هیبریدهای بین گونه‌ای در چغندرقند (جنس*Beta*) با استفاده از روش نجات جنین

Inter-specific hybrids in Beta genus using embryo rescue technique

فرانک روزبه [۱]، سید یعقوب صادقیان[۱]، نسرین یاوری [۱] و محمود مصباح [۱]

ف. روزبه، س.ی. صادقیان، ن. یاوری و م. مصباح. ۱۳۸٤. هیبریدهای بین گونه‌ای در چغندرقند (جنس*Beta*) با استفاده از روش نجات جنین. **چغندرقند ۲۱(۱): ۳۰-۱۵**

چکیده

تلاقی بین گونه‌ای یا بین جنسی در چغندرقند معمولاً به علت عدم لقاح، مرگ جنین یا قطع ارتباط آندوسپرم با جنین موفقیت‌آمیز نبوده است. در این موارد، تکنیک نجات جنین مفید بوده و جنین‌های هیبرید قبل از نابود شدن در شرایط درون شیشه‌ای کشت و نگه‌داری می‌شود. دستیابی به تلاقی بین گونه‌ای چغندرقند با گونه‌های وحشی به‌دلیل عدم تشابه کروموزومی با روش‌های متداول به‌نژادی میسر نیست. در این بررسی، برای تهیه هیبریدهای بین گونه‌ای، تلاقی یک توده تتراپلوئید 37RT به عنوان والد مادری با دو گونه وحشی *Beta.webiana* و *Beta procumbens* به‌عنوان والد پدری به‌صورت دستی انجام شد. پس از مطالعه روند رشد جنین توسط محلول یک درصد تترازولیوم کلراید، جنین‌های هیبرید ۲۰ روزه در محیط غذائی N6 در سه آز مایش با ترکیبات مختلف هورمونی در شرایط آزمایشگاهی کشت و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چهار هفته قرار گرفتند.آزمایش سوم با ترکیب محیط N6 وهورمون‌های NAA ,GA3 ,BA به‌ترتیب به‌میزان ۱، ۰/۲، ۰/۵و P.V.P به‌میزان ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ساکارز و زغال فعال به ترتیب به میزان ۳۰ و یک گرم در لیتر و ۰/٦ درصد آگار نتیجه مطلوبی را از نظر جوانه‌زدن جنین هیبرید نشان داد. سپس جنین‌های جوانه‌زده جهت ازدیاد به محیط N6 حاوی BA وGA3 به ترتیب به‌میزان ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر منتقل و در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و دمای۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نتایج نشان داد که درصد جوانه‌زنی و دانهال هیبرید دو نوع تلاقی *B.vulgaris×B.procumbens* و *B.vulgaris×B.webbiana* به‌ترتیب ۱۰درصد و ٤۰درصد است.

واژه‌های کلیدی: تلاقی بین گونه‌ای، چغندرقند، محیط کشت، نجات جنین

اختصارات: GA3: اسید جیبرلیک، BA: بنزیل آمینو پورین، NAA: آلفا نفتالین استیک اسید، P.V.P: پلی وینیل پیرولیدون

۱- اعضا هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندرقند- کرج

مقدمه

سطح زیر کشت چغندرقند(*B.vulgaris* L.) در کشور بالغ بر ۱۹۲۰۰۰ هکتار است که بر اساس آمار سال ۱۳۸۱با تولید ۵/۱۷ تن در هکتار شکر، پنجاه و یک درصد از نیاز مصرف داخلی از محل کشت چغندر قندتامین شد. (انجمن صنفی کارخانه‌های قند و شکر کشور ۱۳۸۲). افزایش تولید در واحد سطح می‌تواند به‌طور مستقیم از طریق بهبود پتانسیل ژنتیکی گیاه با افزایش عملکرد در واحد سطح انجام پذیرد و یا این که به‌طور غیرمستقیم با مقاوم‌تر کردن گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زا و شرایط نامناسب محیطی و در نتیجه آسیب‌پذیری کمتر صورت گیرد.

شناسایی منابع ژنتیکی مقاومت به آفات و بیماری‌ها از دیر باز در برنامه‌های به‌نژادی چغندرقند جایگاه ویژه‌ای داشته است. گزارش‌های متعددی مبنی‌بر وجود صفات مقاومت به سرکسپورا، نماتد چغندرقند، سفیدک حقیقی و دروغی، ویروس موزائیک چغندرقند و ویروس کرلی‌تاپ در گونه‌های خویشاوند چغندرقند وجود دارد (Savitsky 1960 and 1975; De Bock 1986; Van Geyt et al. 1990). یکی از مهم‌ترین روش‌های انتقال این صفات به گونه زراعی، تلاقی بین گونه‌ای است. در حالی که در برخی از گیاهان، تلاقی بین گونه‌ای یا دورگ‌های دور تقریباً بدون مشکل تهیه می‌شوند و تلاقی بین آن‌ها به اندازه تلاقی بین واریته‌ها ساده است، مثل کولتیوارهای گوجه فرنگی (*Lycopersicom esculentum*) که به‌راحتی با گونه *L. pimpinellifolicm* تلاقی می‌یابد(Sing 1990)، اما در بسیاری از موارد، دورگ‌های F1 با سطوح متفاوتی از مشکلات مانند عدم تشکیل تخمک، عدم توسعه تخمک و عدم رشد گیاهچه‌های دورگ مواجه بوده که موجب محدود شدن رشد تلاقی‌های دور می‌شود (Simmonds 1979). در جنس *Beta*، بیشترین مطالعات تلاقی دور بین گونه *B.vulgaris* و گونه‌های گروه *Procumbenes* انجام شده است. گونه‌های این گروه تنها گونه‌هایی از جنس *Beta* هستند که علاوه بر دارا بودن مقاومت به بیماری‌ها و تنش‌های متعدد، دارای مقاومت بالا نسبت به نماتد چغندرقند (*Heterodera schachtii*) نیز هستند (Savitsky 1960 and 1975; De Bock 1986; Klin et al. 1999; Van Geyt et al. 1990). تلاقی‌های موفق با گونه‌های این گروه به علت عدم تشابه کروموزومی و عدم جفت شدن کروموزم‌ها در میوز مشکل بوده و به خصوص در سطح دیپلوئیدی و در مرحله جوانه‌زنی به علت نکروزه شدن ریشه و عدم تشکیل ریشه ثانویه (Simmonds 1979; Van Geyt et al. 1990) یا عدم ارتباط بین سیستم آوندی ساقه به ریشه، نتاج حاصل از بین می‌رود(Van Ripley and Arnison1990). نسل F_1 قادر به تشکیل ریشه نبوده و آن‌هایی که زنده باقی می‌مانند عقیم هستند. استفاده از گونه‌های

حـدواسـط و یا پیـوند زدن گیاه‌چـه‌هـای هیـبرید بـر روی چغندر یک‌سالـه از جمـله روش‌هـایی بوده‌اند کـه بـــرای رفـــع ایـن مشـــکل مـورد اســتفاده قـــرار گـرفـــته‌انـد (Savitsky 1960 and 1975; Van Geyt et al. 1990).

هر چند مطالعـات زیـادی در زمینـه مشـکلات موجود در تهیه هیبریـدهای چغندرقنـد و زنـده مانـدن آن‌ها پس از مرحله دانهال، در چند دهـه اخیـر صـورت گرفته است؛ اما پیشرفت‌های زیـادی بـه دسـت نیامـد. گرچه در این زمینه محققین زیادی جهت دسـتیابی بـه هیبریدهای زنده و زایای بـین گونـه‌ای بـه ویـژه نتـاج حاصل ازگونه‌های وحشی و چغندرقنـد تـلاش زیـادی انجـام دادنـد (Johnson and Wheatley 1961; Savistsky 1960 and 1975; De Bock 1986; Bruun 1991).

تکنیک نجات جنین به‌عنـوان روشـی مفیـد و مطمئن جهت تولید گیاهان هیبرید از گیاهـانی کـه در شرایط طبیعی آمیزش‌های سخت یا غیـرممکن دارنـد، به‌کار می‌رود. در این روش، جنین هیبرید قبل از نـابود شدن در شرایط آزمایشگاهی کشت و نگه‌داری می‌شود. گـزارش‌های متعـددی از کـاربرد این تکنیک در تـولید هیبریدهای دور در گیاهان مختلف ازجمله کلـم(Van Ripley and Arnison 1990)، برنـج (Ram et al. 2004)، گنـــدم (Kumlehn et al. 1997)، دلفینیـوم(*Delphinium*) (Honda and Tsutsui 1997)، خـــیار(Chen et al. 1997)، ســـوسن (Shanchi 2002) و ســـیکلمه(Ishizaka and Uemetsu 1995) وجود دارد. هیبریداسیون بین جنسی ارقام تجارتی توت فرنگی و هیبریداسیون بین گونـه‌ای در کیوی با استفاده از نجـات جنـین میسـر شـده اسـت (Sharma et al. 1996). مقاومت به ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی(RLRV) بـا موفقیـت از *Solanum etuberasum* بـه *S. tuberosum* از طریـق نجـات جنین انتقال داده شـد(Sharma et al. 1996). نجـات جنین در تولید هیبریدهای بین گونه‌ای غـلات نیـز بـه کـار رفتـه اسـت (Kumlehn et al. 1997). *Oriza minuta* (برنج وحشی) یک رقم تتراپلوئید با مقاومـت به آفات و بیماری‌هایی چون بلاست و بلایت باکتریایی است. مقاومت به این بیماری‌ها از گونه وحشی به برنج زراعی با روش نجات جنین منتقل شده است.

مشکل تلاقی بین چغندرقند و گونه‌های وحشی گروه *Procumbentes* به‌طور عمده در مراحـل بعـد از تشکیل جنین بروز می‌یابد. در این نوع تلاقـی، جنـین تشکیل می‌شود اما رشد آن به‌دلیل عدم تشکیل ریشـه متوقف می‌شـود (Savitsky 1975; Savitsky 1960). تلاقـی بـین *B.vulgaris* و *B.webbiana* بـه‌منظـور انتقـال ژن مقاومـت بـه نماتـد (*H. schachtii*)بـه گونه‌های زراعی توسط یوهانسن و ویتلی (Wheatley and Yohanson 1961) انجام گرفـت. گیاهچـه‌هـای F1 به‌عنوان پیوندک روی چغندرقند ریشه‌دار به‌عنـوان پایه پیوند زده شد و از این طریق، تقریباً تعداد زیادی از گیاهان F1 زنده ماندند، اما پس از آزمون نسل چهـارم

تلاقی برگشتی(BC4) برای مقاومت به نماتد هیچگونه مقاومتی مشاهده نشد(De Bock 1986).

بالاخره مطالعات گسترده‌ای جهت انتقال ژن مقاومت به نماتد از گروه *Procumbentes* به چغندرقند توسط ساویتسکی در سال ۱۹۶۰ شروع شد(Savitsky 1960) . در این بررسی، از تلاقی گیاهان دیپلوئید *B.vulgaris* با *B.webbiana* و *B. procumbens*، هیبریدهای دیپلوئید و از تلاقی *B. vulgaris* تتراپلوئید با *B.patellaris* تتراپلوئید، هیبرید تتراپلوئید تولید شد. در تمام گیاهان F1، خواص چغندر وحشی غالب بود. پرچم‌ها در هیبریدهای دیپلوئید خیلی کوچک و تقریباً خالی بود. هیبریدهای تتراپلوئید حدود ۱۵ الی ۱۰۰ بذر تولید کردند (Savitsky 1975; YU 1984; Van Geyt et al. 1990). ساویتسکی(۱۹۷۵) اولین کسی بود که با استفاده از چغندر زراعی تتراپلوئید به هیبریدهای زنده و بارور دست یافت و از تلاقی این هیبریدها و چغندر زراعی دیپلوئید، گیاهانی با یک کروموزوم اضافی (2n+1) با هدف انتقال ژن مقاومت به نماتد به‌دست آمد (Savitsky 1975). هم‌چنین براون (Bruun 1991) مطالعات ساختاری روی تخمدان‌های حاصل از تلاقی‌های داخل و بین گونه‌ای چغندر انجام داد، وی نشان داد که آندوسپرم در شرایط آزمایشگاهی خیلی سریع‌تر نسبت به شرایط طبیعی رشد کرده و توسعه می‌یابد. به علاوه، وی با بررسی‌های آناتومیکی جنین‌های هیبرید، تجزیه زودرس سوسپانسور(suspensor) را عامل احتمالی عدم ریشه‌دهی قلمداد کرد. تلاقی‌های دور حاوی ژن‌های مفید، می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی چغندرقند مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین در این مطالعه امکان کاربرد تکنیک نجات جنین در تلاقی‌های دور گونه‌های زراعی با گونه‌های *B. procembors* و *B. webbiana* از گروه *Procumbentes* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این بررسی به‌منظور تلاقی بین گونه‌ای، توده تتراپلوئید زراعی چغندرقند به نام 37RT به‌عنوان والد مادری و گونه‌های وحشی *Beta procumbens* و *B.webbiana* دیپلوئید به‌عنوان والد پدری انتخاب شدند. تعداد ۱۰۰ عدد بذر از گونه زراعی چغندرقند در گلدان کاشت و جهت رشد به گلخانه انتقال داده شد. گیاهچه‌های حاصل پس از ۶ تا ۸ هفته (مرحله ۸ تا ۱۰ برگی) به سردخانه (دمای ۴ تا ۷ درجه سانتی‌گراد) و نور دائم جهت بهاره‌شدن منتقل شدند. پس از ۱۰ هفته، گیاهان بهاره شده جهت گلدهی به گلخانه انتقال یافتند. در گلخانه، علاوه بر نور طبیعی در هر مترمربع یک لامپ ۲۰۰ وات در ارتفاع ۸۰ سانتی‌متری گیاهان قرار داده شد. طول روز در گلخانه ۱۶ ساعت و دمای گلخانه در روز حدود ۲۰ تا ۲۵ درجه و در شب حدود ۱۵ درجه سانتی‌گراد بود. در طی این مدت، هر ۱۵ روز گیاهان با محلول هوگلند و

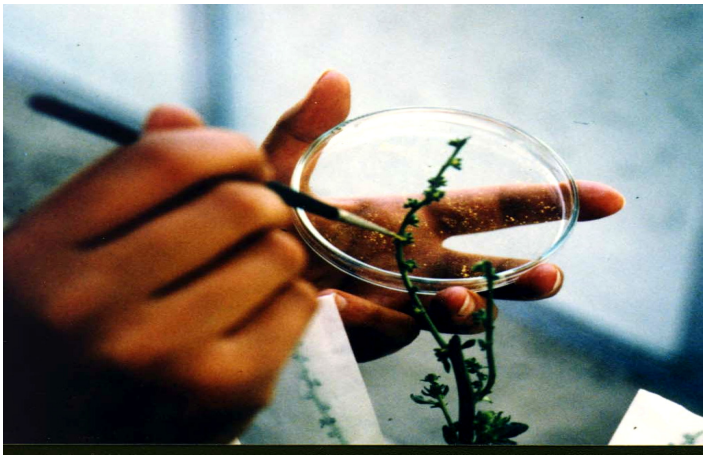
هم‌چنین محلول‌های فسفاته تغذیه شدند (یاوری، ۱۳۸۳).

گونه‌های وحشی گروه *Procumbentes* یکساله هستند و احتیاج به بهاره‌شدن ندارند، اما به‌دلیل پوسته بسیار سخت بذر، زمان جوانه‌زنی آن‌ها بسیار طولانی است. بر این اساس، هم‌زمان با گونه زراعی،کاشت بذور وحشی نیز انجام گرفت.

دورگ گیری: پایه‌های مادری پس از ساقه‌دهی و رشد گل‌آذین برای اخته کردن گل‌ها و دورگ‌گیری دستی آماده شد. بدین منظور، در هر گل‌آذین تمام گل‌های شکفته‌شده قسمت پائین ساقه، حذف شدند و تنها گل‌های نشکفته در قسمت میانی گل‌آذین جهت عقیم کردن، انتخاب شدند. چون والد مادری یک رقم مولتی‌ژرم بود، در هر کلاستر گل که کنار هم روی ساقه قرار داشتند، به‌غیر از یک گل، بقیه حذف شدند. عقیم نمودن به‌صورت دستی و با پنس‌های کوچک نوک تیز صورت گرفت(شکل۱). بدین صورت که کاسبرگ‌ها به‌آرامی کنار زده شد و بساک‌ها به طوری که به نوک کلاله آسیب وارد نشود، با پنس برداشته شدند. سپس جهت جلوگیری از آلودگی با گرده‌های ناخواسته، گل‌آذین اخته شده با پاکت‌های شفاف کاغذی پوشانده شدند. ۴ تا ۶ روز پس از اخته کردن گل‌ها، گرده گونه‌های وحشی به‌طور مجزا جمع‌آوری گردیده و توسط قلم‌مو در روی کلاله گل‌های اخته شده قرار داده شد(شکل۲) و مجدداً گل آذین مربوطه با پاکت شفاف کاغذی پوشانده شد (شکل۳). عمل گرده‌دهی در ساعت ۸ تا ۱۰ صبح و با دو تکرار به‌فاصله دو روز پس از اولین گرده‌دهی انجام شد.

شکل۱ عقیم سازی والد مادری

Fig. 1 Emasculation of female parent



شکل۲ انتقال گرده به والد مادری

Fig. 2 Pollination of the female plant

شکل۳ پوشاندن گل‌آذین‌های والد مادری پس از گرده‌دهی

Fig. 3 Isolation of female plants after pollination

نجات جنین: مشخص کردن مرحله رشد جنین از زمان تلقیح تا برداشت و تایید میزان موفقیت تلاقی بین گونه‌ای، توسط تترازولیوم کلراید صورت گرفت (Yavari 1979) برای این کار، مادگی جدا شده در محلول یک درصد تترازولیوم کلراید به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت رنگ‌آمیزی قرار گرفت. در این آزمایش، تعداد ۳۰ جنین (از هر تلاقی ۱۵ عدد) مورد آزمون قرار گرفت و هم چنین جنین‌ها در سن‌های ۷، ۱۴، ۲۰ و ۲۵ روزه پس از لقاح، جدا و به محلول تترازولیوم کلراید انتقال داده شد. قدرت حیاتی جنین با قرمز شدن در مجاورت این ماده مشخص می‌شود. هم‌چنین با این بررسی، میزان رشد و نمو جنین نیز نشان داده می‌شود.(شکل ۵)

۲۰ تا ۲۵ روز پس از اولین گرده‌دهی، گل‌های تلقیح شده از گیاه پایه مادری جداو پس از انتقال به آزمایشگاه، برگچه‌های اضافی حذف و ضدعفونی سطحی انجام شد. تیمار ضد عفونی شامل شستشو با آب معمولی به مدت ۲ دقیقه، قرار دادن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، غوطه ور کردن در محلول یک درصد سدیم هیپوکلریت به مدت ۲۰ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل در سه نوبت بود. جنین‌ها با استفاده از استرویومیکروسکوپ در شرایط کاملاً استریل لامین ایر،توسط اسکالپل و پنس کوچک از درون تخمدان جدا شده و در محیط غذایی پایه N6 (Chu 1978) طبق جدول شماره یک در سه آزمایش کشت شدند.

جدول ۱ ترکیب محیط‌های کشت جنین

Table 1 Composition of embryo culture media

پارامترهای مورد آزمایش		آزمایش اول	آزمایش دوم	آزمایش سوم
Studied parameters		Test 1	Test 2	Test 3
هورمون‌های رشد بر حسب	BA	-	0.2	0.2
میلی‌گرم در لیتر	NAA	-	0.5	0.5
Growth hormones mg/l	GA3	-	-	1
P.V.P mg l^{-1}		-	-	300
آگار (Agar)%		0.8	0.8	0.6
ساکارز (Sucros)%		6	6	3
زغال فعال (Active charcoal) mg l^{-1}		1000	1000	1000

در تمام آزمایش‌ها، در هر پتری‌دیش (با قطر ۹ سانتی‌متر) که حاوی ۱۵ سی‌سی محیط غذائی بود تعداد ۱۰ جنین از یک نوع تلاقی کشت و تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان جوانه‌زنی (در حدود ۱۵ الی ۳۰ روز) نگه‌داری شدند. جنین‌های جوانه‌زده بلافاصله پس از ظهور علائم جوانه‌زنی در شرایط محیطی ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از یک هفته جنین‌های جوانه زده جهت رشد در محیط غذایی N6 حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و یک میلی‌گرم در لیتر GA3 تحت شرایط نوری فوق‌الذکر قرار گرفتند. برای دستیابی به دانهال هیبرید، دانهال‌های کوچک اولیه بار دیگر در این محیط واکشت شدند.

نتایج و بحث

علی رغم این که گرده‌افشانی طبیعی در چغندر زراعی به وسیله باد انجام می‌شود، اما این روش و سایر روش‌های طبیعی به‌دلیل عدم تشابهات کروموزومی گونه‌های دور در چغندرقند مؤثر نیست. تولید تعداد کم بذر در تلاقی بین گونه‌ای چغندرزراعی و گونه‌های وحشی *Procumbentes* توسط محققین گزارش شده است (Savitsky1960; Johnson and Wheatley 1961; Savitsky 1975; De Bock 1986) هم‌چنین در مطالعاتی که روی جوانه‌زنی بذر صورت گرفته است مشخص شده است که عدم موفقیت کامل در تلاقی بین *B. vulgaris* و گونه‌های وحشی *Procumbentes* در نتیجه عدم نفوذ لوله‌گرده به داخل خامه چغندرزراعی بوده است (Bhojwani and Razdan 1983; Bruun 1991; Brown 1996; Clark 1997).

گل‌های چغندرقند کوچک و فنجانی شکل هستند و به همین علت، عقیم‌سازی دستی آن‌ها بسیار مشکل است. هر چند که تکنیک اخته‌سازی دستی برای دورگ‌گیری کمتر مورداستفاده قرار می‌گیرد (Smith 1980)، اما به علت بالا بودن ضریب اطمینان در انجام تلاقی و تهیه دورگ موردنظر از روش اخته‌سازی گل‌های نر و گرده‌افشانی دستی استفاده و بدین‌ترتیب درصد مطلوبی جنین هیبرید تهیه شد (شکل۴).

شکل٤ گل‌های تلقیح شده در والد مادری (۱۴روز پس از عمل گرده‌افشانی)

Fig. 4 Fertilized flowers (14 days after pollination)

رنگ‌آمیزی با تترازولیوم کلراید، بـه دو منظـور انجـام شـد: اول سـنجش قـدرت حیـاتی جنـین و دوم،بررسی روند رشد و نمو جنین. تعداد ۳۰ عدد جنین در تترازولیوم کلرایـد یـک درصـد قـرار گرفتنـد. تمـام جنین‌ها در مجاورت این ماده قرمز شدند کـه علـت آن تنفس جنین و آزادکردن دی‌اکسیدکربن و نشـانه زنـده بودن تمام جنین‌ها بود(شکل۵). هم چنین بین سن‌های متفاوت جنین که در این رنگ قرار داده شدند جنین ۲۰ روزه دارای ساختمان کامل دو قطبی بـا سـاختار اولیـه کوتیلدون و ریشه بود.

شکل ۵ جنین هیبرید پس از تیمار با تترازولیوم کلراید

Fig. 5 Hybrid embryo treated with tetrazolium chloride

در کشت درون شیشه‌ای جنین، محیط پایه N6 محیط اصلی بود. در عین حال، تأثیر ترکیبات تکمیلـی بر رشد بهینه جنین در شرایط آزمایشگاهی بررسی شـد که نتایج آن در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

جدول ۲ نوع تلاقی، تعداد گل‌های تلقیح شده، تعداد مادگی بارورشده، درصد باروری، تعداد جنین‌های کشت شده و درصد جنین‌های جوانه‌زده در سه آزمایش مختلف کشت جنین

Table 2 Type of hybridization, number of fertilized flowering buds, number of fertilized ovules, fertilization percent, number of cultured embryos and germination percent in the three experiments

آزمایش‌ها No. experiment	نوع تلاقی Crossing type	تعداد غنچه گل‌های تلقیح شده Number of fertilized flower	تعداد مادگی بارور Number of fertilized ovule	درصد باروری Fertilization (%)	تعداد جنین‌های کشت شده Number of cultured embryos	درصدجوانه‌زنی Germination (%)
اول First experiment	37RT(4n) × *B. webbiana*(2n)	210	60	28	60	-
	37RT(4n) × *B. procumbens*(2n)	210	70	33	60	-
دوم Second experiment	37RT(4n) × *B. webbiand*(2n)	155	45	29	45	-
	37RT(4n) × *B. procumbens*(2n)	155	47	30	45	-
سوم Third experiment	37RT(4n) × *B. webbiand*(2n)	450	100	22	100	40
	37RT(4n) × *B. procumbens*(2n)	450	200	44	100	10

در آزمایش اول، محیط کشت فاقد هورمون و P.V.P. بود. هم‌چنین غلظت آگار و ساکارز در این محیط به ترتیب به‌میزان ۰/۸ و ۶ درصد بود. در این محیط، تمام جنین‌های کشت شده پس از ۳ الی ۴ روز قهوه‌ای شدند و درصد جوانه‌زنی صفر بود. در آزمایش دوم، محیط کشت پایه N6 حاوی هورمون‌های BA و NAA به‌ترتیب به‌مقدار ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بود و سایر عوامل مشابه آزمایش اول بود. در این محیط نیز درصد بالائی از جنین‌ها بعد از سه روز قهوه‌ای شدند و در تعداد کمی نشانه‌هایی از پاسخ جنین‌های کشت شده به‌صورت توده‌های نامتمایز سلولی در اطراف آن به‌وجود آمد. این توده‌های نامتمایز سلولی پس از چند روز، قهوه‌ای شده و از بین رفتند. عدم جوانه‌زنی در آزمایش اول به‌علت بازدارندگی ناشی از ترشح مواد فعلی در کشت جنین هیبرید بود که محدودیت رشد با وجود استفاده از هورمون‌ها در آزمایش دوم نیز برطرف شد. در آزمایش سوم، علاوه بر هورمون‌های BA و NAA به ترتیب به‌میزان ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، هورمون GA3 (غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر) نیز افزوده شد. هم‌چنین P.V.P به مقدار ۳۰۰ میلی گرم در لیترافزوده شد. در این محیط، غلظت ساکارز به ۳ درصد و هم‌چنین آگار به ۰/۶ درصد کاهش یافت و جوانه‌زنی مشاهده شد (شکل۶). براین اساس، مناسب‌ترین ترکیب محیط کشت آزمایش

سوم تعیین شد، زیرا بالاترین میزان جوانه‌زنی به‌دست آمد(جدول ۲).

شکل٦ جوانه‌زنی جنین‌های کشت شده در شرایط درون شیشه

Fig. 6 Germination of embryos *In vitro*

شکل۷ دانهال‌های هیبرید

Fig. 7 Hybrid seedlings

عوامل بسیاری در موفقیت کشت جنین مؤثر هستند که مهم‌ترین آن‌ها شامل ژنوتیپ، مرحله رشد جنین در زمان جداسازی، شرایط محیطی والد مادری، ترکیب‌های مختلف محیط کشت، هورمون‌ها، ساکارز، اکسیژن، دما و نور است (Kumlehn et al 1997). در این تحقیق، یکی از عوامل مؤثر بر عدم جوانه‌زنی جنین‌ها، ترشح ترکیبات فنلی و قهوه‌ای شدن آن‌ها بود. تیمارهای متفاوتی برای جذب مواد زائد از جمله ترکیبات فنلی در جلوگیری از قهوه‌ای شدن به‌کار می‌رود

که معمول‌ترین آن‌ها زغال فعال است (Bhojwani and Razdan 1983, Honda and Tsutsui 1997, Pierie 1987). زغال فعال در غلظت به‌کار گرفته قادر به برطرف کردن مشکل نبود و هنگامی که P.V.P که یک جاذب ترکیبات فنلی است به محیط کشت اضافه شد و میزان آگار به ۰/۶ درصد تقلیل یافت، جنین‌ها قهوه‌ای نشده و در حضور جیبرلیک اسید، جوانه‌زنی به‌طور طبیعی انجام شد.

با تیمار تترازولیوم کلراید مشخص شد که جنین‌های ۲۰ روزه بالغ هستند و نیازی به غلظت بالای ساکارز ندارند. ساکارز علاوه بر تامین کربن، تثبیت کننده فشار اسمزی نیز است و اهمیت ایجاد فشار اسمزی از اهمیت غذایی آن بیشتر است. جنین‌های نارس در محیط کشت نیاز به فشار اسمزی بالا دارند. آندوسپرم این جنین‌ها در حالت طبیعی دارای فشار اسمزی بالائی است (Pierik 1987). معمولاً غلظت آگار در کشت جنین بین ۰/۶ تا ۰/۸ درصد است و غلظت بیشتر، از رشد جنین جلوگیری به‌عمل می‌آورد و این در حالی است که در برخی موارد، استفاده از محیط کشت مایع جوانه‌زنی و رشد جنین را بهبود بخشیده است (Pierik 1987).

کاهش غلظت آگار موجب حرکت ترکیبات منفی مترشحه به سمت پائین محیط کشت شده و از تجمع آن‌ها در محل تماس جنین با محیط کشت جلوگیری به‌عمل می‌آید. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که کاربرد هم زمان P.V.P و کاهش غلظت آگار و هم‌چنین اسید جیبرلیک که دارای اثرات محرک بر رشد جنین است (Honda and Tsutsui 1997; Kumlehn et al. 1997; Pierik 1987) در بهبود شرایط رشد جنین مؤثر بوده است.

مطالعات زیادی در زمینه مشکلات موجود در تهیه دورگ‌های بین گونه‌ای چغندر و زنده ماندن آن‌ها پس از مرحله دانهال در چند دهه اخیر صورت گرفته است و علت عدم دستیابی به گیاه تلاقی نیز موضوع چندین تحقیق بوده است (Bruun 1991; De Bock 1986; Johnson and Wheatley 1961; Savitsky 1960).

اندرسون و لارسن (Andersen and Larsen 1990) برای بررسی عوامل فیزیولوژیکی ناتوانی در تولید ریشه، تعدادی نتاج حاصل از تلاقی چغندر زراعی و گونه وحشی *B. webbiana* با استفاده از تکنیک نجات جنین تهیه کردند. شاخه‌های این دورگ‌ها که فاقد ریشه بود و شاخه‌های طبیعی ریز ازدیاد شده چغندرقند برای اندازه‌گیری و مقایسه میزان سیتوکینین داخلی به‌کار رفتند. مطالعات برای اندازه‌گیری میزان سیتوکنین داخلی انجام شد تا زمانی که میزان آن در پائین‌ترین حد است جهت تعیین مناسب‌ترین زمان برای تیمار ریشه‌دهی مشخص شود. شاخه‌های هیبرید تولید شده با استفاده از روش نجات جنین در مقایسه با شاخه‌های طبیعی ریشه‌دار دارای میزان بیشتری زآتین داخلی بودند. این نشان می‌دهد که میزان زآتین زیاد در شاخه‌های دورگ، می تواند

عامل عدم ریشه‌دهی آن‌ها باشد. در این مطالعه، همبستگی بین میزان سیتوکنین‌های داخلی و قابلیت ریشه‌زائی توضیح داده شده است.

مشکلات موجود در تهیه هیبریدهای بین گونه‌ای چغندرقند و عدم تولید بذر کافی در گیاهان دورگ و هم‌چنین عدم وجود گیاهان هیبرید حاصل از تلاقی چغندر زراعی با گونه‌های وحشی گروه *Procumbentes*، اهمیت استفاده از تکنیک کشت جنین در محیط آزمایشگاه را بیان می‌دارد. با استفاده از این روش، علاوه بر صرف زمان کمتر در برنامه‌های اصلاحی، راندمان دستیابی به جنین‌های جوانه‌زده و نهایتاً دانهال‌های هیبرید افزایش می‌یابد(شکل۷). همان گونه که قبلا نیز ذکر شد، یکی از مشکلات جوانه‌زنی بذور به علت سختی پوسته آن‌ها است که این مانع به‌راحتی با کشت جنین برداشته می‌شود. علاوه بر این، طبق مطالعات انجام شده (Anderson and Larsen 1990) یکی از موانع تشکیل ریشه در هیبریدهای بین گونه‌ای *B.vulgaris* × *B.webbiana* بالا بودن زآتین داخلی در آن‌ها است، برطرف کردن این مشکل از طریق کشت جنین، ایجاد شرایط محیطی مناسب از نظر هورمون‌ها و با تاکید به نقش اکسین‌ها محتمل به نظر می‌رسد. همان طور که بررسی شد، ترکیب مناسب محیط کشت در رشد جنین هیبریدهای بین گونه‌ای چغندر مؤثر است و در مواردی، اگر ژن مطلوبی در گونه‌های دور چغندرقند وجود داشته باشد ،امکان انتقال ژن در تلاقی‌های بین گونه‌ای پس از رشد جنین‌ها در محیط کشت حاصل از تحقیق امکان‌پذیرخواهد بود.

منابع مورد استفاده: References:

انجمن صنفی کارخانه‌های قند و شکر ایران. ۱۳۸۲. آمار بهره‌برداری کارخانه‌های قند و شکر کشور.

یاوری. ن، ۱۳۸۳. نشریه فنی کشت بافت گیاهی. مؤسسه تحقیقات چغندرقند.

Andersen JM, Larsen B (1990) Endogenous level of cytokinins and rooting capacity of *Beta* interspecific hybrids produced via embryo rescue technique. Abstracts of International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, Netherlands 24-29 pp.

Bhojwani SS, Razdan MK (1983) Zygotic embryo culture, In: Plant tissue culture: Theory and Practice 199-237 pp

Brown TA (1996) Gene cloning: an introduction. Third edition. Chapman & Hall Publications.

Bruun L (1991) A statistical analysis of some genetical, physiological and anatomical parameters of the development of *In situ*- and *In vitro*- grown ovules from intra- and inter specific crosses in the genus *Beta*. Sex Plant Report 4: 118-125

Clark SM (1997) Plant molecular biology. A laboratory Manual. Springer. Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 3-14, 54-63, 305-328

Chen JF, Staub JE, Tashio Y, Isshiki S, Miyazaki S (1997) Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrox* Chakr. Euphytica 96:413-414

Chu CC (1978) The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. Proc Symp Plant Tissue Culture. Science Press. Peking, 43-50 pp

De Bock Thsm (1986) The *Genus Beta* domestication, taxonomy and interspecific hybridization for plant breeding. Acta Hort 182: 335-343

Honda K, Tsutsui K (1997) Production of interspecific hybrids in the *genus Delphinium* via ovule culture. Euphytica 96:. 331-337

Ishizaka H, Uemetsu J (1995) Interspecific hybrids of C*yclamen persicum* Mill. and *C. purpurascens* Mill. produced by ovule culture. Euphytica 82:31-37

Johnson RT, Wheatley GW (1961) Studies on backcross generation and advanced generations of interspecific hybrids between *B. vulgaris and B. webbiana.* Journal of the A.S.S.B.T. 6(5): 429-435

Klink A, Muller J, Wricke (1996) Characterization of nematode resistance gene in the section procumbentes genus *Beta*: response to two populations of *Heterodera schachtii*. Theor. Appl. Genet. 93:773-779

Kumlehn J, Schieder O, Lorz H (1997) *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture. Plant Cell Reports 16: 663-667

Pierik RLM (1987) Embryo culture. In: *In vitro* culture of higher plants .Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht 139-148 pp

Ram T, Mahapatra D, Ramos J, Mcnally R, Brar D S (2004) Production of advanced backcross progenies and monosomic alien addition lines from *O. sativa* ×*O. ridley*i. Rice Genetic Newsletter, Vol 20: 1-3

Savitsky H (1960) Viable diploid triploid and tetraploid hybrids between *Beta vulgaris* and species of the section Patellares. Journal of the A.S.S.B.T. Vol (XI) No,3: 215-235

Savitsky H (1975) Hybridization between *Beta vulgaris and B. procumbens* and transmission of nematode (*Heterodera schachtii*) resistance to sugar beet. Can . J Genet. Cytol. 17: 197-209

Shanchi H (2002) The efficiencies of various embryo rescue methods in interspecific crosses of *Lilium*. Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 139-146

Sharma D R, Kaur R & Kumar K (1996) Embryo rescue in plants. A review. Euphytica.89:325-337

Simmonds NW (1979) Principles of crop improvement. Longman Group Limited. 278-311

Sing DBK (1990) Plant breeding: Principles and Methods, Kalyani Publishers; New Delhi, India 138-145, 475-501 pp

Smith G A (1980) Sugar beet in hybridization of crop plants. edited by: W. R. Fehr and H. H. Hadle ASA. Madison, Wisc:601-616

Van Geyt JPC, Lange W, Oleo M, De Bock ThSM (1990) Natural variation within the *genus Beta* and its possible use for breeding sugar beet: A review. Euphytica 49: 57-76

Van Ripley L, Arnison P G (1990) Hybridization of *Sinapis alba* L and *Brassica napus* L via embryo rescue. Plant Breeding 104: 26-33

Yavari N (1979) Contribution a letude du fenouil porte- graines. Travail de Diplome dingenieur Horticole ETS, Centre Horticole de Lullier, Geneve, Susse. 33 pp

Yu MH (1984) Resistance to *Heterodera schachtii* in Patellares section of the *genus Beta.* Euphytica 33: 633-640