‌های طبیعی نمودند (شکل ۳). از برگ این جوانه‌ها نیز برای تراریختی با آگروباکتریوم تومه فاسینس استفاده گردید.

**جوانه‌زایی از برگ جوانه‌های هاپلوئید:**  
برگ‌های جوانه هاپلوئید در ترکیب هورمونی  $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NAA} + 1 \text{ mg l}^{-1} \text{ BA}$  تولید جوانه‌های رویشی فراوانی از سطح برگ نمودند و این جوانه‌ها که جهت ادامه رشد به ساکارز



شکل ۳- باززایی جوانه از برگ هاپلوئید.

**نتایج تراریختی بافت‌های کالوس جنین‌زای هاپلوئید:** با توجه به قابلیت تولید جنین و جوانه از بافت‌های جنین‌زای هاپلوئید، این نوع بافت جهت تراریختی مورد استفاده گردید. نتایج نشان داد که این نوع بافت علاوه بر توان باززایی جوانه از قابلیت خوبی نسبت به دریافت ژن‌های خارجی توسط آگروباکتری برخوردار است. به طوری که پس از رنگ‌آمیزی GUS برای جنین‌های گزینش یافته، حدود ۲۵ درصد آنها کاملاً آبی‌رنگ شده و حالت غیرشیمر داشتند (شکل ۴). برای تراریختی بافت جنینی عوامل متعددی همچون اثر استوسرینگان در محیط کشت باکتری یا در محیط کشت توام و حضور نور یا تاریکی بر بازدهی تراریختی (جدول ۵) و اثر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر میزان ممانعت‌کنندگی از رشد جنین‌های تراریخته

بررسی گردید (جدول ۶). همانطور که در جدول ۵ آمده است اثر استوسرینگان در محیط کشت باکتری و نیز شرایط نوری کم (dim) در مرحله کشت توام باعث افزایش درصد جنین‌های  $GUS^+$  و به عبارت دیگر افزایش تراریختی گردیده است. لیندسی و گالوئیس (۱۸) از سویه آگروباکتری pBi19CAT حامل پلاسمید LBA4404 (ژنهای *cat*, *npt-II*) و یا پلاسمید pBi121 (ژنهای *GUS*, *npt-II*) جهت تراریختی سه نوع جدا کشت شامل قطعات برگ، دم‌برگ و پایه جوانه حاصل از کشت هیپوکوتیل استفاده نمودند در این آزمایش فقط از پایه‌های جوانه حاصل از هیپوکوتیل، گیاهچه‌های تراریخته بدست آمد و فراوانی تراریختی بستگی به منبع جداکشت، ژنوتیپ گیاهی و شرایط گزینش داشت.

جدول ۵- اثر شرایط کشت باکتری و شرایط نوری کشت توام بر درصد جنین‌های  $GUS^+$  حاصل از تراریختی کالوس جنین‌زای هاپلوئید رگه ۲۶۱ چغندر قند\*

شرایط کشت باکتری	شرایط نوری کشت توام	تعداد جنین‌های رنگ‌آمیزی شده	درصد جنین‌های $GUS^+$
افزودن $100 \mu M$ استوسرینگان به کشت شبانه باکتری و ۵ ساعت ادامه شیکر	Dim	۱۵	۲۰ <sup>a</sup>
کشت شبانه باکتری بدون افزودن استوسرینگان	تاریکی	۳۰	۱۳ <sup>b</sup>

\*: در این بررسی سویه آگروباکتری C585C1 حامل پلاسمید pBi121 با  $OD_{600} = 1$  پس از سانتریفوژ در دمای آزمایشگاه، به مدت ۱۰ دقیقه و  $3500 \text{ rpm}$  در محیط لقای شامل استوسرینگان  $100 \mu M + 5\% \text{ ساکارز} + PG0B/2$  تعلیق شده و برای تلقیح بافت به مدت چند ثانیه استفاده گردید. دمای کشت توام  $25C-22C$  و مدت آن ۲ روز بود. در محیط گزینش از ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۱۵۰-۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در زیرکشت‌های مختلف استفاده شد. میانگین‌های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می‌باشند.

در ارتباط با اثر آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط گزینش، به نظر می‌رسد (جدول ۶) که اختلاف مهمی بین کاربرد آنتی‌بیوتیک‌های

مختلف بر درصد جنین‌های  $GUS^+$  حاصل از دو روش وجود ندارد. با این حال، استفاده از ونکومایسین به جای سفوتاکسیم و نیز غلظت

ژن GUS هستند که این امر ممکن است ناشی از آلودگی باکتری در بافت‌هایی باشد که از آنها استخراج DNA برای PCR صورت گرفته است یا بیان کم ژن و غیرقابل رویت بودن لکه‌های آبی و یا عدم نفوذپذیری رنگ به درون سلولها باشد.

کمتر کانامایسین در روش اول اثر سوء کمتری روی سلول‌های تراریخته داشته‌اند. در این آزمایش، درصد جوانه‌های PCR مثبت (داده‌ها نشان داده نشده است) بیشتر از درصد جوانه‌های GUS+ بود و این امر نشان دهنده آن است که تعدادی از جوانه‌ها علی‌رغم مثبت بودن نتایج PCR آن فاقد بیان



شکل ۴- جنین‌های تراریخته رنگ آمیزی شده با X-gluc آبی شده‌اند.

جدول ۶- اثر آنتی‌بیوتیک‌های محیط‌گزینش بر درصد جنین‌های GUS<sup>+</sup> حاصل از تراریختی کالوس جنین‌زای هاپلوئید رگه ۲۶۱ چغندر قند پس از کشت توام به مدت ۲ تا ۳ روز

درصد جنین‌های GUS <sup>+</sup>	تعداد جنین‌های رنگ‌آمیزی شده	آنتی‌بیوتیک در محیط‌گزینش برحسب میلی‌گرم در لیتر			روش
		سفتوکسیم	ونکومایسین	کانامایسین	
۱۹ <sup>a</sup>	۲۳	۵۰	۳۰۰	۰	یک
۱۷ <sup>a</sup>	۲۶	۵۰-۱۵۰	۰	۲۵۰	دو

\*: در این بررسی سویه آگروباکتری C585C1 حامل پلاسمید pB1121 با  $OD_{600}=1$  پس از سانتریفوژ در دمای آزمایشگاه، به مدت ۱۰ دقیقه و  $3500 \text{ rpm}$  در محیط‌القاء شامل استوسرینگان  $100 \mu\text{M}$  + ساکارز  $5\%$  + PGOB/۲ تعلیق شده و برای تلقیح بافت به مدت چند ثانیه استفاده گردید. دمای کشت توام  $25-22^\circ\text{C}$  و مدت آن ۲ روز بود. در محیط‌گزینش از  $250$  میلی‌گرم در لیتر سفتوکسیم و  $150-50$  میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در زیرکشت‌های مختلف استفاده شد. میانگین‌های با حروف مشابه، در سطح یک درصد در یک گروه می‌باشند.

به دست آمد. شرایط آزمایش مربوطه به شرح زیر بود: افزودن استوسرینگان  $100 \mu\text{M}$  به کشت شبانه باکتری و ۲ ساعت ادامه کشت، سپس رسوب‌دهی باکتری و تعلیق آن در محیط‌القاء شامل استوسرینگان  $100 \mu\text{M}$  + ساکارز  $5\%$  + PGOB/۲ برای القای ژن‌های *Vir* انجام گرفت. استفاده از  $250$  میلی‌گرم در لیتر

نتایج تراریختی برگ جوانه هاپلوئید: همانطور که در قسمت مواد و روش‌ها گفته شد پس از تولید جوانه از بافت‌های جنین هاپلوئید، از برگ آنها نیز برای تلقیح با آگروباکتری استفاده گردید. چند سری آزمایش تراریختی مقدماتی روی برگ هاپلوئید انجام گرفت که تنها در یک سری نتایج مثبت

در این روش شدت رنگ عصاره کالوس پس از افزودن سوبسترای مربوط به آنزیم GUS تعیین کننده میزان تظاهر ژن GUS می‌باشد. در آزمایش آنها مشخص گردید که طول دوره کوتا‌هتر کشت توام همراه با استوسرینگان معمولا فراوانی بالاتری از تراریختی تولید می‌نماید. بررسی آنها نشان داد که چندین عامل همچون ژنوتیپ، استوسرینگان، طول دوره کشت توام و پیش کشت بر فراوانی تراریختی با سیستم آگروباکتریوم اثر می‌گذارند. اشنایدر و همکاران (۲۶) دو روش انتقال ژن به چغندر قند را با یکدیگر مقایسه نمودند. در روش اول از آگروباکتری و جدا کشت کوتیلدون و در روش دوم از بمباران ژنی روی کالوس جنین‌زای حاصل از هیپوکوتیل استفاده گردید. فراوانی تراریختی در روش اول ۰/۷ درصد و در روش دوم ۸ درصد بود. به هر حال با توجه به صرف زمان و کار بیشتر برای تولید کالوس جنین‌زا و نیز تولید گیاهان تراریخته با نوآرائی‌های مولکولی در DNA تلفیق شده در روش بمباران ژنی، به نظر می‌رسد سیستم آگروباکتری برای کوتیلدون بدون نیاز به دستگاه پرتاب ژن نسبت به روش بمباران ژنی مزیت داشته باشد.

سفوتاکسیم و ۱۵۰ و ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین به ترتیب در زیرکشت‌های متوالی باعث گزینش جوانه‌هایی از برگ گردید که نتایج رنگ‌آمیزی GUS همگی مثبت بود (شکل ۵). از ۲۰۰ برگ تلقیح شده در این آزمایش شش جوانه تراریخته به دست آمد و به عبارتی بازدهی تراریختی سه درصد نسبت به تعداد جداکشت بود. ژاک و همکاران (۱۵) به منظور بررسی نوع جداکشت، اثر پیش کشت، نقش ترکیب فنلی استوسرینگان و طول دوره کشت توام بر میزان تراریختی چغندر قند یک سری آزمایش‌ها با دو نوع بافت هیپوکوتیل و کوتیلدون در چندین ژنوتیپ چغندر قند و با استفاده از سیستم آگروباکتریوم تومه فاسینس حامل پلاسمید دوتائی در بردارنده ژنهای *npt-II* و *GUS* در بین مرزهای T-DNA آن انجام دادند. آنها نتیجه گرفتند که بافت کوتیلدون نسبت به هیپوکوتیل تراریختی بالاتری داشت. البته افزودن استوسرینگان باعث افزایش فراوانی تراریختی در بافت هیپوکوتیل گردید. اثر پیش کشت و استوسرینگان باعث بهبود تراریختی در جداکشت‌های کوتیلدون شد. برای مقایسه تظاهر ژن GUS در کالوس حاصل از جداکشت از روش فلورومتری استفاده گردید.



شکل ۵- برگ جوانه‌های تراریخته رنگ‌آمیزی شده با X-gluc آبی شده‌اند.

لیندسی و گالوئیس (۱۸) پس از تراریختی پایه جوانه کشت بافت چغندر قند و ارزیابی فعالیت ژن‌های گزارشگر GUS یا CAT حدود ۸۵ درصد جوانه‌های سبز غیرتراریخته (escape) روی محیط گزینش مشاهده نمودند. این نتیجه با نتایج آزمایش ما مطابقت داشته و نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک کانامایسین یک عامل انتخاب‌گر مناسب برای آزمایش‌های تراریختی چغندر قند نبوده و تعداد زیادی از سلول‌های غیرتراریخته فرصت رشد و تکثیر و تولید جوانه می‌نمایند. مشکل دیگر تراریختی چغندر قند تولید جوانه‌های تراریخته شیمر (chimer) می‌باشد. در این نوع جوانه‌ها که درصد بالایی از کل جوانه‌های تراریخته را شامل می‌شوند تنها بخشی از برگ یا پایه جوانه بیان ژن GUS را نشان می‌دهند. البته بیان ژن GUS تحت تاثیر عواملی دیگر همچون روش رنگ‌آمیزی و نفوذ رنگ به درون سلول‌ها نیز می‌باشد. ژانگ و همکاران (۲۹) از ژن GFP به عنوان ژن گزارشگر در مجاورت ژن قابل‌گزینش *npt-II* برای تراریختی جدا کشت‌های جوانه و کالوس‌های جنین‌زای چغندر قند با سیستم آگروباکتریوم تومه فاسینس استفاده نمودند. با این روش سرعت و بازدهی گزینش بافت‌های تراریخته افزایش یافت و جوانه‌های تراریخته حاوی ژن GFP با فراوانی ۲-۵ درصد حاصل گردید. مزیت ژن گزارشگر GFP نسبت به GUS عدم نیاز به سوبسترا و بافر رنگ‌آمیزی است و در نتیجه بافت تراریخته حامل ژن GFP را می‌توان در شرایط استریل پس از مشاهده با نور ماورای

بنفش جهت ادامه رشد به محیط کشت برگرداند. کرنز و همکاران (۱۷) از ناحیه ترانزیشن بین هیپوکوتیل و دم‌برگ کوتیلدون چغندر قند برای تراریختی با سیستم آگروباکتری سوپه C58C1 استفاده نمودند. آنها اثر هورمون‌های 2, 4-D و NAA را در پیش‌کشت بافت روی میزان باززائی و فراوانی تراریختی بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که حضور NAA در پیش‌کشت بافت و در دوره کشت توام، وضعیت فیزیولوژیکی سلول‌های جدا کشت را برای تراریختی مستعد می‌نماید بدون آنکه باعث کاهش توان باززائی گردد. همچنین حضور NAA در طول دوره القای جوانه نیز ممکن است فراوانی انتقال ژن را افزایش دهد. در تحقیق حاضر نیز افزودن هورمون NAA در محیط پیش‌کشت و کشت توام باعث افزایش نرخ تراریختی از بافت‌های به کار رفته شد. در حین بررسی‌های مربوط به باززائی و تراریختی برگ جوانه‌ها پلوئید چغندر قند مشاهده گردید که اغلب برگ‌های جوانه‌های حاصل از این جداکشت توانائی جوانه‌زائی زیادی دارند. از آنجا که سلول‌های تراریخته بایستی توانائی باززائی نیز داشته باشند، از این رو برگ‌های حاصل از جوانه‌های کشت بافت به عنوان بافتی مناسب برای آزمون‌های تراریختی استفاده شدند. برای تراریختی این جداکشت، مشاهدات و نتایج زیر قابل ذکر است: معمولاً پس از گذشت یک تا دو هفته از زمان تلقیح با آگروباکتری، جوانه‌ها شروع به پدیدار شدن می‌نمایند. این جوانه‌ها معمولاً از محل

بالائی از آنها تراریخته هستند. بنابراین اگر این کالوس‌ها جدا شده و به محیط‌های باززایی جوانه از کالوس منتقل شوند می‌توان به درصد بالاتری از جوانه‌های تراریخته دست یافت. البته در جوانه‌زایی غیرمستقیم نبایستی پدیده تنوع سماکلونی را نادیده گرفت. بنابراین به نظر می‌رسد با استفاده از جداکشت برگ و تراریختی آن هم‌زمان بتوان در سه مسیر جوانه‌زایی مستقیم از برگ، جوانه‌زایی غیرمستقیم با فاز کالوس و یا جنین‌زایی پیش رفت و حداکثر جوانه‌های تراریخته را نسبت به یک جداکشت بدست آورد. مزیت دیگر استفاده از برگ جوانه‌کشت بافت، داشتن یک منبع دائمی تولیدکننده جداکشت است. زیرا در این روش پس از استفاده از برگ‌های خارجی جوانه برای تراریختی می‌توان باقیمانده جوانه را به محیط‌های ازدیادی منتقل نمود تا در آنجا مجدداً رشد و تکثیر کند و به عنوان منبع جدید جداکشت جهت تراریختی مجدد به کار گرفته شود.

با توجه به نتایج حاصل از تراریختی بافت کالوس جنین‌زا و نیز برگ جوانه‌هاپلوئید به نظر می‌رسد در آینده بتوان با استفاده از این بافت‌ها به گیاهان تراریخته هاپلوئید و پس از دو برابر نمودن کروموزوم‌های آنها توسط کولشیسین در اندک زمان به لاین‌های ۱۰۰ درصد خالص دیپلوئید دست یافت. بدین ترتیب نیازی به تلاقی‌های کلاسیک و انتخاب در نسل‌های تفکیک برای یافتن لاین‌های خالص برای تولید هیبریدهای مورد نظر نخواهد بود.

دمبرگ اصلی عمدتاً در محل بین دمبرگ و پهنک برگ ظاهر می‌شوند. در این مرحله، چند حالت قابل مشاهده است. برخی از برگ‌ها یا قدرت باززایی ندارند و یا چون ژن مقاومت به کانامایسین را دریافت نکرده‌اند در محیط‌گزینه‌ش بدون تولید جوانه، زرد و سپس نکروزه شده و از بین می‌روند. برخی از برگ‌ها در ابتدا تولید جوانه‌ای می‌نمایند که پس از مدتی در اثر کانامایسین سفیده شده و از بین می‌رود. معمولاً جوانه‌های حساس به کانامایسین، غیرتراریخته محسوب می‌شوند. در این بین جوانه‌هایی سبز تولید می‌شوند که حالت سبز بودن خود را در محیط‌گزینه‌ش تا چندین واکشت حفظ می‌کنند. جوانه‌های سبز قابل تقسیم به دو دسته هستند: دسته اول جوانه‌هایی بوده که به نحوی از اثر سوء کانامایسین مصون مانده‌اند ولی در رنگ آمیزی GUS، آثار تظاهر ژن در آنها مشاهده نمی‌شود. این جوانه‌ها حالت فرار (escape) از کانامایسین داشته‌اند و غیرتراریخته محسوب می‌شوند، گرچه احتمال خاموشی ژن را نمی‌توان از نظر دور داشت. دسته دوم جوانه‌های سبز تراریخته هستند که هم‌مقاوم به کانامایسین هستند و هم در سنجش فعالیت آنزیمی، GUS<sup>+</sup> هستند. بنابراین می‌توان دو دسته جوانه را از هم تشخیص داد. همچنین مشاهده گردید که گاهی هم از جداکشت برگ در محل انتهایی دمبرگ تولید کالوس و یا جنین می‌گردد. با استفاده از رنگ‌آمیزی GUS روی کالوس‌های تشکیل شده از برگ مشخص گردید که درصد

## تشکر و قدردانی

نمودن امکانات اجرای این پژوهش قدردانی

می شود.

از مدیریت محترم موسسه تحقیقات

اصلاح و تهیه بذر چغندر قند به خاطر فراهم

## منابع

1. Norouzi, P. 2002. Investigation of manipulated genes transfer to sugar beet by *Agrobacterium*. Ph.D. thesis. Faculty of Agriculture. Tehran University. 202 pp.
2. Yavari, N. 1993. Development of sugar beet monoploid plant by culture of unfertilized ovule. First Iranian Congress on Crop Production and Breeding. 152 pp.
3. Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. In: Handbook of plant cell culture. Vol 1, Techniques for propagation and breeding (Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV and Yamada Y eds.). Macmillian Press. New York. pp: 82-123.
4. Birsin, M., M. Yildiz, C. Sancak and M. Ozgen. 2000. Transfer of a b-glucuronidase reporter gene to sugar beet (*Beta vulgaris* L.) via microprojectile bombardment. Turk. J. Agric. Forest., 24: 487-490.
5. Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R.N. Beachy and C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic riceplants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. Mol. Breed., 7: 25-33.
6. De Greef, W. and M. Jacobs. 1979. *In vitro* culture of the sugar beet: description of a cell line with high regeneration capacity. Plant Sci. Lett., 17: 55-61.
7. De Marchis, F., Y. Wang, M. Bellucci and S. Arcioni. 2007. Developing a method for sugar beet chloroplast transformation. Proceedings of the 51<sup>st</sup> Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress. 23-26 September, Riva del Garda, Italy.
8. Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1987. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. London. 322 pp.
9. Gamborg, O.L. and R.A. Miller. 1968. Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50: 151-158.
10. Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbio. Mol. Bio. Rep., 67: 16-37.
11. Hall, R.D., T. Riksen-Bruinsma, G.J. Weyens, I.J. Rosquin, P.N. Denys, I.J. Evans, J.E. Lathouwers, M.P. Lefebvre, J.M. Dunwell, A. Tunen and F.A. Krens. 1996. A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. Nat. Biotech., 14: 1133-1138.
12. Halluin, K.D., E. Bossut, B. Mazur, J. Leemans and J. Botterman. 1992. Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. Bio/Tech., 10: 309-315.
13. Hisano, H., Y. Kimoto, H. Hayakawa, J. Takeichi, T. Domae, R. Hashimoto, J. Abe, S. Asano, A. Kananzawa and Y. Shimamoto. 2004. High frequency *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*. Plant Cell Rep., 22: 910- 918.

14. Ivic-Haymes, S.D. and A.C. Smigocki. 2005. Identification of highly regenerative plants within sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines for molecular breeding. In *Vitro Cell. Develop. Bio. Plant*, 41: 483-488.
15. Jacq, B., O. Lesobre, R.S. Sangwan and B.S. Sangwan. 1993. Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugar beet. *Plant Cell Rep.*, 12: 621-624.
16. Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Bevan. 1987. GUS fusions: -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO J.*, 6: 3901-3907.
17. Krens, F.A., A. Trifonova, L.C.P. Keizer and R.D. Hall. 1996. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Plant Sci.*, 116: 97-106.
18. Lindsey, K. and P. Gallois. 1990. Transformation of sugar beet by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.*, 41: 529-536.
19. Mannerlof, M., B.L. Lennerfors and P. Tenning. 1996. Reduced titer of BNYVV transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. *Euphyt.*, 90: 293-299.
20. Mannerlof, M., S. Tuveesson, P. Steen and P. Tenning. 1997. Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphyt.*, 94: 83-91.
21. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.*, 15: 473-497.
22. Negrutiu, I., F. Beeftink and M. Jacobs. 1975. *Arabidopsis thaliana* as model system in somatic cell genetic I. cell and Tissue Culture *Plant Sci. Lett.*, 5(5): 293-304.
23. Norouzi, P., K. Zamani, M.A. Malboobi and B. Yazdi-Samadi. 2005. Using a competent tissue for efficient transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In *Vitro Cell. Develop. Bio. Plant.*, 41: 11-16.
24. Norouzi, P., M. Jafari, M.A. Malboobi, B. Ghareyazie and A. Rajabi. 2011. Inheritance of transgene and resistance to a lepidoptran pest, *Spodoptera littoralis*, in transgenic sugar beet plants harboring a synthetic *cryIAb* gene. *Transgen. Plant J.*, 5: 62-66.
25. Owens, L.D. and D.R. Eberts. 1992. Sugar beet leaf culture: an improved procedure for inducing morphogenesis. *Plant Cell Tissu. Org. Culture.*, 41: 165-170.
26. Snyder, G.W., J.C. Ingersoll and A.C. Smigocki. 1999. Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment. *Plant Cell Rep.*, 18: 829-834.
27. Tetu, T., R.S. Sangwan and B.S. Sangwan. 1987. Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus. *J. Exp. Bot.*, 38: 506-517.
28. Yang, A.F., X.G. Duan, X.F. Gu, F. Gao and J.R. Zhang. 2005. Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris* L.) and production of plants with improved salt tolerance. *Plant Cell Tissu. Org. Culture.*, 83: 259-270.
29. Zhang, C.L., D.F. Chen, A.C. McCormac, N.W. Scot, M.C. Elliott and A. Slater. 2001. Use of the GFP reporter gene as a vital marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol. Biotech.*, 17: 109-117.

## Regeneration and Transformation of Haploid Leaf and Embryogenic Tissues Derived from Ovule Culture in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.)

P. Norouzi<sup>1</sup>

1- Assistant Professor, Sugar Beet Seed Institute (Corresponding author: Norouzi1389@gmail.com)

Received: 8, April, 2012

Accepted: 10, November, 2012

### Abstract

In order to use of haploid tissue of sugar beet for producing transgenic plants, at first, some experiments were accomplished for shoot production of haploid leaves from haploid embryos. Results of current study indicated that MSB or PGoB medium supplemented with 3% sucrose, 0.2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA and 0.5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> NAA could be used for increasing haploid embryos and half strength MSB medium contains 1% sucrose to develop embryos and shoot production. Moreover, PGoB medium supplemented with 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BA and 1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> NAA was used for shoot production from haploid leaves. In the next step, haploid embryogenic calli and leaves were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* cells harboring pBI121 binary vector. After 2 days co-culture, the inoculated explants were transferred to selection medium contains 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> kanamycin. After 3-5 weeks, putative transgenic shoots were analyzed by GUS staining. Results showed that two explants have ability for shoot regeneration of haploid transgenic cells.

**Keywords:** Haploid, Embryo, *Agrobacterium*, Sugar beet, Transformation