دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

باززایی و تراریختی در برگ و بافت جنین‌زای هاپلوئید حاصل از کشت تخمک چغندرقند

پ. نوروزی[1]

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

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴

چکیده

به منظور استفاده از بافت هاپلوئیدی گیاه چغندرقند 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. بدین‌ترتیب 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 نگه داری در کشت توام به محیط گزینش حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین منتقل شدند. پس از ۵-۳ 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.

واژه های کلیدی: هاپلوئید، جنین، آگروباکتری، چغندرقند، تراریختی

مقدمه

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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 چغندرقند راهی جدید را برای اصلاح این گیاه در زمانی کوتاه فراهم می‌نماید. استفاده از آگروباکتری برای انتقال T-DNA حاوی ژن (های) موردنظر به ژنوم گیاهان دولپه‌ای از روشهای موفق ایجاد گیاهان تراریخته به شمار می‌رود (۱).

مهندسی ژنتیک چغندرقند دارای مشکلاتی تکنیکی است و بعنوان یک گیاه سرسخت نسبت به تراریختی معرفی می‌شود (۷، ۲۳،۱۳ و ۲۴). لیندسی و گالوئیس (۱۸) از پهنک برگ حاوی پایه جوانه، هالووین و همکاران (۱۲) از کالوس جنین‌زا و سیستم اگروباکتری برای تراریختی چغندرقند استفاده کردند. هال و همکاران (۱۱) با استفاده از روش پلی اتیلن گلیکول توانستند برای اولین بار از پروتوپلاست سلولهای محافظ روزنه برگ چغندرقند به منظور تراریختی استفاده نمایند. کرنز و همکاران (۱۷) از گره کوتیلودن، مانرلوف و همکاران (۲۰) از برگ های کوتیلدونی، اشنایدر و همکاران (۲۶) از کوتیلدون و کالوس جنین‌زای حاصل از هیپوکوتیل و پهنک برگی، 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 برگ‌حاصل از جوانه رأسی[1]، یانگ و همکاران (۲۸) از غنچه‌های گل‌آذین با سیستم آگروباکتری برای تراریختی چغندرقند استفاده کرده‌اند. ایویک-هیمز و اسمیگوکی (۱۴) از پهنک برگی به طور مستقیم در بمباران ژنی به منظور تراریختی چغندرقند 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 جداکشت برگ حاصل از پایه جوانه (حاصل از کشت جوانه راسی) با سیستم انتقال ژن توسط آگروباکتری می باشد. دای و همکاران (۵) و جلوین (۱۰) اظهار کردند که برای تراریختی گیاهان عالی، روش انتقال ژن بواسطه آگروباکتری 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 چغندرقند برای تولید

1- Shoot apex

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

هاپلوئیدی از کشت تخمک تلقیح نشده و تولید کالوس جنین‌زای هاپلوئید استفاده می‌گردد (۲). از بافت‌های هاپلوئیدی حاصل می‌توان برای تراریختی چغندرقند استفاده نمود و پس از تولید گیاهان هاپلوئید تراریخته با استفاده از کولشیسین 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 نمی باشد. بدین ترتیب عملا زمان صرف شده برای اعمال روش‌های اصلاحی در تولید گیاه تراریخته موردنظر کاهش می‌یابد (۱). در منابع چغندرقند تا به حال گزارشی مبنی بر تراریختی بافت هاپلوئید دیده نشده است، ولیکن از کالوس جنین‌زای دیپلوئید چغندرقند 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 چغندرقند، ابتدا یک سری آزمون جوانه‌زایی و سپس تراریختی بافت‌های جنین‌زا و برگ جوانه هاپلوئید با آگروباکتریوم تومه‌فاسینس صورت گرفته است.

مواد و روشها

مواد گیاهی: در این تحقیق از کالوس جنین‌زای هاپلوئید حاصل از کشت تخمک رگه گرده دهنده منوژرم ۲۶۱ چغندرقند و برگ جوانه های 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 تغییریافته (۶) با ترکیبات هورمونی مختلف با ۳-۱ درصد ساکارز و حدود ۰/۹-۰/۸ درصد آگار با pH= ۵/۸-۵/۵ بودند.

احیاء بافت‌های جنین هاپلوئید: کالوس‌های جنین‌زا که از کشت تخمک چغندرقند توسط آزمایشگاه کشت بافت مؤسسه تحقیقات چغندرقند 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

انتقال آنها به محیط جامد دارای ترکیب هورمونی اولیه (۰/۲ mgl^{-1} BA+۰/۵ mgl^{-1} 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 ۰/۲ mgl^{-1} BA+۰/۵mgl^{-1} NAA، آزمونی در ۶ تیمار حاوی ترکیبات هورمونی NAA,BA و 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.

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

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

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.

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

درصد آگار استفاده گردید. نتایج پس از ۳ هفته از شروع کشت یادداشت‌برداری شدند.

بررسی جوانه‌زایی از برگ جوانه هاپلوئید: با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های انجام گرفته در خصوص جوانه‌زایی مستقیم از برگ حاصل از کشت بافت ارقام دیپلوئید چغندرقند، برای برگ هاپلوئید چغندرقند نیز مانند برگ دیپلوئید از ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر BA و یک میلی‌گرم 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.

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

تیمار	محیط کشت پایه	درصد ساکارز	سایرمواد افزودنی (میلی‌گرم در لیتر)	درصد توده‌های کالوس تولیدکننده جوانه سبز	مشخصات جوانه‌ها
۱	PGOB/۲	۱	-	۸۷[a]	جوانه‌های جنینی یا نابجای ریز تا متوسط
۲	PGoB/۲	۳	-	۹[c]	"
۳	PGoB/۲	۳	۰/۲ GA_3	۱۰[c]	"
۴	PGoB/۲	۳	۱۲ $AgNO_3$	۹[c]	"
۵	PGoB	۳	-	۱۴[bc]	"
۶	MSB	۳	-	۱۹[bc]	"
۷	MSB/۲	۳	-	۷/۵[c]	"
۸	MSB/۲	۱	-	۹۰[a]	جوانه‌های‌جنینی 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 چغندرقند

تیمار	محیط کشت پایه	درصد ساکارز	BA (میلی‌گرم در لیتر)	وضعیت جوانه‌زایی
۱	MSB/۲	۱	۰	بیش از ۳۰ توده مجتمع ۱۰-۵ تائی از جوانه‌های نابجا یا جنینی ریز
۲	MSB/۲	۱	۰/۵	۱۸ توده مجتمع ۱۰-۵ تائی از جوانه‌های نابجا یا جنینی ریز
۳	MSB/۲	۲	۰/۵	۱۸ توده مجتمع ۱۰-۵ 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

کشت باکتری و محیط القاء: برای بدست آوردن سوسپانسیون باکتری جهت استفاده در تلقیح بافت‌های جنینی و برگ جوانه‌هاپلوئید از کشت شبانه آگروباکتری در محیط LB به همراه آنتی‌بیوتیک مناسب روی شیکر ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای $28\ C^o$ استفاده گردید. کشت شبانه به طور مستقیم و یا پس از افزودن ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگان و ۵-۲

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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

تلقیح و کشت توام (Co-culture) بافت‌های گیاهی: با انتقال بافت‌های گیاهی درون محیط القاء 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 ۳-۲ روز در اتاق رشد نگهداری شدند (جداول 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 مختلف گزینش 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 آخر از ۱۵۰ به ۵۰ میلی گرم در لیتر کاهش یافت. همچنین در بعضی موارد در اولین زیرکشت از محیط گزینش فاقد کانامایسین استفاده گردید تا امکان رشد سلولهای تراریخته و غیرتراریخته همزمان فراهم گردد.

ارزیابی تظاهر ژن GUS: برای تایید سلولها و بافت های تراریخته در جوانه‌های تشکیل شده در محیط گزینش از روش تغییر یافته جفرسون و همکاران (۱۶) با سوبسترای X–gluc (5-bromo-4-chlro-3-indolyl B-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 داده ها به کار رفت و مقایسه میانگین ها به روش دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

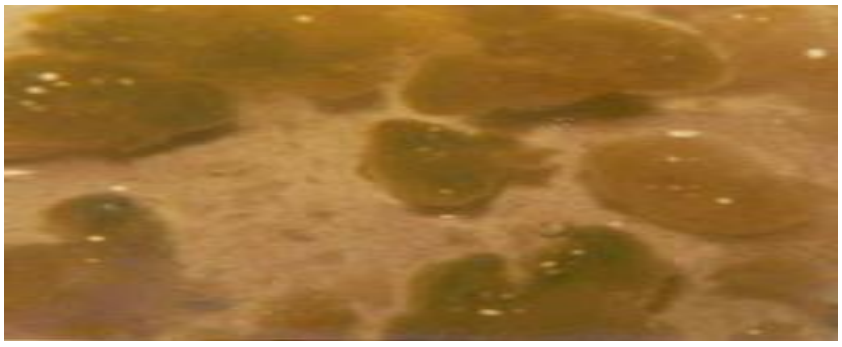
برای انجام تراریختی بافت‌های جنینی نیاز به مقدار زیادی بافت کالوس جنین‌زا بوده که از نظر تکاملی نیز ترجیحاً در مرحله‌ای مشابه بوده باشند تا بتوان به حداکثر جنین و جوانه‌های تراریخته از مقدار مشخصی بافت جنین‌زا دست یافت.

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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

همانطور که از جدول ۱ بر می آید، تیمار ۴ بیشترین تولید جنین و تیمار ۵ بیشترین تکثیر کالوس جنین زا 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 قبلا 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 ۶-۴ هفته نگهداری شده سپس به محیط PGo حاوی یک میلی گرم در لیتر NAA و BA به مدت ۲-۱ هفته در تاریکی و دمای C^o ۲۶ منتقل شدند سپس برای سه هفته در شرایط نوری ۱۷ ساعت روشنائی، ۷ ساعت تاریکی در C^o ۲۶ 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).



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

با توجه به نتایج جدول ۲ به نظر می‌رسد استفاده از محیط کشت MSB/۲ به همراه یک درصد ساکارز مناسب‌ترین محیط جهت تولید جوانه‌ها از بافت‌های جنینی و رشد آنها باشد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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 افزایش ساکارز (۹) به شدت جوانه زائی را کاهش می دهد. 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 لیترBA 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 زائی از کالوس به مقدار زیاد شدند.

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

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 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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 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.

جدول ۴- نتایج رشد جوانه حاصل از جنین هاپلوئید رگه ۲۶۱ چغندرقند در محیط های کشت مختلف

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

جوانه‌زایی از برگ جوانه‌های هاپلوئید: برگ‌های جوانه هاپلوئید در ترکیب هورمونی NAA ۱ mgl^{-1} +BA ۱ mgl^{-1} تولید جوانه‌های رویشی فراوانی از سطح برگ نمودند و این جوانه‌ها که جهت ادامه رشد به ساکارز 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.

شکل ۳- باززائی جوانه از برگ هاپلوئید.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

نتایج تراریختی بافت‌های کالوس جنین زای 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 ممانعت کنندگی 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 LBA4404 حامل پلاسمید pBi 19CAT (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 چغندرقند*

شرایط کشت باکتری	شرایط نوری کشت توام	تعداد جنین‌های رنگ‌آمیزی شده	درصد جنین‌های GUS^+
افزودن ۱۰۰ µM استوسرینگان به کشت شبانه باکتری و ۵ ساعت ادامه شیکر	Dim	۱۵	۲۰[a]
کشت شبانه باکتری بدون افزودن استوسرینگان	تاریکی	۳۰	۱۳[b]

*: در این بررسی سویه آگروباکتری C585C1 حامل پلاسمید pB1121 با ۱ =OD_{600} پس از سانتریفوژ در دمای آزمایشگاه، به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۵۰۰$_{rpm}$ در محیط القاء شامل استوسرینگان ۱۰۰ µM+ ساکارز ۵٪ + PGoB/۲ تعلیق شده و برای تلقیح بافت به مدت چند ثانیه استفاده گردید. دمای کشت توام ۲۵C°-۲۲ 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. میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می باشند.

در ارتباط با اثر آنتی بیوتیک ها در محیط گزینش، به نظر می رسد (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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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

شکل ۴- جنین های تراریخته رنگ آمیزی شده با X-gluc آبی شده اند.

جدول ۶- اثر آنتی‌بیوتیک‌های محیط گزینش بر درصد جنین‌های GUS^+ حاصل از تراریختی کالوس جنین‌زای هاپلوئید رگه ۲۶۱ چغندرقند پس از کشت توام به مدت ۲ تا ۳ روز

روش	آنتی‌بیوتیک در محیط گزینش برحسب میلی‌گرم در لیتر			تعداد جنین‌های رنگ‌آمیزی‌شده	درصد جنین‌های GUS^+
	سفوتاکسیم	ونکومایسین	کانامایسین		
یک	۰	۳۰۰	۵۰	۲۳	۱۹[a]
دو	۲۵۰	۰	۵۰-۱۵۰	۲۶	۱۷[a]

*: در این بررسی سویه آگروباکتری C585C1 حامل پلاسمید pB1121 با OD_{600}= ۱ پس از سانتریفوژ در دمای آزمایشگاه، به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۵۰۰rpm در محیط القاء شامل استوسرینگان ۱۰۰µM+ ساکارز ۵٪ + PGoB/۲ تعلیق شده و برای تلقیح بافت به مدت چند ثانیه استفاده گردید. دمای کشت توام ۲۵°C-۲۲ 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. میانگین های با حروف مشابه، در سطح یک درصد در یک گروه می باشند.

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 به دست آمد. شرایط آزمایش مربوطه به شرح زیر بود: افزودن استوسرینگان ۱۰۰ µM به کشت شبانه باکتری و ۲ ساعت ادامه کشت، سپس رسوب‌دهی باکتری و تعلیق آن در محیط القاء شامل استوسرینگان ۱۰۰ µM+ ساکارز ۵٪ + PGoB/۲ برای القای ژن‌های *Vir* انجام گرفت. استفاده از ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

سفوتاکسیم و ۱۵۰ و ۱۰۰، 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 چغندرقند یک سری آزمایش‌ها با دو نوع بافت هیپوکوتیل و کوتیلدون در چندین ژنوتیپ چغندرقند 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.

در این روش شدت رنگ عصاره کالوس پس ازافزودن 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 چغندرقند را با یکدیگر مقایسه نمودند. در روش اول از آگروباکتری و جدا کشت کوتیلدون و در روش دوم از بمباران ژنی روی کالوس جنین زای 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.

شکل ۵- برگ جوانه های تراریخته رنگ آمیزی شده با X-gluc آبی شده اند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

لیندسی و گالوئیس (۱۸) پس از تراریختی پایه جوانه کشت بافت چغندرقند 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 انتخاب گر مناسب برای آزمایش‌های تراریختی چغندرقند نبوده و تعداد زیادی از سلولهای غیرتراریخته فرصت رشد و تکثیر و تولید جوانه می‌نمایند. مشکل دیگر تراریختی چغندرقند تولید جوانه های تراریخته شیمر (chimer) می‌باشد. در این نوع جوانه ها که درصد بالائی از کل جوانه های تراریخته را شامل می‌شوند تنها بخشی از برگ یا پایه جوانه بیان ژن GUS را نشان می دهند. 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 قابل گزینش *npt-II* برای تراریختی جدا کشت‌های جوانه و کالوس‌های جنین زای چغندرقند 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 ۵-۲ درصد حاصل گردید. مزیت ژن گزارشگر GFP نسبت به GUS عدم نیاز به سوبسترا و بافر رنگ آمیزی است و در نتیجه بافت تراریخته حامل ژن GFP را می توان 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 چغندرقند برای تراریختی با سیستم آگروباکتری سویه C58C1 استفاده نمودند. آنها اثر هورمونهای 2, 4-D و NAA را در پیش کشت بافت روی میزان باززائی و فراوانی تراریختی بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که حضور NAA در پیش کشت 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 پیش کشت و کشت توام باعث افزایش نرخ تراریختی از بافت های به کار رفته شد. در حین بررسی های مربوط به باززائی و تراریختی برگ جوانه هاپلوئید چغندرقند مشاهده گردید که اغلب برگهای جوانه های حاصل از این جداکشت توانائی جوانه زائی زیادی دارند. از آنجا که سلول های تراریخته بایستی توانائی باززائی نیز داشته باشند، از این رو برگ های حاصل از جوانه های کشت بافت به عنوان بافتی مناسب برای آزمون های تراریختی استفاده شدند. برای تراریختی این جداکشت، مشاهدات و نتایج زیر قابل ذکر است: معمولا پس از گذشت یک تا دو هفته از زمان تلقیح با آگروباکتری، جوانه ها شروع به پدیدار شدن می‌نمایند. این جوانه ها معمولاً از محل

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

دمبرگ اصلی عمدتاً در محل بین دمبرگ و پهنک برگ ظاهر می‌شوند. در این مرحله، چند حالت قابل مشاهده است. برخی از برگ ها یا قدرت باززائی ندارند و یا چون ژن مقاومت به کانامایسین را دریافت نکرده‌اند در محیط گزینش بدون تولید جوانه، زرد و سپس نکروزه شده و از بین می‌روند. برخی از برگ ها در ابتدا تولید جوانه ای می‌نمایند که پس از مدتی در اثر کانامایسین سفیده شده و از بین می‌رود. معمولا جوانه های حساس به کانامایسین، غیرتراریخته محسوب می شوند. در این بین جوانه‌هایی سبز تولید می شوند که حالت سبز بودن خود را در محیط گزینش تا چندین واکشت حفظ می کنند. جوانه های سبز قابل تقسیم به دو دسته هستند: دسته اول جوانه هایی بوده که به نحوی از اثر سوء کانامایسین مصون مانده‌اند ولی در رنگ آمیزی GUS، آثار تظاهر ژن در آنها مشاهده نمی‌شود. این جوانه ها حالت فرار (escape) از کانامایسین داشته‌اند و غیرتراریخته محسوب می‌شوند، گرچه احتمال خاموشی ژن را نمی‌توان از نظر دور داشت. دسته دوم جوانه های سبز تراریخته هستند که هم مقاوم به کانامایسین هستند و هم در سنجش فعالیت آنزیمی، GUS^{+} هستند. بنابراین میتوان دو دسته جوانه را از هم تشخیص داد. همچنین مشاهده گردید که گاهی هم از جدا کشت برگ در محل انتهای دمبرگ تولید کالوس و یا جنین می‌گردد. با استفاده از رنگ‌آمیزی GUS روی کالوس‌های تشکیل شده از برگ مشخص گردید که درصد بالائی از آنها تراریخته هستند. بنابراین اگر این کالوس ها جدا شده و به محیط‌های باززائی جوانه از کالوس منتقل شوند می‌توان به درصد بالاتری از جوانه های تراریخته دست یافت. البته در جوانه زائی 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 جوانه زائی مستقیم از برگ، جوانه زائی غیرمستقیم با فاز کالوس و یا جنین زائی پیش رفت و حداکثر جوانه تراریخته را نسبت به یک جداکشت بدست آورد. مزیت دیگر استفاده از برگ جوانه کشت بافت، داشتن یک منبع دائمی تولید کننده جداکشت است. زیرا در این روش پس از استفاده از برگ های خارجی جوانه برای تراریختی می‌توان باقیمانده جوانه را به محیط ازدیادی منتقل نمود تا در آنجا مجدداً رشد و تکثیر کند و به عنوان منبع جدید جدا کشت جهت تراریختی مجدد به کار گرفته شود.

با توجه به نتایج حاصل از تراریختی بافت کالوس جنین‌زا و نیز برگ جوانه هاپلوئید 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

تشکر و قدردانی

از مدیریت محترم موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند به خاطر فراهم نمودن امکانات اجرای این پژوهش قدردانی می شود.

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 51st 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. Shimamato. 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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: β-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. Mannerllof, M., S. Tuvesson, 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 *cry1Ab* 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. Eliott and A. Slater. 2001. Use of the GFP reporter gene as a vital marker for *Agrobacterum*-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Mol. Biotech., 17: 109-117.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]

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

P. Norouzi[1]

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 mgl^{-1} BA and 0.5 mgl^{-1} 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 mgl^{-1} BA and 1 mgl^{-1} 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 mgl-1 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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-06-08]