دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تولید جوانه‌های نابجا از کشت بافت ریزنمونه‌ی دمبرگ چغندرقند در روش باززایی مستقیم

حسین مظاهری کوهانستانی[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲]، احمد اسماعیلی[۳] و میترا خادمی[۴]

۱، ۳ و ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
۲- استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، (نویسنده مسوول: nazarian.f@lu.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۳

چکیده

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) یکی از دو محصول اصلی و مهم تولید قند در دنیاست. بررسی عملکرد ژن‌ها و همچنین معرفی ژن‌های ارزشمند، نیازمند استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک است. از این‌رو، استفاده از کشت بافت برای بهره‌مندی از هر نوع روش انتقال ژنی گریزناپذیر است. بنابراین به‌منظور تولید گیاهچه در گیاه سرسخت چغندرقند به‌منظور یافتن ریز نمونه مناسب برای تولید جوانه به‌روش باززایی مستقیم بدون نیاز به کشت مجدد بذرها و تهیه‌ی جوانه انتهایی، از یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. از جوانه‌های نابجا موجود بر روی برگ‌های حاوی پایه جوانه در روش باززایی مستقیم و از پهنک برگ و دمبرگ در دو موقعیت نزدیک و دور نسبت به جوانه رأسی دو لاین چغندرقند (SBSI-04 و SBSI-02) استفاده شد. پس از گذشت چهار هفته و دو بار واکشت، ریزنمونه‌ها در محیط MS با ترکیب هورمونی IBA (۰/۱میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر)، تعداد جوانه‌های تولیدی شمارش و به‌صورت درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که ریزنمونه‌ی دمبرگ بیشترین جوانه را تولید نمود. همچنین از نظر صفت درصد جوانه‌زایی، لاین SBSI-04 در مجموع نسبت به لاین SBSI-02 جوانه‌های بیشتری را تولید کرد. به‌طورکلی، ریز نمونه‌های دمبرگ داخلی لاین SBSI-04 بیشترین قابلیت تولید جوانه را نشان دادند، این موضوع نشان داد که برای تولید گیاهان تراریخت، ضمن توجه به اهمیت نوع ژنوتیپ بهتر است از کشت بافت این ریزنمونه و تراریزش آن استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: باززایی مستقیم، تراریزش، دمبرگ، ریزنمونه، هورمون‌های رشد

مقدمه

چغندرقند با نام علمی *Beta vulgaris* L. گیاهی دیپلوئید (۲n=۱۸)، دو ساله و از تیره اسفناج (*Chenopediaceae*) است (۲۱). به‌دلیل کارایی بالای آن (بیش از ۲۴ میلیون تن تولید جهانی شکر) نه تنها به‌عنوان منبع شکر، بلکه به‌عنوان بیوراکتور سبز برای ذخیره متابولیت‌های جدید در ریشه به‌طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه می‌باشد (۱۴).

بهبود بسیاری از صفات زراعی این گیاه، از طریق به‌نژادی کلاسیک موفقیت‌آمیز نیست و یا حداقل اصلاح ژنتیکی آنها به‌روش‌های سنتی بسیار مشکل است (۱۴،۳۸). یکی از نیازهای اولیه برای تولید گیاهان تراریخت، استفاده از فنون کشت سلول و بافت است تا بتوان از یک سلول تراریخت اولیه به گیاه کامل دست یافت. چغندرقند، یکی از گیاهانی است که دست‌ورزی ژنتیکی آن بسیار مشکل است و در حال حاضر، یک روش استاندارد، مؤثر و مورد توافق همه برای باززایی این گیاه وجود ندارد (۲۹،۲۲،۱۱،۴۳). به‌تازگی محققان نشان داده‌اند که موضوع تمایززدایی و باززایی خصلتی ژنتیکی است که به‌نظر می‌رسد چغندر قند فاقد ژن‌های لازم برای باززایی در مجیط کشت بافت است (۲۰). به‌منظور تعیین بهترین ریزنمونه و شرایط کشت بافت، تحقیقات متعددی صورت گرفته است (۲۳،۱۱،۳۳،۴۵). تشکیل کالوس از طریق کشت برگ‌های لپه‌ای، هیپوکوتیل و برگ‌ها و به دنبال آن باززایی از کالوس گزارش شده است (۴،۳۷،۲۴،۵،۶). باززایی به‌روش غیرمستقیم و از کالوس، بسیار پرهزینه و زمان‌بر است و در پاره‌ای از مواقع باعث ایجاد تنوع سوماکلونی می‌شود. چون گیاهان حاصل از روش باززایی مستقیم اندام هوایی، از پایداری ژنتیکی بالاتری برخوردار هستند (۳) لذا باززایی مستقیم اندام هوایی، بدون مرحله تشکیل کالوس، از برگ‌های لپه‌ای (۴۱،۲۵،۱۹) دمبرگ (۳،۴،۶) و پایه جوانه (۲۷،۱۱،۱۳) صورت گرفته است. با این حال موفقیت در این روش، برحسب نوع ریزنمونه، ژنوتیپ و ترکیب محیط کشت متفاوت بوده است (۴۵،۳۵،۴،۸). برای مثال نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که باززایی ریزنمونه‌های متفاوت و از ژنوتیپ‌های مختلف دارای اختلاف زیادی باهم هستند (۴۵،۳۸،۱۶). از این‌رو با توجه به اهمیت ژنوتیپ در کارایی سیستم‌های باززایی مستقیم و نیاز به داشتن یک سیستم کارآمد برای باززایی مجدد ژنوتیپ‌های با ارزش چغندرقند در شرایط آزمایشگاهی، لزوم مطالعه‌ای متمرکز برای تعیین نوع ریزنمونه و شرایط هورمونی مؤثر در باززایی ژنوتیپ‌های ارزشمند موجود در کشور بیش از پیش احساس می‌شود. در همین خصوص، خادمی و همکاران (۲۱) مطالعه‌ای جهت تعیین سطوح هورمونی مناسب برای تولید برگ‌های حاوی پایه جوانه در روش باززایی مستقیم در چغندرقند انجام دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین جوانه تولیدی به نوع غلظت سیتوکینین بستگی داشت به‌طوری‌که بیشترین جوانه تولیدی در لاین‌های SBS-04 و SBS-02 به‌ترتیب در سطوح هورمونی $2mgl^{-1}$ و $1/5\ mgl^{-1}$ از هورمون BA حاصل شد.

زمانی‌فر و همکاران (۴۳) نشان دادند که از ریزنمونه‌های برگ حاوی پایه جوانه می‌توان به‌عنوان ریزنمونه برای تراریزش چغندرقند استفاده نمود. دلیل این امر می‌تواند مزیت‌هایی چون سادگی تهیه، منبع قابل دسترسی و دائمی با قابلیت باززایی بالا برای تهیه ریزنمونه هدف، کاهش زمان لازم برای باززایی

جوانه‌ها به‌دلیل باززایی مستقیم و نیز به حداقل رسیدن تنوع سوماکلونی به‌دلیل نداشتن فاز کالوس و نیز جوان بودن این ریزنمونه باشد. از آنجایی که در مطالعه زمانی‌فر و همکاران (۴۳) تفاوتی در دو محیط بین ریزنمونه‌های پهنک برگ و دمبرگ مشاهده نشد و با توجه به این نکته که تعداد جوانه‌های راسی علی‌رغم کارایی آنها در یک گیاه اندک است، این آزمایش با هدف انتخاب بین دو ریزنمونه‌ی پهنک برگ و دمبرگ و ژنوتیپ مناسب برای بازایی مداوم جوانه نابجا در گیاه چغندرقند، بدون نیاز به کشت مجدد بذرها و تهیه جوانه انتهایی صورت گرفت. به‌علاوه موقعیت برگ منشأ ریزنمونه‌ها نیز مورد توجه قرار گرفت.

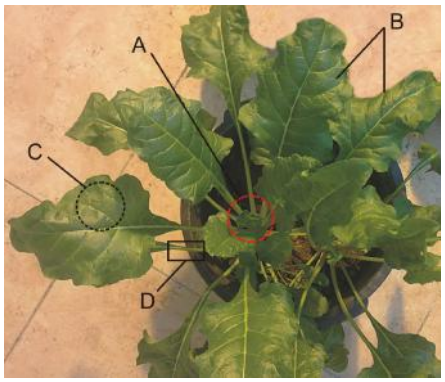
مواد و روش‌ها

در این مطالعه از اندام هوایی گیاهان چغندرقند القاء شده بر اساس نتایج خادمی و همکاران (۲۱) بر روی ریزنمونه‌های برگی به‌عنوان منبع تأمین‌کننده ریزنمونه‌ها استفاده شد (شکل ۱ و ۲). از بذرها دو لاین مولتی‌ژرم و مونوژرم چغندرقند به نام‌های SBSI-04 (لاین گرده افشان) و SBSI-02 (لاین اُتایپ) استفاده شد که به‌عنوان بهترین لاین‌های والدی برای تولید بذر هیبرید در کشور شناخته می‌شوند. برای تولید گیاهچه‌های استریل و به‌دست آوردن جوانه انتهایی، از روش نوروزی و همکاران (۳۳) استفاده شد. در ابتدا، بذرها دو رقم چغندرقند در محلول اسید سولفوریک غلیظ به‌مدت ۳۰ دقیقه تیمار گردیدند تا زوائد و آلودگی‌ها زدوده شده و در جوانه‌زنی تسریع شود. سپس بذرها ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با آب معمولی شستشو داده شدند. برای ضدعفونی، بذرها در اولین مرحله در الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از شستشو بذرها با آب مقطر، بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند و بار دیگر برای سه بار با آب مقطر هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند تا بقایای مواد ضدعفونی کننده پاک شوند. بذرها جهت ریشه‌دار شدن بر روی کاغذ صافی استریل درون پتری‌دیش در تاریکی قرار داده شدند.

بعد از گذشت ۳ روز، بذرها ریشه‌دار به محیط آب آگار برای تولید گیاهچه منتقل شدند. پس از گذشت یک هفته، قسمت کوتیلدون، هیپوکوتیل و ریشه بذرها جوانه زده حذف شد و جوانه انتهایی جهت تولید گیاهچه و برگ به محیط القا جوانه انتقال داده شد.

جوانه انتهایی جهت تولید گیاهچه و برگ حاوی پایه جوانه در محیط کشت پایهMS (۳۱) با ترکیبات سطوح غلظتی هورمون های BA ($1/5\ mgl^{-1}$) وNAA ($0/5\ mgl^{-1}$) قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰ تا ۱۴روز، جوانه‌ها در محیط کشت پایه MS با ترکیبات هورمونی BA ($0/25\ mgl^{-1}$) و IBA ($0/1 mgl^{-1}$) به‌مدت چهار هفته و هر دو هفته یک بار منتقل شدند (۲۱). پس از حدود گذشت ۲ ماه از کشت بذرها، گیاهان دارای تعداد کافی برگ برای تهیه ریزنمونه بودند.

از آنجایی که سن ریزنمونه و همچنین موقعیت ریزنمونه روی کارایی کالوسزایی و تراریزش موثر است، ریزنمونه دمبرگ و پهنک در دو موقعیت داخلی و خارجی (شکل ۱) از این جوانه‌ها در دو لاین چغندرقند برش و در مجموع با ۸ تیمار (دو لاین SBS-04 و SBS-02؛ دو نوع ریزنمونه دمبرگ و پهنک برگ و دو موقعیت داخلی و خارجی) در محیط کشت پایه MS با ترکیبات هورمونیBAP ($0/25 mgl^{-1}$) و IBA ($0/1 mgl^{-1}$) کشت شدند. برای مقایسه تیمارهای آزمایش، از یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار و ۱۰ ریز نمونه در هر تکرار استفاده شد. از آنجایی که میزان تولید جوانه‌ها روی برگ مهم‌ترین صفت برای قضاوت در خصوص تولید جوانه‌های نابجا از کشت بافت ریزنمونه‌ی دمبرگ چغندرقند در روش باززایی مستقیم است، لذا درصد جوانه‌های تولیدی در هر یک از تیمارها پس از ظهور در یک روز خاص شمارش گردید. داده‌های صفت درصد جوانه‌زایی به کمک نرم‌افزار MSTATC (۳۲) برای برخورداری از برخورداری از توزیع نرمال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در صطح معنی‌داری مربوطه استفاده شد.



شکل ۱- محل قرارگیری نسبی ریزنمونه‌های مختلف: A) برگ داخلی B) برگ خارجی C) ریزنمونه پهنکD) ریزنمونه دمبرگ
Figure 1. The relative position of different explants: A)Internal leaf and B) External leaf C) Leaf blade explant D) Petiole explant.

نتایج و بحث

یکی از روش‌های ریز ازدیادی تولید جوانه‌های نابجا است. تولید جوانه‌های نابجا وقتی روی می‌دهد که سلول‌های غیر مریستمی در واکنش به تنظیم‌کننده‌های رشد موجود در محیط کشت و همچنین مواد غذایی درون بافت به‌صورت سلول‌های مریستمی رشد کنند. اثر متقابل این ترکیبات موجب توانایی باززایی شبه مریستمی (سلول‌های که ساختار مریستمی ندارند، ولی دارای فعالتی مریستمی هستند) می‌شود. این شبه مریستم‌ها با توجه به نسبت اکسین و سیتوکینین موجود در محیط کشت به‌صورت اندام هوایی و یا ریشه نمو می‌یابند. تولید شبه مریستم‌ها نشان‌دهنده شروع تشکیل اندام یا حتی جنین است و در کالوس و ریز نمونه‌های مختلف گیاهی روی می‌دهد. یکی از ریز نمونه‌های که در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ استفاده از قطعات برگی یا ساقه است. در این حالت ریزنمونه‌ها در یک محیط مشخص غذایی دارای مقادیر مناسب اکسین و سیتو کنین کشت می‌شوند و به‌این ترتیب امکان تولید جوانه‌های نابجا را پیدا می‌کند. تغییر در تنظیم‌کننده‌های رشد در باززایی مستقیم اندام‌های هوایی یا ریشه از سلول‌های ریز نمونه موثر است.

داده‌های حاصل از شمارش تعداد جوانه‌ها به درصد، پس بررسی آزمون نرمال بودن آنها به‌وسیله آزمون‌های مربوطه، مورد تجزیه و تحلیل‌های آماری قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس این داده‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر عامل‌های نوع لاین و نوع ریزنمونه بر روی صفت درصد جوانه‌زنی بسیار معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۱$) بوده‌اند. همچنین اثر متقابل نوع ریزنمونه و موقعیت ریزنمونه نیز روی درصد جوانه‌زنی معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بوده است. همان‌طوری که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، سایر اثرات ساده، دوگانه و مشخصاً اثر سه‌گانه روی درصد جوانه‌زنی معنی‌دار نشده‌اند.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفت درصد جوانه‌های تولیدی حاصل از کشت بافت در چغندرقند

Table 1. Analysis of variance for number of buds produced from tissue culture in sugar beet

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
لاین	۱	۱۲۵/۶۶**
ریزنمونه	۱	۱۲۵/۴۵**
موقعیت	۱	۰/۱۲۵ns
لاین × موقعیت	۱	۲/۰۰۰ns
لاین × ریزنمونه	۱	۰/۰۰۵ns
ریزنمونه × موقعیت	۱	۴/۵۰۰ns
لاین × موقعیت × ریزنمونه	۱	۱/۱۲۵ns
خطا	۲۴	۱/۱۰۴ns
درصد تغییرات (CV)	۲۳/۳	

ns، ** و * : به ترتیب تفاوت غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح ۱ و ۵ درصد

مقایسه میانگین اثرات معنی‌دار در جدول ۲ مشاهده می‌شود. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود، ریزنمونه دمبرگ نسبت به ریزنمونه پهنک از نظر صفت درصد تولید جوانه در هر دو لاین کارایی بهتری را نشان می‌دهد. به‌علاوه به‌نظر می‌رسد که لاین SBSI-04 نسبت به لاین SBSI-02 در تولید بیشتر جوانه برتری دارد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل ریزنمونه × موقعیت نشان داد که بیشترین درصد جوانه تولیدی را می‌توان از کشت ریزنمونه دمبرگ داخلی لاین SBSI-04 تولید نمود.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفت میانگین درصد تولید جوانه‌ها به روش دانکن

Table 2. Mean analysis of the average number of generated buds, using Duncan multiple range test

موقعیت ریزنمونه	لاین	گروه	میانگین درصد جوانه‌ها
دمبرگ داخلی	SBSI-۰۴	A	۷/۲۵
دمبرگ خارجی	SBSI-۰۴	A	۶/۷۵
پهنک خارجی	SBSI-۰۴	AB	۵/۷۵
دمبرگ داخلی	SBSI-۰۲	BC	۴/۷۵
دمبرگ خارجی	SBSI-۰۲	C	۴/۰۰
پهنک داخلی	SBSI-۰۴	C	۴/۰۰
پهنک داخلی	SBSI-۰۲	D	۱/۷۵
پهنک خارجی	SBSI-۰۲	D	۱/۷۵

میانگین‌های با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار هستند ($P<۰/۰۵$).

شکل ۲- ریزنمونه دارای جوانه‌های نابجا. A) ریز نمونه‌های پهنک دارای جوانه‌های رویشی در سطح فوقانی و نزدیک به رگبرگ اصلی. B) ریزنمونه‌های دمبرگ دارای جوانه‌های رویشی در محل برش و در قسمت‌های رأسی

Figure 2. Explants with adventitious buds. A) Leaf blade explants with upper vegetative buds close to the main vein. B) Petiole explants with vegetative buds at the apical side and at cutting area

مطالعات کشت‌بافت چغندرقند در شرایط آزمایشگاهی برای تولید گیاه از ریشه چغندرقند با القاء بافت کالوس سابقه‌ای طولانی دارد (۱۲،۱). اگرچه شکل‌گیری کالوس در کوتیلیدون، هیپوکوتیل و برگ چغندرقند با توان باززایی متفاوت گزارش شده است (۴۱،۲)، اما تولید گیاه چغندرقند از طریق باززایی مستقیم و بدون مرحله تشکیل کالوس، تنها در تعدادی از ریزنمونه‌ها حاوی سلول‌های مریستمی مستعد برای باززایی جوانه‌ها صورت گزارش شده است (۴۲،۶). بررسی این نتایج به‌خوبی نشان می‌دهد که باززایی مستقیم جوانه‌ها به عواملی همچون ژنوتیپ، ترکیبات هورمونی و نوع جدا کشت بستگی دارد (۳۶،۲۸،۷،۱۸). هم راستا با تحقیقات پیشین، نتایج این مطالعه نیز نشان داد که نه تنها نوع ریزنمونه، بلکه موقعیت آن بر تولید جوانه موثر است. اعمال پیش تیمار روی منابع تأمین‌کننده ریزنمونه‌ها تأثیر چشم‌گیری روی توان باززایی بسیاری از گونه‌ها از جمله گونه‌های سرسختی مثل چغندرقند دارد (۹). حضور یک سیتوکنین (به طور معمول BAP) و یک اکسین (معمولاً IAA, NAA یا 2,4,D) در محیط‌های کشت اولیه برای تشکیل کالوس ضروری است. نسبت پایینی از اکسین به سیتوکنین باعث القاء تشکیل جوانه‌ها و نسبت بالای اکسین به سیتوکنین باعث القاء ریشه زایی در محیط کشت ثانویه می‌شود (۲۹،۱۰). برای مثال تأثیر پیش تیمار هورمونی در باززایی اندام هوایی در چغندرقند قبلاً گزارش شده است (۴۵،۴۴). زمانی‌فر و همکاران (۴۳) نشان دادند که بیشترین درصد تولید جوانه مربوط به ریزنمونه‌ی جوانه‌ی راسی، پس از آن مربوط به پهنک و دمبرگ است. این اختلاف نتایج بین تولید جوانه از ریزنمونه‌های پهنک و دمبرگ را می‌توان به ترکیب محیط کشت و وجود اکسین ذاتی در برخی از ریزنمونه‌ها مرتبط دانست. نوروزی و همکاران (۳۳)، با کشت جوانه انتهایی در محیط کشت حاوی هورمون‌های متمایزکننده نشان‌دادند که برگ‌ها به‌خوبی رشد پیدا کرده و ریزنمونه‌های مناسبی برای انتقال ژن تولید می‌کنند، زیرا این نوع ریزنمونه‌ها از توان باززایی مستقیم اندام هوایی برخوردار هستند. در این مطالعه، از دو محیط القا جوانه استفاده گردید. در محیط اول از بین هورمون‌ها ($۱/۵mgl^{-1}$) BA و ($۰/۵mgl^{-1}$) NAA اکسین فرآیند تمایززدایی بافتی را تحریک و سبب القاء خاصیت توتی پوتنسی در سلول‌ها می‌شود. این درحالی است که غلظت بالای سیتوکینین جوانه‌زایی مستقیم را تشدید می‌کند. در محیط کشت القا دوم با حضور BA($۰/۲۵ mgl^{-1}$) و IBA ($۰/۱ mgl^{-1}$) به مدت ۳ هفته، شرایط مساعدی برای ایجاد جوانه‌های زیاد به‌خصوص در اطراف رگبرگ اصلی فراهم می‌شود. قبلاً استفاده از این نوع فیتوهورمون برای ریخت‌زایی از ریزنمونه‌ی برگ چغندرقند در مطالعات قبلی پیشنهاد شده بود (۳۳،۲۱،۱۱). جوانه‌های رویشی حاصل از کشت دمبرگ اکثراً از نواحی برش یافته نزدیک به مریستم رأسی ظاهر می‌شوند. همچنین جوانه‌های نابجا به‌طور عمده بر روی سطوح فوقانی برگ و در نواحی نزدیک به‌رگبرگ‌ها تولید می‌شوند (شکل ۲). در ارتباط با تأثیر نوع ریزنمونه، مشاهده می‌شود که ریز نمونه‌های دمبرگ نسبت به پهنک در باززایی مستقیم جوانه‌های نابجا توانایی به مراتب بیشتری دارند. معمولاً ریزنمونه‌های دمبرگ بریده شده از گیاهچه‌های استریل نسبت به ریزنمونه‌های پهنک برگ یا دیگر ریزنمونه‌های بریده شده از گیاهچه‌ها، در باززایی مستقیم جوانه‌های نابجا کارایی بهتری دارد (۴۴،۴۲،۳۵،۸). سلول‌های نزدیک رگبرگ اصلی استعداد بیشتری برای تراریزش و باززایی دارند به‌طوری‌که باززایی با سرعت بالا در ریزنمونه برگ در حضور هورمون‌های BA و NAA سبب می‌شود تا سلول‌های اطراف رگبرگ اصلی در حالت توتی پوتنت قرار گیرند (۳۳). در تأیید این موضوع نوروزی (۳۴) نیز استفاده از ریزنمونه جوانه برگ را به دلیل داشتن یک منبع دائمی تولیدکننده این ریزنمونه‌ها، توصیه

نموده‌اند. باززایی مستقیم ساقه‌های نابجا از ریزنمونه‌های دمبرگ، از سلول‌های پارانشیمی زیر اپیدرم ناشی می‌شود (۴) و به همین دلیل استفاده از ریزنمونه لایه سلولی نازک برای باززایی مستقیم (۳) ساقه با موفقیت بالاتری همراه بوده است.

نتایج مقایسه میزان جوانه‌زنی در دو لاین SBSI-04 وSBSI-02 نشان داد که میانگین جوانه‌زنی در لاین SBSI-04 (۵/۹) بیشتر از لاین SBSI-02 (۳/۰) می‌باشد. متغیربودن ژنوتیپ در چغندرقند به‌دلیل وجود دگرگشنی طبیعی و هتروزیگوسی یک مسئله جدی برای باززایی (۹) و تراریزش (۱۱) است. به‌طورکلی، یکی از عوامل مؤثر در پاسخ چغندرقند به کشت بافت را می‌توان به محتوای ژنی آن در ژنوتیپ‌های متفاوت نسبت داد. برای مثال، مطالعه تولید کالوس در ۱۵ ژنوتیپ از چغندرقند نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند به سطوح مختلف اکسین و سیتوکنین پاسخ‌های بسیار متفاوتی می‌دهند (۱۷). اخیراً کاگامی و همکاران (۲۰) نشان داده‌اند که کالوس‌زایی و بازایی در چغند قند از نظر ژنتیکی توارث‌پذیر است.این موضوع به‌خوبی نشان می‌دهد که ژنوتیپ به‌خصوص منشأ ریزنمونه تاثیر بسزایی در موفقیت کشت بافت دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که ریزنمونه‌های حاصل از برگ‌های رشد یافته در بخش‌های داخلی ساقه، نسبت به برگ‌های رشد یافته در قسمت‌های بیرونی‌تر، در پیدایش مستقیم جوانه‌های نابجا پاسخ بهتری داشته‌اند. سن فیزیولوژیک بافت‌های که از آن‌ها ریزنمونه گرفته می‌شود در تولید جوانه‌های نابجا دارای اهمیت است. به‌طوری که بافت‌های جوان‌تر پاسخ بهتری نسبت به نمونه‌های مسن‌تر نشان می‌دهند (۲۶،۴۴،۸) در مطالعه حاضر، ریز نمونه‌های حاصل از برگ‌های داخلی سن کمتری نسبت به برگ‌های رشد یافته در قسمت‌های بیرونی دارند، لذا در پیدایش جوانه‌ها نیز، کارایی بهتری نشان داده‌اند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که با انتقال ریزنمونه دمبرگ از ساقه‌های نابجا رشد یافته بر روی برگ‌های حاوی پایه جوانه در روش باززایی مستقیم به محیط کشت MS حاوی هورمون‌های BA ($۰/۲۵ mgl^{-1}$) و IBA ($۰/۱ mgl^{-1}$)، امکان استفاده از این ریزنمونه برای تراریزش در عمل انتقال ژن بدون نیاز به کشت مجدد بذرها و تهیه جوانه انتهایی وجود خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه بر خود لازم می‌دانند تا از مساعدت‌های موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج در اجرای این تحقیق تشکر نمایند. همچنین از آقای دکتر پیمان نوروزی عضو هیات علمی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Butnko, R.G., A.I. Atanassov and V.V. Urmantseva. 1972. Some feature of sugar beet tissue cultures. Phytomorphology, 22: 140-143.
2. Catlin, D.W. 1990. The effect of antibiotics on inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugar beet (*Beta Vulgaris* L.). Plant Cell Reports, 9: 285-288.
3. Detrez, C., R.S. Sangwan and B.S. 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.
4. Detrez, C., T. Tetu, R.S. Sangwan and B.S. 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.
5. Dovzhenko, A. and H.U. Koop. 2003. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts. Planta, 217:374-381.
6. Freytag, A.H., S.C. Anand, A.P. Rao-Arelli and L.D. Owens. 1988. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. in vitro. Plant Cell Reports**,** 7: 30-34.
7. Gosak, M. and M. Szota. 1992. Micropropagation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Trisomics in vitro culture. Genetica Polonica, 33: 115-118.
8. Grieve, T.M., K.M.A. Gartland and M.C. Elliott**.** 1997. Micropropagation of commercially important sugar beet cultivars. Plant Growth Regulation, 21: 15-18.
9. Gürel, E., E. Topal and S. Gurel. 2003. The effect of pretreating seedlings with BAP on direct shoot regeneration from petiole explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L). Asian-Pacific Journal of Biology and Biotechnology, 11: 57-62.
10. Gürel, E. 1997. Callus and root development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): variability between cultivars. Turkish Journal of Botany, 21: 131-136.
11. Hisano, H., Y. Kimoto, H. Hayakawa, J. Takeichi, T. Domae, R. Hashimoto, J. Abe, S. Asano, A. Kanazawa 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 Reports**,** 22: 910-918.
12. Hooker, M.P. and M.W. Nabors**.** 1977. Callus initiation, growth, and organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Zeitschrift fur Pflanzen Physiologie, 84: 237-246.
13. Hussey, G. and A**.** Hepher. 1978. Clonal propagation of sugar beet plants and the formation of polyploidy by tissue culture. Annals of Botany, 42: 477-479.
14. Ivic-Haymes, S.D. and A.C. Smigocki. 2005. Biolistic transformation of highly regenerative sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Plant Cell Reports, 23: 699-704.
15. 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 Cellular and Developmental Biology-Plant, 41: 483-488.

16. Jacq, B., T. Tetu, R.S. Sangwan, A.D. Laat and B.S. Sangwan-Norreel. 1992. Plant regeneration from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured in vitroand flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants. Plant Cell Reports, 11: 329-333.
17. Jarl, C. and C.H. Bornman. 1986. Observations on genotypic variation in *Beta vulgaris* (sugar beet) tissues cultured in vitro. Hereditas, 105: 55-59.
18. Jianfeny, Z., L. Tianran and D. Xianglan. 1997. Highly efficient induction of sugar beet plant regeneration. Chinese Journal of Biothchnology, 13: 185-191.
19. Joersbo, M., S.G. Petersen and F.T. Okkels. 1999. Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. Plant Physiology, 105: 109-115.
20. Kagami, H., K. Taguchi, T. Arakawa, Y. Kuroda, H. Tamagake and T. Kubo. 2016. Efficient callus formation and plant regeneration are heritable characters in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), Hereditas, 153: 12 pp.
21. Khademi, M. and F. nazarian-firouzabadi. 2014. The influence of two types of hormones (BA and NAA) on appearance of shoot base explants in sugar beet (*Beta vularis* L.). Agricultural Biotechnology, 1: 47-52.
22. Khwaje poor, M. 2007. Industrial Plants. 3th edn. Jihad University unit Technology of isfahan, Iran, 580 (In Persian).
23. Kishchenko, E.M., I.K. Komarnitskii and N.V. Kuchuk**.** 2005. Production of transgenetic sugarbeet (*Beta vulgaris* L,) plants resistant to phosphinothricin. Cell Biology International, 29: 15-19.
24. Krens, F.A. and D. Jamar. 1989. The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.), Journal of Plant Physiology, 134: 651-655.
25. 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 Science, 116: 97-106.
26. Kuykendall, L.D., T.M. Stockett and J.W. Saunders. 2003. Rhizobium radiobacterconjugation and callus-independent shoot regeneration used to in-troduce the cercosporin export genecfpfromCercosporainto sugar beet (*Beta vulgaris* L,). Biotechnology Letters, 25: 739-744.
27. Lindsey, K. and P. Gallois. 1990. Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Experimental Botany, 41: 529-536.
28. 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: 325-333.
29. Mikami, T., R.N. Sudoh and T. Kinoshita. 1989. Genotypic variation in the in vitro morphogenesis from leaf explants of *Beta vulgaris* L. and *Beta maritima* L. Euphytica, 40: 271-273.
30. Mishutkina, Y.V. and A.K. Gaponenko. 2006. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) morphogenesis in vitro: Effect 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.
31. Murashing, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Plant Physiology, 15: 473-497.
32. Nissen, D. 1989. MSTATC users guide. Michigan state university, 249 pp.
33. Norouzi, P., M.A. Malboobi, K. Zamani and B. Yazdi-Samadi. 2005. Using competent tissue for efficient transformation of sugerbeet (*Beta vulgaris* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 41: 11-16.
34. Norouzi, P. 2012. Regeneration and transformation of haploid leaf and embryogenic tissues derived from ovule cultuer in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Journal of crop Breeding, 10: 63-79 (In Persian).
35. Ritchie, G.A., K.C. Short and M.R. Davey. 1989. In vitro shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Journal of Experimental Botany, 40: 277-283.
36. Sabir, A.A. and B.V. Ford-lioyd. 1991. Processing crop plant germplasm in vitro for mass production of regenerants: a case study with beet. Journal of Biotechnology, 17: 257-268.
37. Saunders, J.W. and W.P. Doley. 1986. One step shoot regeneration from callus of whole plant leaf explants of sugar beet lines and somaclonal variation of in vitro culture behaviour. Journal of Plant Physiology, 124: 473-479.
38. Saunders, J.W. and C.J. Tsai. 1999. Production of somatic embryos and shoots from sugar beet callus: Effects of abscisic acid, other growth regulators, nitrogen source, sucrose concentration and genotype. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 35: 18-24.
39. Sharma, H.C., K.K. Sharma, N. Seetharama and R. Ortiz. 2000. Prospect for using transgenic resistance to insect in crop improvement. Journal of Biotechnology, 3: 76-95.
40. Snezana, D., I. Haymes and A.N.N.C. Smigocki. 2005. Identification of highly regenerative plants within sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines for molecular breeding. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 41: 483-488.
41. 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 Reports, 18: 829-834
42. Toldi, O., G. Gyulai, J. Kiss, I. Tarns 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.
43. Zamanifar, M., F. Nazarian-Firouzabdi and A. Ismaili. 2016. Effect of two different cytokinin plant hormones on direct regeneration of diefferent sugar beet explant. Journal of crop Breeding, 19: 203-208 (In Persian).
44. Zhang, C.L., D.F. Chen and M.C. Elliott. 2001. Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 37: 305-310.
45. Zhong, Z., H.G. Smith and T.H. Thomas. 1993. In vitroculture of petioles and intact leaves of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Growth Regulation, 12: 59-66.

Adventitious Shoot Production using Petiole Explants through Direct Regeneration in Sugar Beet

Hossein Mazaheri Kohanestani[1], Farhad Nazarian-Firozabadi[2], Ahmad Ismaili[3] and Mitra Khadami[4]

1, 3 and 4- Graduated M.Sc. Student, Associate Professor and Ph.D. Candidate, Faculty of Agricultural, Lorestan University
2- Professor, Faculty of Agricultural, Lorestan University, (Corresponding author: nazarian.f@lu.ac.ir)
Receive: September 30, 2016 Accepted: May 24, 2017

Abstract

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is one of the two very important sugar crops in the world. Transgenic experiments, including tissue culture practices play a pivotal role in the investigation of the any gene function as well as introducing new functionally important genes. Tissue culture is inevitably required to employ any transgenic methods for making transgenic plants. Therefore, to find an appropriate explant to produce adventitious shoots in recalcitrant sugar beet plants without continuous seed germination, a completely randomize design (CRD) was carried out in a factorial arrangement. The adventitious shoots produced on leaves through direct regeneration method, were used as *in vitro* explant. Petiole and leaf disc explants were studied in two positions, located close and far from terminal buds in two sugar beet lines (SBSI-04, SBSI-02). After four weeks and two consecutive sub-culturing in MS basal medium supplemented with IBA (0.1 mgl^{-1}) and BAP (0.25 mgl^{-1}) hormones, the number of shoots were counted and compared as percentage. Results of this study showed that the petiole explant produced the highest number of shoots. Furthermore, the number of the shoots was higher in SBSI-04 line than SBSI-02 line. Interestingly, the position of leaf explants had a significant effect on the number of shoots produced. Interior petiole explants, produced more shoots in SBSI-04 line as compared to the leaves farther than terminal buds, suggesting for producing transgenic sugar beet plants, interior petiole explants are recommended.

Keywords: Direct Regeneration, Explants, Growth hormones, Petiole, Transformation