نتایج تحقیقات مقدماتی کشت بافت چغندرقند درایران

از : محمود مصباح

۱ــ خلاصه

از سال ۱۸۳۸ که SCHLEIDEN , SCHWANN فرضیه TOTIPOTENCY یعنی " وجود قابلیت ژنتیکی در هر سلول گیاهی برای تولید یک گیاه کامل " را مطرح نمودند تا به امروز کوششها و تحقیقات گسترده‌ای توسط محققین مختلف درمراکز علمی جهان برای کشت سلول و بافت گیاه هان مختلف و از آن جمله چغندر قند در محیط غذائی مصنوعی صورت گرفته و موفقیت های چشم گیری نیز دراین زمینه حاصل آمده است .

موفقیت های بدست آمده در زمینه کشت بافت چغندر موجب گشته است که اکثر موٴسسات تولید کننده بذر چغندر قند استفاده از تکنولوژی کشت بافت را در اولویت های تحقیقاتی خود قرار دهند .

درایران موٴسسه تحقیقات چغندرقند هماهنگ با سایر موٴسسات تحقیقاتی چغندر قند خارج از کشور از سالها قبل در صدد بهره گیری از این تکنولوژی در بهنژادی چغندرقند برآمده و از سال ۱۳۶۴ تحقیقاتی را بطور مقدماتی در زمینه ازدیاد رویشی چغندر قند در محیط غذایی مصنوعی شروع نموده که ماحصل آن بشرح زیر میباشد .

پس از تهیه و تدارک وسایل و مواد اولیه مورد نیاز محیط کشت PGOB شامل ماکروالمنت هامیکروالمنت‌ها ، ویتامین ها ، با نسبت های معین آماده‌گردیدوهورمونهای گیاهی Kinetin واسید ژیبرلیک به آن افزوده شد (محیط A) .

محیط کشت آماده شده در ظروف شیشه‌ای (ارلن) مخصوص کشت ریخته شد و درداخل اتوکلا و بمدت ۲۰ دقیقه استریل گردید . جوانه انتهائی شاخه های گل دهنده در چغندر قند (قبل از باز شدن گل‌ها) بطول پنج میلی متر از گیاه جدا و با محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰% ضد عفونی و روی محیط کشت فوق انتقال یافت .

بافت های کشت شده تحت رژیم روشنایی مناسب (لوکس ۲۰۰۰ ، h ۱۶/۸ ــ ۸) و دمای ۲۵ درجه شروع به تولید توده های سلولی (کالوس) در قسمت انتهائی وسپس جوانه های (Shoot) جدید در قسمت هوایی نمودند، تعداد جوانه های ایجاد شده بعد از چهار هفته به بیش از ده عدد و طول آنها به ۳ تا ۴ سانتی متر رسید .

---

* PGOB : محیط کشت فرموله شده توسط JACOBS , GREEF

برای ازدیاد مجدد جوانه ها و تحریک آنها به ریشه زایی، جوانه‌ها از کالوس مادری جدا و به محیط دوم (B) شامل محیط PGOB + NAA* + IBA** انتقال یافتند بافت ها در روی محیط جدید طی مدت چهار هفته مجددا" تولید جوانه نمودند ، ضمن اینکه توده سلولی نیز در قسمت انتهائی آنها تولید و گسترش یافت ، جوانه هائی که بیش از چهار هفته روی این محیط باقی‌ماندند تولید ریشه های کوتاهی نمودند که مطلوب نبود و میبایست به محیط (E) یعنی محیط کشت PGOB بدون هورمون منتقل میشدند ، جوانه ها در روی محیط بدون هورمون در مدت ۲۰ تا ۲۵ روز ریشه دار شدند وگیاهان کامل بوجود آمد .

گیاهک های ریشه دار شده بعد از این مدت به گلدانهای حاوی مخلوط سیلیس و تورب انتقال یافت و بمرور با شرایط جدید تطبیق پیدا کرده و شروع به رشد طبیعی نمودند .

بهرحال توفیق در ازدیاد غیر جنسی چغندرقند در ایران نوید بخش دستیابی به امکانات علمی و فنی جدید در بهبود روشهای بهنژادی چغندرقند میباشد . قدر مسلم از قوه به فعل درآوردن عملکرد کشت بافت در عرصه تولید بذر چغندر قند مرغوب با هزینه کمتر مستلزم پی گیری و تداوم تحقیقات کشت بافت در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مناسب خواهد بود .

---

* NAA اسید نفتالین استیک

** IBA اسید ایندول بوتریک

۲ ــ مقدمه و هدف :

چغندر قند از جمله محصولات استراتژیک مهم میباشد که در سالهای اخیر در زمینه تولید شکر از چغندر قند فعالیتهای گسترده‌ای در دنیا صورت گرفته است . عوامل گوناگونی در تولید چغندرقند موثر میباشند که بذر ازآن جمله است و برای تهیه و تولید بذر اصلاح شده مرغوب فعالیتهای وسیعی پیوسته در جهان انجام می پذیرد و بین واحدهای تولید کننده همواره رقابتهائی برای کسب بازار های جهانی وجود دارد .

بهنژادی چغندرقند بدلیل آلوگام بودن این گیاه مستلزم صرف وقت بسیاروتلاشهای پی‌گیری میباشد و بعضاً فعالیت های‌گسترده‌در طول ۲۰ سال منتهی به ایجاد یک رقم بذر جدید میشود . خوشبختانه درایران کارهای مربوط به اصلاح بذر چغندر قند در موسسه تحقیقات چغندرقند طی چهار دهه گذشته از تداوم مناسبی برخوردار بوده ومنتهی به نتایج‌مطلوبی‌شده‌است که ماحصل‌آن تامین بذر مورد نیاز ۳۵ کارخانه قند کشور و ایجاد ظرفیتهای لازم درجهت صدور بذر به خارج از کشورمیباشد . ولی بموازات پیشرفت در تهیه وتولیدبذرچغندرقندمشکلات وتنگناهای عدیده بهنژادی نباتات آلوگام نمایان میگرددکه بصورت خلاصه میتوان تنگناهای موجودرا بشرح زیرگروه بندی‌نمود :

- ایجادارقام متناسب با شرایط آب‌و هوائی مناطق مختلف چغندرکاری کشور بابرخورداری از صفات کمی وکیفی مطلوب ،
- ایجادارقام مقاوم به آفات وبیماریهای غالب و عمده مناطق مختلف چغندرکاری‌کشور ،
- ایجادارقام خاص با خصوصیات‌مناسب برای مناطق‌دارای‌شرایط اقلیمی خاص متفاوت از سایر مناطق چغندرکاری کشور(مثل خوزستان)

بهر حال مشکلات و تنگناهای متفاوت و متنوعی در بهنژادی چغندرقند وجود دارندکه فوقاً " بعضی موارد‌ی اشاره‌گردید . محققان‌بهنژادی چغندرقنددرمجموع براین اعتقادهستندکه روشهای معمول و مرسوم توان تامین اهداف و نیازهای بهنژادی این نبات‌را نداشته‌و با صرف وقت بسیار که بعضاً قریب دو دهه بطول میانجامد ، ایجادارقامی که از جمیع جهات مطلوب

باشد غالبا " قرین موفقیت نمی باشد که این معضل عمدتا " ناشی از وضعیت ژنتیکی چغندرقند بوده وابستگی با شرایط بهنژادی نباتات اتوگام تفاوت دارد . بسیاری از کشورهای پیشرفته فعالیتهای وسیعی را در بهره وری از تکنولوژی نوین در بهنژادی چغندرقند بخدمت گرفته اند و امید میرود که در آینده شاهد پیشرفتهای شگرف جهانی دراین زمینه باشیم . البته این تلاش و ممارست کشورهای پیشرفته ضمن ایجاد امیدواری میتواند عامل هشدار دهنده‌ای نیز بشمار آید زیرا استفاده ازتکنولوژی نوین درآینده ای نه‌چندان دورخواهدتوانست بعنوان عاملی قوی و مثبت درحل مشکلات بهنژادی چغندرقندبکار رودو بیم آن میرود که بهنژادی و تولیدبذرچغندرقنددرایران تا آن زمان نتوانسته باشد به موازات سایرکشورهابه نحومطلوب ازاین تکنیک استفاده نماید .

با برخورداری از تسهیلات تکنولوژی نوین ، استفاده از روشهای متعددی از جمله هوتاسیون ، هیبریداسیون بین گونه ای ، مهندسی ژنتیک ، کشت بافت و ..... در بهنژادی چغندر قند مطرح میباشد . بعنوان اولین گام در سطح محدود و بصورت مقدماتی روش کشت بافت در چغندر قند پی گیری و خوشبختانه علیرغم در دسترس نبودن امکانات فنی و آزمایشگاهی برای اولین بار در ایران نتایج مطلوبی ببار آورد . بدین ترتیب که با کشت قسمت انتهائی شاخه گل دهنده درمحیط غذائی جوانه های جدید تولید گردید و پس از ریشه دار شدن ، گیاه حاصل از کشت بافت به گلدان انتقال یافت . عملیات انجام شده برای انتخاب و کشت بافت و نتایج حاصل از آن بحث اصلی این مقاله میباشد که در نوع خود اولین کاری است که در زمینه ازدیاد رویشی چغندرقند در ایران انجام گرفته است . قابل توجه است که طراحی و اجرای آزمایش کشت بافت چغندر قند در طول مدت یکسال در موسسه تحقیقات چغندر قند و با استفاده از امکانات آزمایشگاهی محدود و با ساختن لوازم و دستگاههای ابداعی انجام پذیرفت .

قطعا " با پی گیری تکنیک کشت بافت بخشی از مشکلات و تنگناهای موجود بهنژادی چغندر قند مرتفع خواهد گردید و به لحاظ آن میتوان امیدوار بود که اهداف مندرج در ذیل تامین گردد :

- تولید انبوه اشکال مطلوب ژنتیکی در مدت زمان کوتاهتر (پایه های نرعقیم ، اوتایپ ، ارقام مقاوم .....) ،
- ایجاد شرایط عملی در حفظ ژرم پلاسم های مطلوب ،
- ایجاد لاینهای هموزیگوت (از طریق کشت دانه گرده ، اوول ....) ،
- فراهم آوردن امکان باروری در هیبریداسیون بین گونه‌ای (ازطریق کشت و امتزاج پروتوپلاست) .

تاریخچه کشت بافت در محیط غذائی مصنوعی :

تاریخچه کشت بافت در جهان :

در سال ۱۸۳۸ فرضیه TOTIPOTENCY یعنی "هرسلول گیاهی قابلیت ژنتیکی تولید یک گیاه کامل را دارد" ، توسط SCHLEIDEN, SCHWANN ارائه گردید . پس از آن در سال ۱۹۰۲ فردی فرانسوی بنام HABERLANDT موضوع کشت بافت را فرموله نمود و اولین کشت بافت را انجام داد ، که نتیجه موفقیت آمیز نبود . طی سالهای ۱۹۰۹ – ۱۹۰۷ اولین موفقیت ها در کشت بافت انسانی و حیوانی توسط HARRISON و BURROWS و CARREL گزارش شده است . همچنین در سالهای ۱۹۳۹ – ۱۹۳۲ تولید یک گیاه کامل از طریق کشت بافت توسط NOBECOURT, GAUTHERET و WHITE عنیت یافت* (۱۴) تشکیل جنین غیرجنسی ازطریق کشت سلولی در هویج توسط STEWARD و REINERT و همکارانشان در سال ۱۹۵۸ تایید دی بر فرضیه TOTIPOTENCY بود (۱۳) .

سال ۱۹۷۰ انستیتو فیزیولوژی دانشگاه علوم شوروی کشت کالوس چغندر قند ازطریق بذر، ریشه ،کوتیلیدون ،هیپو کوتیل ، گیاهچه های هشت روزه و ریشه های سیلوشده درمحیط B5** تغییر یافته ، را گزارش نموده است . همچنین درسال ۱۹۷۲ MALYUK موفق گردید ازریشه کامل چغندر تریپلوئید در محیط تغییر یافته SH*** کالوس تولید نماید . تلاش های MONIFOLD (اقتباس از مرجع شماره ۱۲) بمنظور کشت بافت در محیط غذائی مایع قرین موفقیت نبود ، زیرا در محیط کشت مایع سلولهای کالوس ازهم بسادگی جدا نشده وبشکل توده فشرده‌ای باقیمانده و به رشد خود ادامه دادند . درسال ۱۹۸۳ تحقیقات ILIENKO ثابت نمود که تولید درصد بالائی گیاهچه از بافت های مختلف چغندرقند در محیط غذائی مصنوعی امکان پذیر میباشد (۱۲) .

---

* داخل پرانتز شماره مرجع و منبع مورد استفاده آمده است .

** B5 محیط کشت فرموله شده توسط Gamborgetal

*** SH محیط کشت فرموله شده توسط Schenk and Hildebract

انستیتو گیاه شناسی دانشگاه TILMAN بلژیک در سال ۱۹۸۱ چهار روش برای ازدیاد رویشی چندرقند در محیط غذائی مصنوعی ابداع و اعلام نمود . که این روشها عبارتند از تشکیل کالوس از برگ که حاصل آن ایجاد یک گیاه کامل بود ، تولید جوانه های جانبی از گل آذین که در محیط BM با هورمونهای مختلف،انبوهی از جوانه های جانبی را ایجاد نمود ، تولید جوانه های جانبی از بذر در محیط BM با هورمونهای مختلف و چهارمین روش عبارتست از کشت برگ و دمبرگ جوانه های جانبی حاصل از کشت گل آذین (۷).

در سال ۱۹۸۲ بخش کشاورزی دانشگاه ایالت میشیگان آمریکا ازدیاد رویشی چغندر قند در محیط مصنوعی را بانجام رسانید که ماحصل آن ایجاد کالوس و گیاهچه از جوانه چغندر قند در محیط LS محتوی هورمون BA بود (۱۶).در انگلستان نیز فعالیتهائی در زمینه کشت بافت انجام گرفته است که HUSSEY و HEPHER در سال ۱۹۷۸ بذر چغندرقند را در محیط غذائی MS با $\frac{1}{2}$ غلظت میکروالمنت‌های محلول غذائی استاندارد ، کشت نموده و پس از تولید جوانه ازکوتیلیدون و هیپوکوتیل درمحیط غذائی مصنوعی امکان ازدیاد رویشی چغندر قند را به اثبات رساندند (۱۰) .

علاوه بر ازدیاد رویشی چغندرقند در محیط غذائی مصنوعی ، تحقیقاتی نیز در زمینه کشت پروتوپلاست (۱۷) و کشت پرچم چغندرقند صورت گرفته است (۱۵) .

تاریخچه کشت بافت چغندرقند در ایران .

موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند در ایران کلیه امور تحقیقاتی بهنژادی و بهزراعی و تکنولوژی چغندر را بعهده دارد .درگذشته هیچگونه تحقیقی درزمینه کشت بافت چغندرقند در این موسسه انجام نشده است . تحقیقات حاضر اولین کاری است که در زمینه ازدیاد رویشی چغندر قند با استفاده از تکنولوژی کشت بافت بعمل آمده است .

---

* BM = محیط کشت PGOB

** LS محیط کشت نرمونه شده توسط Linsmaier and skoog

*** BA هورمون بنزیل آدنین

**** MS محیط کشت نرمونه شده توسط Murashige and skoog

مواد و روشهای مورد بحث در این فصل با استفاده از منابع ومتون علمی موجودتهیه‌وتدارک شده است . بدین ترتیب که نگارنده برای ایجاد محیط های کشت و تهیه وسایل و ابزار مورد نیاز آزمایش با بهره گیری از روشهای متداول و استفاده از امکانات آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات چغندر قند اقدام به تهیه و تدارک مواد و لوازم آزمایشگاهی نموده است . و در مواردی بعلت عدم دسترسی به ابزار مناسب پس از بررسیهای لازم با ساختن دستگاهی ابتدائی اجرای آزمایش ادامه یافته است .

کشت بافت گیاهی در حالت پیشرفته نیازمند امکانات آزمایشگاهی دقیق و شرایط گلخانه ای قابل کنترل میباشد . ولی در بررسی حاضر سعی شده است با استفاده از امکانات موجود شرایط بالنسبه مطلوب از نقطه نظر محیط غذائی مصنوعی و کشت بافت فراهم گردد .

۱ـ۳ وسائل کار :

وسائل کار و تجهیزات مورد نیاز این بررسی تدریجا " و بموازات پیشرفت کار با استفاده از امکانات آزمایشگاهی موجود و بعضا " ساختن دستگاههای ابتکاری تأمین گردید . قدر مسلم بهبود در شرایط کمی و کیفی وسائل کار و تجهیزات بطرز مؤثری در نتیجه کار مفید واقع خواهد شد که این مهم در قالب آزمایشگاه تخصصی کشت بافت‌تحقق‌میابد .وسائل‌وتجهیزات کار بردی به شرح زیر میباشد :

- ترازوی حساس‌بادقت ۰.۰۱ ± میلی گرم
- PH متر
- ارلن (۱۰۰ میلی لیتر)
- چاقوی استیل ضد زنگ (مخصوص جراحی)
- پنس
- پتری دیش
- بیبت
- پنبه استریل
- سرنگ یک میلی لیتری (پلاستیکی)

- سرنگ ۲۰ میلی لیتری (پلاستیکی)
- دستکش استریل (مخصوص جراحی)
- ظرف جهت نگاهداری محلول های آماده شده .
- فیلتر کاغذی (استریل)
- استوانه مدرج
- بالن ژوژه
- یخچال
- فریزر
- اتوکلاو
- کابینت مخصوص آماده سازی و انتقال بافت به محیط کشت ،

این دستگاه بصورت ابتکاری ساخته شده و هوا بوسیله سیستم حرارتی و محلول ضد عفونی کننده استریل شده و بداخل کابینت جریان میابد

۳ـ۳ مواد مورد استفاده :

- آب مقطر (دوبار تقطیر)
- نمک های معدنی و ترکیبات آلی
- اتانول ۷۰ درصد و ۹۵ درصد
- محلول هیپوکلریت سدیم
- آگار

۳ـ۳ روش آزمایش :

آزمایش کشت بافت نیازمند رعایت شرایط و ضوابط آزمایشگاه های بیولوژی میباشد و براین اساس قبل از اجرای عملیات آزمایشگاهی ، محیط کار از نقطه نظر نور ، درجه حرارت و رطوبت مهیا گردید و کلیه ابزار و لوازم استریل شد . برای انجام کشت بافت عملیاتی بشرح زیر صورت گرفت

۱ـ۳ـ۳ آماده سازی محیط کشت بافت :

قبل از آماده نمودن محیط کشت اصلی ابتدا مواد غذائی میکرو ، ویتامین ها و هورمونهای گیاهی بطور جداگانه بصورت محلول تهیه و در یخچال و فریزر نگاهداری گردید (محلولها با غلظت های بالا تهیه و بعنوان ذخیره در تولید محیط کشت اصلی مورد استفاده قرار گرفت) سپس برای تهیه محیط کشت اصلی از محلول های ذخیره به نسبت های معین برداشته شد وپس ازاضافه نمودن عناصر ماکرو و ساکاروز ، PH محیط کشت درحد ۵/۵ تنظیم وسپس آگار به آن اضافه گردید ماده غذائی آماده بظروف کشت (ارلن ۱۰۰ میلی لیتری)منتقل (حاوی ۴۰ میلی لیتر محلول)وبمدت بیست دقیقه درمحیط اتوکلاو قرارداده شد . پس ازاین مدت محیط های کشت بلافاصله به داخل کابینت جریان هوای استریل انتقال یافت و تدریجا " از حرارت آن کاسته شده و محیط کشت سرد گردید .

در کشت بافت چندرقند و یا به بیان دقیق تر برای ازدیاد رویشی آن محیط های کشت متفاوتی مثل : PGCB = BM, LS, B5, MS, SH مورد استفاده قرار میگیرند . دراین بررسی از محیط کشت اولیه PGCB (۱۰) استفاده گردید .قابل توجه است که بمنظور تامین اهداف اولیه این پژوهش تغییراتی جزئی دراین محیط داده شد که این تغییرات بطور موثرومطلوبی درکسب نتیجه مفید واقع گردید . محیط کشت های درطول آزمایش بشرح زیر فراهم آمد :

A = محیط PGCB بعلاوه کینتین و اسیدژیبرلیک بمنظور تولید جوانه

B = محیط PGCB بعلاوه کینتین ، NAA، IBA بمنظور تولید جوانه مجدد وآماده نمودن جوانه ها برای ریشه زائی

E = محیط PGCB که فاقد هرگونه هورمون میباشد .

۳-۳-۳ انتخاب بافت (EXPLANT)

در این بررسی اندام مورد نظر از شاخه های گل دهنده چندرقند (قبل از باز شدن گل ها) بطول ده تا پانزده سانتی متر انتخاب و پس از شستشو (با آب مقطر) بمدت بیست دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم قرار گرفت . عملیات مزبور برای ضد عفونی و آماده سازی بافت جهت کشت صورت گرفته و در نهایت جوانه های انتهائی شاخه گل دهنده بطول پنج میلی مترجدا شدند .

۳-۳-۳ انتقال بافت و جوانه ها

با رعایت کلیه ضوابط آزمایشگاهی جوانه‌های انتهائی به محیط A منتقل گردید و پس از رشد و نمو ، جوانه ها تقسیم و برای ادامه حیات به محیط های B و E انتقال داده شدند . درنهایت گیاه کامل تحت شرایط طبیعی در گلدان کشت گردید در دو هفته اول ضمن حفظ رطوبت مطلوب محیط ، مواد غذائی مورد نیاز گیاه بصورت محلول پاشی عملی گردید .

کنترل رطوبت و تغذیه مناسب بخاطر تطابق گیاه جوان با محیط جدید انجام گرفته است .

۴ـ نتایج بدست آمده :

۱ـ۴ تشکیل کالوس

پس از کارهای مقدماتی ، انتخاب و انتقال اندام به محیط A انجام پذیرفته وبعداز یک هفته بافت های زنده برنگ سبز روشن در آمده و شروع به رشد مینمایند . در قسمت بریده شده بافت توده سلول سفید رنگ نامتمایز (کالوس) تشکیل و توسعه میابد .

۲ـ۴ تولید جوانه های جانبی (AXILLARY SHOOT)

همزمان با تشکیل کالوس در قسمت انتهائی بافت و ضمن رویش جوانه اولیه ، جوانه های جانبی جدید نیز ظاهر گردید . در بعضی از بافت ها بیش از ده جوانه مشاهده شده است . ارتفاع جوانه های جانبی پس از ۴ـ۳ هفته به ۶ـ۴ سانتیمتر نیز میرسد . رشد جوانه‌ها درمحیط کشت E بسیار بطئی بوده و گاهی هم قهوه‌ای شده و از بین میروند . اما در محیط‌کشت A این حالت مشاهده نشده و جوانه ها برای مدت ۴ هفته در این محیط باقی می‌مانند .

۳ـ۴ ازدیاد مجدد جوانه ها و تحریک برای ریشه زایی

پس از چهار هفته جوانه های جانبی در شرایط استریل از محیط‌کشت A به محیط‌کشت جدید که هورمونهای ضروری را در بر داشته منتقل گردید . این جوانه ها پس از جدا سازی وانتقال به محیط‌کشت جدید در مدت ۳ تا ۴ هفته ضمن تشکیل توده سلولی توانستند در قسمت بریده شده انتهائی جوانه های جدیدی را مجددا " تولید نمایند .

رنگ توده سلولی در این محیط (محیط B) عموما " تیره تر از محیط A بوده و برگ جوانه های تولید شده حالت نسبتا " طبیعی پیدا نمودند .

اگر چنانچه جوانه ها ۶ هفته در این محیط باقی بمانند تولید ریشه های سفید وکوچکی مینمایند ولی این ریشه ها مطلوب نیستند . قابل توجه است که انتقال جوانه ها قبل از ریشه زایی به محیط کشت بدون هورمون E تولید ریشه را تسریع میکند .

جوانه ها پس از ۲۰ تا ۲۵ روز در محیط کشت جدید (E) ریشه دار شده و برگهای جدیدی که کاملا " حالت طبیعی دارند تولید گردید .

۴ـ۴ رشد ونمودرگلدان

رشد جوانه‌ها در محیط بدون هورمون یک ماه ادامه یافت و پس از کامل شدن ریشه ها برگها نیز بتدریج رشد نموده و از شرایط فیزیولژیکی مطلوبی بر خوردار شدند وپس از آن جوانه های حاوی ریشه به گلدانهای محتوی سیلیس و تورب منتقل شدند . جوانه های انتقالی از محیط غذائی مصنوعی و کنترل شده به محیط جدید (گلدانها) بمرور پایه‌دارگشته وسازگاری نسبتا " مطلوبی را با محیط نمایان ساختند . قابل توجه است که این مرحله از حساسیت فوق العاده ای برخوردار بوده و به شرایط محیط مناسب از نقطه نظر رطوبت ، نور و درجه‌حرارت احتیاج دارد و ایجاد آن بمفهوم موفقیت نهائی در انجام ازدیاد رویشی چندرقند میباشد .

۵ ـ بحث و نتیجه گیری :

با توجه به اهداف گسترده بهنژادی چغندر قندکه امروزه در جهان رقابتهائی رادرزمینه بهره گیری از تکنولوژی نوین برانگیخته است با شرحی که بیان گردید بصورت مقدماتی‌روش‌کشت بافت مورد آزمایش قرار گرفت . نتایج مندرج در بند ۴ : این مقاله حاکی از این است که ازدیاد رویشی بافت چغندر قند در محیط غذائی مصنوعی ممکن و عملی است . قدر مسلم نتایج حاصل‌از این بررسی مؤید و تامین کننده کلیه اهداف مورد نظر نمی تواند باشد و نیل به این مقصود در جهت حل و فصل بخشی‌از مشکلات بهنژادی بذرچغندرقند ، ضرورت تامین وتجهیز آزمایشگاه مستقل و تخصصی کشت بافت را ایجاب مینماید . بدیهی است با بهره وری از کلیه امکانات مورد نیاز،ازدیاد رویشی بافت در بهنژادی چغندر قند شرایط عینی یافته وبه لحاظ تسهیلات‌آزمایشگاهی که فراهم خواهدشد طرح و اجرای آزمایشات مربوط به کشت دانه گرده ، اوول ، پروتوپلاست‌وامتزاج پروتوپلاست ها نیز میتواند در دستور کار قرار گیرد .

۶ـ پیشنهادات :

بهر جهت اقدام در زمینه تحقق اهداف ملحوظ نظر در این مقاله نیازمند تهیه وتامین‌امکانات و تسهیلات خاص این تکنولوژی است که بشرح زیر پیشنهاد میگردد :

ـ تاسیس آزمایشگاه مجهز کشت بافت در موسسهٔ تحقیقاتی اصلاح و تهیه بذرچغندر قند ،

ـ استفاده از ظرفیتهای علمی و فنی دانشگاهی و موسسات تحقیقاتی بویژه موسسهٔ تحقیقات نهال و بذر بمنظور انجام طرحهای جدید و مشترک ،

ـ اولویت در تامین نیروی تخصصی و آموزشی کادر فنی موجود ،

ـ گرد آوری متون و منابع علمی کشت بافت بویژه در خصوص کشت بافت چغندر قند ،

ـ کسب تازه‌های علمی و فنی جهانی از طریق شرکت در مجامع بین المللی

ـ تامین مواد شیمیائی مورد نیاز :

ـ تامین شرایط گلخانه ای مورد نیاز.

قابل توجه است که پس از پیشرفت های اولیه درکسب نتایج آزمایش مورد بحث وحصول اطمینان ضمنی از کارائی تکنولوژی نوین کشت بافت در حل و فصل مشکلات موجود بهنژاد ی بذر چغندرقند اقدامات نسبتا" جامعی از طرف موسسهٔ تحقیقاتی اصلاح و تهیه بذر چغندرقند در تاسیس آزمایشگاه بعمل آمده است ولی برای تکمیل و بمرحله عمل رساندن کار نیازمند کمک و مساعدت از سوی دستگاههای علمی فنی ، اجرائی بوده و امید است در این راه از هر گونه همکاری دریغ نفرمایند .

منابع مورد استفاده

۱ـ ارجمند ، محمد ناصر ـ کشت گیاهان عالی درمحیط مصنوعی . بنگاه اصلاح‌وتهیه بذر چغندرقند ، ۱۳۶۵ (ترجمه).

۲ـ صادقیان ، سید یعقوب ـ کشت سلول و وراثت سلول سماتیکی در غلات و علوفه‌کرامینه. دانشگاه تهران ، ۱۳۶۵ (ترجمه).

۳ـ قلی زاده ، رحیم ـ کشت گیاهان در آزمایشگاه . بنگاه اصلاح‌وتهیه بذرچغندرقند ۱۳۶۱ .(ترجمه).

۴ـ کرباسی ، پرویز ـ استفاده از تکنیک کشت سلول . بافت و نگهداری دختر توارثی .موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر ، ۱۳۶۴.

۵ـ لسانی ، حسین ومجتهدی، مسعود ـ مبانی فیزیولوژی گیاهی . دانشگاه تهران ، شماره ۱۸۴۵ ، ۱۳۶۳. (ترجمه).

- Conner, B.V.- Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC press, Boca Baton Florida, 1981 .

7 - Coumans, M; Coumns, M.F.; Menard, D;Kevers, C.and ceulemans, E-Micropropagation of Sugar Beet . Institute of Botany,University of Tilman, B-400 Liege , Belgium , 1982.

8 - Coumans, M.F.; Gilles, L.;Kevers, C.;Ceulemans, E.and Gapery ,Th.- Vegetative multiplication of Sugar Beet through in Vitro, Culture of inflore-scence pieces . Institute de Botanique,Universite de Liege, Sart, Tilman, B-4000 Liege,Belgium,1981.

9 - Dodds an Lorin - Experiments in plant tissue culture . Camoridge University Press, 1982 .

10 - Hussey, G.; Hepher , A.- Clonal Propagation of Polyploids by tissue Culture.Ann.Bot.42/477/1978

11 - Kevers,C.; Coumans, M.;Greef, W.D.;Hofinger.M. and Gaspar ,Th-Habituation in Sugar Beet callus. Physiol plant. 281-286 / 1981.

12 - Kholodora , V.P.; Urmantsera, V.V.;Meshchery - akov , A.B-Physiological and Biochemical processes in Sugar Beet tissue Culture.St.Biologu series Moscow , 1986.

13 - Murashige - Cloning plants by tissue culture . Dept . of Botany University of California,1985.

14 - Pierik,P.L.M.-In Vitro Culture of Higher plant. P.O.Box 30 / 6700 AA Wageningen / 1948.

15 - Rogozinska , J.H.; Goska , J.H.;Kuzdowiicz.A.- Induction of plants from anthers of Beta Vulgaris cultured in vitro.Acta Soc.Bot.pol/46/ 471/1977.

16 - Saunders, J.W.-Cytokinin effectson formation of high Frequency habituated callus and adventitious buds in Sugar Beet . Michigan State University , P.O.Box 1633/East Lansing Michigan/U.S.A/1982.

17 - Thorpe_plant tissue Culture, Methods and application in agriculture.Acad.Press, New Yourk/1981.

SUMMARY

From the year 1838 which Schwan and Schleiden mentioned the Totipotency hypothesis "the genetic potentiality of each plant cell for developing a normal plant" up to the present time, extensive research and activities have been successfully done in-vitro culture of different higher plants like sugar beet by several researchers in world scientific centers.

From the success which has been obtained in the area of sugar beet tissue culture caused that most of sugar beet seed producing companies to give the priority to the use of tissue culture technology.

In Iran sugar beet research institute as other research companies in abroad paied attention to use this technique for solving practical problems leading to the improvement of sugar beet as a crop plant.

In this area, from 1985 it has started some preliminary researchs in-vitro vegetative propagation of sugar beet and obtained fallowings results.

At first, the primary materials and equipments were prepared, then nutrient medium (PGOB) with right composition of macroelements, microelements, vitamines

supplemented and IAA+Kinetin added to it (A media).

Nutrient media were placed into autoclave (121 C) for 20 minutes, Axillary shoots from inflorescence segments (5-mm-long tips) has been cut and sterilized with potassium-hypochlorite and placed on nutrient media.

Callus and shoots derived from inflorescence segments at temperature about 25°C, daylight 16/8 h. After four weeks the number of shoots were furthered ten and 4-6 cm longs. Leaf and Petiole fragments were isolated and subcultured on PGOB+NAA+IBA(B-media) for regenerating shoots and stimulating adventitious shoots.

On new media (B) it developed to supplementary shoots for four weeks, also callus raised at terminal of shoots. The shoots which remained in the media, produced abnormal roots (ca: 4-6 weeks).

Rooting of shoots was obtained in the absence of growth regulators in PGOB media (E-media).

The plants developed for 20-25 days and transfered to soil. Subsequently they habituated and improved normally in new situation.

However, the succession of sugar beet vegetative propagation in Iran resulted to use new scientific

techniques on improvement of sugar beet breeding methods. Certainly the possibility of application of results that obtained in sugar beet vitro culture with lower cost for qualified seed production, it is necessary to continue tissue culture researchs with favorable situation of greenhouse and laboratory.