بررسی روش‌های سازگاری کلون‌های حاصل‌از کشت بافت چغندرقند در گلخانه، پایداری پلوییدی و بذرگیری در مزرعه

Investigation of adaptation procedures of tissue culture clones of sugar beet in greenhouse, stability of ploidy and seed production in field

پیمان نوروزی*[۱]، ایمان زندیه[۲]، محسن آقایی‌زاده[۳]، عبدالله محمدی[۴] و وحید سالاری[۲]

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۱

پ. نوروزی، ا. زندیه، م. آقایی‌زاده، ع. محمدی و و. سالاری . ۱۳۸۸. بررسی روش‌های سازگاری کلون‌های حاصل‌از کشت بافت چغندرقند در گلخانه، پایداری پلوییدی و بذرگیری در مزرعه. **مجله چغندرقند ۲۵(۱): ۱۲-۱.**

چکیده

هدف این تحقیق مقایسه چند روش ریشه‌زایی ـ سازگاری جوانه‌های باززایی شده از کشت بافت چغندرقند در شرایط محیطی گلخانه، تولید بذر در مزرعه و بررسی پایداری سطح پلوئیدی کلون‌های تتراپلویید بود. برای این منظور از دو نوع ریزنمونه قطعات ساقه گل‌دهنده و جوانه انتهائی گیاهچه بذری جهت تهیه و تکثیر کلون‌ها در محیط‌های کشت استفاده شد. سپس سه روش ریشه‌زایی- سازگاری با استفاده‌از کلون‌های حاصل به صورت طرح کرت‌های خردشده در قالب طرح پایه کرت‌های کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. سه روش شامل: ۱) ریشه‌زایی کلون‌ها در محیط کشت درون شیشه‌ای، ۲) آغشته کردن پایه کلون‌های فاقد ریشه با پودر هورمونی دست‌ساز و ۳) ریشه‌دار کردن جوانه‌ها در روش آب‌کشت بود. سپس گیاهچه‌های حاصل‌از هر روش به گلدان منتقل شد. درصد کلون‌های سازگارشده از هر روش با نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس شدند. نتایج نشان داد که بین روش اول و دوم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و هر دو نسبت به روش سوم برتری داشتند. روش دوم به‌دلیل آن‌که در آن نیازی به ریشه‌زایی جوانه‌ها در درون شیشه نیست، باعث صرفه‌جوئی در زمان (یک تا دو ماه) و هزینه‌های کشت بافت (شامل هزینه‌های پرسنلی، محیط‌های کشت و مکان نگه‌داری کلون‌ها) می‌شود. در آزمایشی دیگر، نشان داده شد که بین کلون‌های ریشه‌دار شده در دو روش اول و دوم تفاوت معنی‌داری ازنظر وضعیت ریشه وجود ندارد. افزون بر این، تعداد کروموزوم کلون‌های حاصل از سه روش سازگاری مورد مطالعه قرار گرفت و تغییرات کروموزومی در سطح پلوئیدی مشاهده نشد. کلون‌های سازگارشده در گلخانه، پس از ورنالیزاسیون به مزرعه منتقل شدند و ساقه گلدهنده تولید کردند. از کلون‌های حاصل از کشت بافت چغندرقند برای اولین بار در ایران مقدار زیادی بذر هیبرید (در حد ۶۰۰ تا ۲۰۰۰ گرم) دارای قوه نامیه تولید شد.

واژه‌های کلیدی: آب‌کشت، چغندرقند، ریشه‌زایی، سازگاری، کشت بافت، کلون

۱- استادیار مؤسسه تحقیقات چغندرقند *- نویسنده مسئول Peymannorouzi@yahoo.com
۲- دانشجویان سابق دانشگاه آزاد اسلامی- واحد کرج
۳- مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات چغندرقند
۴- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی- واحد کرج

مقدمه

کشت بافت در بیوتکنولوژی بسیار کاربرد دارد و به عنوان پایه مهندسی ژنتیک و برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ایجاد کلون‌های یکنواخت و پایدار از نظر ژنتیکی، در تحقیقات به‌نژادی بسیار با ارزش است. برای تکثیر کلون در چغندرقند به روش باززایی مستقیم از جداکشت‌های جوانه انتهایی و انتهای ساقه گل‌دهنده استفاده شده است که پایداری ژنتیکی و یکنواختی مورفولوژیکی بیشتری در مقایسه با جداکشت‌های دیگر داراد (نوروزی ۱۳۸۱؛ Coumans-Gilles et al. 1981). برای القاء ریشه‌زایی از جوانه‌های چغندرقند هورمون‌های NAA و IAA استفاده شده است و با وجود آن‌که هر دو هورمون با غلظت کم در گیاه اثر دارند ولی اثر هورمون NAA بیشتر از هورمون IAA است (Owens and Debra 1991). ریشه‌دهی جوانه‌ها در محیط دارای هورمون IBA بسیار سریع صورت می‌گیرد (Gamborg et al. 1968). میکامی و همکاران (Mikami et al. 1989) از محیط MS نصف غلظت به همراه ۱۰ میکرومولار BA برای تشکیل جوانه، از یک میکرومولار BA برای تکثیر جوانه و از ۱۰ میکرومولار IBA برای ریشه‌زایی چغندرقند در شرایط درون شیشه استفاده کردند.

محققان دیگر برای انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان بعد از تمیزکردن بقایای آگار محیط کشت، از مخلوط ماسه و زغال چوب با نسبت ۱:۱ (Jianfeng et al. 1997)، پیت‌ماس و ماسه به نسبت مساوی (Atanassov et al. 1978)، مخلوط ۱:۱ خاک و ورمی‌کولیت (Detrez et al. 1989) و یا کمپوست (Sabir and Ford- Lioyd 1990) استفاده کرده‌اند. در سال‌های اخیر مطالعات زیادی روی کشت درون‌شیشه‌ای از بافت‌های مختلف چغندرقند مانند جوانه‌های گل (Tetu et al. 1987) و سایر اندام‌ها (Freytag et al. 1988) صورت گرفته است. با استفاده‌از تکنیک ریزازدیادی از جوانه چندین گیاه، کلون ایجاد شده است که چغندرقند نیز یکی از این گیاهان محسوب می‌شود (Midema 1982, Hussey and Hepher 1978, Margara 1977). کلون‌های کشت درون شیشه‌ای مواد اصلاحی چغندرقند به عنوان روش جدید تکثیر رویشی سریع که در آن از قسمت جوانه انتهایی گل‌آذین چغندرقند استفاده می‌شود، معرفی شد (Margara 1977; Atanassov 1980; Saunders et al.1990; Miedema 1982).

بررسی‌های کومانز و همکاران (Coumans-Gilles et al. 1981) نشان داد که در چغندرقند استفاده از ساقه گل‌دهنده به عنوان منبع ریزنمونه و باززایی آن بسیار سودمندتر است و از پایداری ژنتیکی و یکنواختی مورفولوژیکی بیشتری در مقایسه با منابع دیگر برخوردار است. دیترز و همکاران (Detrez et al. 1989) برای شمارش کروموزم‌های چغندرقند حاصل از کشت بافت از برگ‌های مریستمی جوان استفاده کردند. چغندرقند یک

گیاه ترجیحاً دگرگشن و در بسیاری موارد خودنابارور است و با ازدیاد یک بوته انتخاب شده از طریق غیرجنسی می‌توان بوته‌های مشابه بوته اولیه تولید کرد و به این ترتیب قدرت تشخیص و انتخاب ژنوتیپ‌ها را برای صفات موردنظر در آزمایش‌های گوناگون به‌نژادی ارقام جدید افزایش داد. بیوتکنولوژی ازجمله فنون کشت بافت، در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه در مؤسسات تولید بذر چغندرقند در کشورهای پیشرفته در چند سال اخیر به‌طور عملی بهره‌برداری شده است (مذاکرات شخصی). اهمیت استفاده‌از کلون کشت بافت در به‌نژادی چغندرقند در این است که به‌نژادگر می‌تواند از کلون‌های مربوط به ژنوتیپ‌هایی که نتاج تست‌کراس برتری داشته‌اند، استفاده و تکرارپذیری عملکرد و یکنواختی هیبرید را تضمین کند و ماهیت رقم حفظ شود (Middelberg 2000-2004).

هدف این تحقیق مقایسه و تعیین روش مناسب ریشه‌زایی و سازگاری جوانه‌های حاصل‌از کشت بافت چغندرقند (ریشه‌دار و بدون‌ریشه) در شرایط محیطی گلخانه، بذرگیری کلون‌های سازگارشده در مزرعه و نیز تعیین پایداری پلوئیدی کلون‌ها در مرحله رویشی است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: انتهای ساقه گل‌دهنده و جوانه انتهایی گیاهچه بذری حاصل‌از یک توده بذر تتراپلوئید چغندرقند (شماره دفتر ۲۷۰۶۵) به عنوان جداکشت‌های گیاهی جهت تهیه کلون کشت بافت استفاده شد.

تهیه کلون‌های کشت بافت: جداکشت‌های ساقه گل‌دهنده در ابتدا با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شد و به محیط غذایی پایه MB تغییریافته شامل املاح MS (Murashige and Skoog 1962) و ویتامین‌های B5 (Gamborg et al. 1968) حاوی سه درصد ساکارز، هشت گرم در لیتر آگار به همراه هورمون‌های GA3, BA, IBA به‌ترتیب یک، ۰/۱ و ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر جهت القای جوانه و هورمون‌های IBA , BA, NAA به ترتیب ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جهت تکثیر جوانه‌ها منتقل شدند. جداکشت جوانه انتهائی گیاهچه بذری درون شیشه بدون نیاز به ضدعفونی شدن به محیط‌های پایه مذکور به همراه هورمون‌های BA,GA3 به‌ترتیب ۰/۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر جهت القای جوانه و هورمون‌های IBA ,NAA BA, به‌ترتیب ۰/۵، ۰/۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جهت تکثیر جوانه منتقل شدند. سپس برای ریشه‌زایی درون شیشه از محیط حاوی ترکیب هورمونی NAA و IBA به‌ترتیب ۱/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. شرایط اتاقک رشد برای نگه‌داری ظروف کشت دارای ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و شدت نور سه تا چهار هزار لوکس با دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد بود. جوانه‌های ریشه‌دار و بدون‌ریشه درون گلدان‌های ۱۰۰

گرمی در جعبه‌هایی با درب شفاف قرار گرفتند. جعبه‌ها به اتاقک رشد منتقل شدند. در اتاقک رشد درب جعبه‌ها پس‌از گذشت اولین هفته و طی هفته دوم کم‌کم برداشته شد تا به رطوبت کم مقاوم شوند. در این مدت گلدان‌ها با محلول هوگلند آبیاری و محلول‌پاشی شدند و رطوبت در حد بالا (۷۰ تا ۹۰ درصد) نگه داشته شد.

طرح آماری

(الف) سه روش ریشه‌زایی، سازگاری به عنوان کرت اصلی و چهار ژنوتیپ (کلون‌های حاصل‌از چهار تک بذر) به عنوان کرت فرعی در سه تکرار برای هر ژنوتیپ (در هر تکرار شش کلون از هر ژنوتیپ) جمعاً ۲۱۶ واحد آزمایشی (گلدان) به‌صورت طرح کرت‌های خردشده در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی برای کلون‌های هم‌اندازه حاصل‌از کشت بافت مورد مقایسه قرار گرفتند (به‌دلیل متفاوت بودن بسترهای کشت، امکان پیاده کردن طرح به صورت آزمایش فاکتوریل وجود نداشت). سه روش به شرح زیر بودند: ۱) ریشه‌زایی کلون‌ها در محیط کشت درون شیشه و سپس انتقال به گلدان‌های ۱۰۰ گرمی حاوی ترکیب خاک و پیت‌ماس (روش مرسوم در آزمایشگاه)، ۲) آغشته کردن پایه کلون‌های فاقد ریشه با پودر هورمونی حاوی NAA و IBA و سپس انتقال مستقیم آن‌ها به گلدان حاوی ترکیب مذکور (نوروزی ۱۳۸۵)، ۳) ریشه‌دار کردن جوانه‌ها در روش آب‌کشت و انتقال گیاهچه‌ها به گلدان (یاوری ۱۳۸۰). گیاه‌چه‌های به‌دست آمده از هر روش جهت ادامه رشد و سازگاری در شرایط محیطی گلخانه، در دو مرحله دیگر به گلدان‌های بزرگ‌تر ۲۵۰ گرمی و سه کیلوگرمی و سپس به گلخانه منتقل و در این مدت با آب و محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon 1950) به صورت متناوب آبیاری شدند. در نهایت، در مرحله گلدان‌های سه کیلوگرمی، درصد کلون‌های سازگار شده و متوسط سطح برگ به روش گوهری و همکاران (۱۳۷۷) از هر تیمار یادداشت‌برداری و داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SAS تجزیه آماری شدند.

(ب) در آزمایشی دیگر برای تعیین اختلاف احتمالی ازنظر وضعیت ریشه بین گیاه‌چه‌های حاصل از روش ۱ و ۲ که به ترتیب با ریشه و بدون ریشه (با آغشته‌کردن پایه جوانه به پودر هورمون) به گلدان منتقل شده بودند، کلون‌های حاصل از دو ژنوتیپ با تکرارهای نامساوی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. برای این کار، کلون‌ها به آرامی از خاک خارج شده تا به ریشه آن‌ها آسیب نرسد، سپس ریشه‌های آن‌ها شسته شده و طول و وزن تر ریشه‌ها یادداشت‌برداری شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه قرار گرفتند.

بررسی سطح پلوییدی کلون‌های سازگار شده به شرایط محیطی

برای این منظور در ابتدا، لوله‌های آزمایش موردنظر (در هر بار نمونه‌گیری ۳۶ عدد) شماره‌گذاری و درون آن‌ها محلول هیدروکسی کینولئین به عنوان پیش تیمار اضافه شد. سپس با پنس نوک باریک، جوان‌ترین برگ مریستمی کلون به طول تقریبی یک سانتی‌متر جداسازی و به محلول فوق‌الذکر منتقل شد. نمونه‌ها به مدت سه ساعت در محلول هیدروکسی کینولئین باقی‌مانده و سپس نمونه‌ها با آب مقطر شستشو شد. پس از شستشو، بر روی آن‌ها حدود سه میلی‌لیتر از محلول ۲:۱ شامل دو واحد الکل اتیلیک خالص و یک واحد اسید کلریدریک خالص اضافه شد و نمونه‌ها مدت ۳۰ دقیقه در این محلول قرار گرفتند. بعد از طی این مدت، محلول ۲:۱ تخلیه و نمونه‌ها دو بار با آب مقطر شستشو شدند. قطعه کوچکی از بافت دمبرگ روی لام منتقل و برای رنگ‌آمیزی نمونه‌ها از اورسئین استفاده شد (Dyer 1963). اسلایدهای تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت، تعدادکروموزوم‌ها زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ شمارش و از بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برای عکس‌برداری استفاده شد.

بذرگیری کلون‌های سازگارشده در مزرعه

برای این منظور، کلون‌های ۱۲- ۸ برگی جهت القاء ساقه‌روی به سردخانه ۸- ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۳ تا ۴ ماه در آنجا نگه‌داری شدند. در بهار، کلون‌های بهاره شده جهت تولید ساقه گل‌دهنده و بذر به مزرعه منتقل شدند. تولید بذر حاصل از کلون کشت بافت در مزرعه، طی چند سال اخیر و در قالب چند پروژه تحقیقاتی در مؤسسه تحقیقات چغندرقند انجام گرفته است.

نتایج و بحث

تهیه کلون

ریزنمونه‌های به‌کار رفته در ترکیبات هورمونی موردنظر در شرایط درون شیشه، کلون‌های فراوانی تولید کردند. از این مواد گیاهی برای مقایسه روش‌های ریشه‌زایی و سازگاری کلون‌ها استفاده شد.

سازگاری کلون‌ها

جوانه‌های ریشه‌دار و بدون‌ریشه منتقل شده به گلدان‌های ۱۰۰ گرمی، به علت بازکردن تدریجی درب جعبه‌ها و نیز ترکیب خاکی مناسب، پس‌از دو تا سه هفته به شرایط محیطی اتاقک رشد سازگار شدند. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که بین سه روش سازگاری اختلاف معنی‌دار وجود دارد و در مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) مشخص شد که روش یک و دو از نظر درصد کلون‌های سازگارشده در یک گروه قرار می‌گیرند و هر دو نسبت به روش سه برتری دارند.

جدول۱ تجزیه واریانس درصد کلون‌های سازگارشده حاصل از کشت بافت چغندرقند سازگارشده در شرایط گلخانه و متوسط سطح برگ کلون‌ها

منابع تغییرات	*درجه آزادی*	*میانگین مربعات*	
		درصد کلون‌های سازگارشده	متوسط سطح برگ
روش (A)	۲	۱/۸۶**	۶۱۳۸۶/۳۹**
خطای a	۶	۰/۲۲ n.s	۴۹۵۰/۳۸
ژنوتیپ (B)	۳	۰/۰۵ n.s	۱۰۲۸/۳۷ n.s
روش×ژنوتیپ (A*B)	۶	۰/۱۲ n.s	۲۰۴۳/۷۷ n.s
خطای b	۱۸	۰/۱۲	۵۳۳۴ /۸۴

** و n.s به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و غیرمعنی‌دار

جدول۲ میانگین درصد سازگاری کلون‌ها و متوسط سطح برگ کلون‌های سازگارشده در شرایط محیطی گلخانه

روش	کلون های سازگار شده(٪)	متوسط سطح برگ (سانتی‌متر مربع)
۱	۷۸ a	۲۴۱/۱۱ a
۲	۶۴ a	۱۶۹/۱۲ a
۳	۲۵ b	۷۹/۰۰ b

میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

با توجه به این‌که در روش دو نیازی به ریشه‌زایی جوانه‌ها در درون شیشه نیست؛ در نتیجه این روش باعث صرفه‌جویی در زمان (یک تا دو ماه) و هزینه کشت بافت (شامل هزینه‌های پرسنلی، محیط‌های کشت و مکان نگه‌داری کلون‌ها) می‌شود. نتایج تجزیه واریانس در جدول یک نشان می‌دهد که اثر متقابل روش در ژنوتیپ معنی‌دار نشده است. بنابراین، در آینده از هر نوع ژنوتیپی ممکن است به‌توان توسط روش موردنظر برای ریشه‌زایی- سازگاری کلون‌های حاصل‌از کشت بافت چغندرقند بهره‌برداری کرد.

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفت متوسط سطح برگ گیاهچه‌های باقیمانده از هر روش سازگاری نیز در جدول‌های یک و دو آمده است. جدول یک نشان می‌دهد که روش‌های ریشه‌زایی ـ سازگاری در

سطح یک درصد معنی‌دار شده‌اند. در جدول دو، روش یک و دو در یک گروه قرار گرفتند. گیاهان حاصل‌از روش دو (بدون‌ریشه و آغشته شده با پودر هورمون) که با هزینه و زمان کمتری به دست می‌آیند، به اندازه زمانی که از روش یک (روش مرسوم) استفاده شود قوی هستند و به راحتی فتوسنتز کرده و به شرایط محیطی سازگار می‌شوند.

نتایج آزمایش مقایسه وضعیت ریشه بین دو روش ریشه‌زایی ـ سازگاری نیز حاکی از این بود که هیچ‌گونه تفاوت آماری بین کلون‌های ریشه‌دار شده از دو روش مشاهده نمی‌شود (جدول ۳).

جدول ۳ تجزیه واریانس صفات طول و وزن تر ریشه کلون‌های حاصل‌از کشت بافت

منابع تغییرات	*درجه آزادی*	*طول ریشه*	*وزن تر ریشه*
روش ریشه‌زایی (A)	۱	۴۶/۷۳$^{n.s}$	۰/۰۷ $^{n.s}$
ژنوتیپ (B)	۱	۲/۱۶ $^{n.s}$	۰/۲۹ $^{n.s}$
اثرمتقابل روش × ژنوتیپ (A*B)	۱	۳۹/۳۲ $^{n.s}$	۰/۱۶ $^{n.s}$
خطای آزمایش	۲۰	۶۴/۶۸	۰/۴۴

n.s غیر معنی‌دار

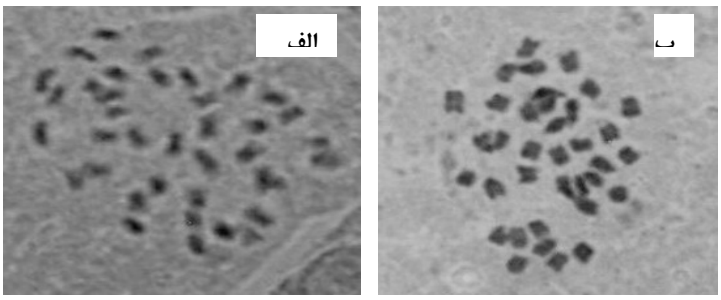
با توجه به جدول سه هیچ‌یک از منابع تغییر شامل روش‌ها، ژنوتیپ‌ها و اثرمتقابل این دو برای صفت طول ریشه و وزن‌تر ریشه معنی‌دار نشد. این امر بیان‌گر مستقل بودن روش‌ها از ژنوتیپ گیاهان و عدم اختلاف معنی‌دار بین دو روش است، بنابراین، با استفاده از روش پودر هورمون با صرف هزینه و زمان کمتر می‌توان اقدام به تولید انبوه کلون حاصل از کشت بافت کرد.

یاوری (۱۳۸۰) جهت تسریع در امر تطبیق با شرایط خارج شیشه با فراهم کردن امکان فعال‌سازی جذب از راه ریشه‌ها و نیز جلوگیری از کاهش رشد گیاهچه‌ها از یک دستگاه آب‌کشت مجهز به سیستم هوارسانی استفاده کرد و توانست تعدادی گیاهچه سازگار شده به شرایط محیطی در گلدان به‌دست آورد. در تحقیق حاضر درصد کلون‌های سازگار شده با روش یک و دو نسبت به روش سه (سیستم آب‌کشت)، ضمن آن‌که نیاز به دستگاه آب‌کشت برطرف شد، بیشتر بود. محققان دیگر برای انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به محیط خاکی بعداز پاک کردن بقایای آگار محیط

کشت، از مخلـوط مـاسه و زغـال چوب با نسبت ۱:۱ (Jianfeng et al. 1997)، پیت و ماسه به نسبت مساوی (Atanassov et al.1978)، مخلوط یک به یک خاک و ورمی‌کولیت (Detrez et al. 1989) و یا کمپوست (Sabir and Ford-Lioyd 1990) استفاده کرده‌اند. کومانز و همکاران (Coumans et al. 1981) پس‌از انتقال گیاه‌چه‌های ریشه‌دار شده به محیط خاکی آن‌ها را در رطوبت ۸۵ درصد و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار دادند. نتایج این تحقیق مشابه نتایج محققین فوق بود که در نتیجه آن گیاهچه‌های قوی و با رنگ سبز طبیعی ایجاد شدند.

نتایج بررسی سطح پلوییدی کلون‌ها

به‌طور کلی در کشت بافت گیاهان، در اکثر موارد مقداری تغییرات ژنتیکی موسوم به تنوع سوماکلونی (سلول‌های سوماتیکی) وجود دارد و عواملی نیز در ایجاد این تغییرات یا جلوگیری از به وجود آمدن آن‌ها دخیل هستند. عواملی مانند سن ریزنمونه، اندازه ریزنمونه، مواد و مقدار به‌کار رفته آن‌ها در محیط کشت، به‌خصوص هورمون‌ها در ایجاد تنوع سوماکلونی بسیار مؤثر هستند. در تحقیق حاضر از آن‌جا که گیاهچه‌های حاصل‌از کشت بافت لازم است ژنوتیپ اولیه خود را حفظ کنند تا در تلاقی‌های بعدی استفاده شوند، بنابراین تنوع سوماکلونی مناسب نیست و ثبات ژنتیکی حتماً باید در طی ایجاد کلون‌ها، حفظ شود. بررسی سیتولوژیکی کلون‌ها نشان داد که همگی کلون‌ها سطح پلوییدی خود را حفظ کرده و هیچ‌گونه تغییر در تعداد کروموزوم و سطح دسته‌های کروموزومی از خود بروز نداده و پایداری پلوییدی در آن‌ها ۱۰۰ درصد بود (شکل ۱). در تحقیق، حاضر از باززایی مستقیم جوانه رأسی و ساقه گل‌دهنده به عنوان ریزنمونه استفاده شد که پایداری پلوییدی و ثبات ژنتیکی را نشان دادند. محققان دیگر که از باززایی مستقیم و ریزنمونه‌های مشابه تحقیق حاضر استفاده و به نتایج مشابهی دست یافته‌اند، کومانز و همکاران (1981)، جیانگ فنگ و همکاران (Jiangfeng et al. 1997) و مزیی و همکاران (Mezei et al. 1993) هستند.



شکل ۱ مرحله متافاز دو سلول کلون تتراپلوییید چغندرقند (الف) و(ب).

تولید بذر حاصل از کشت بافت

در این تحقیق برای اولین بار در سال ۱۳۸۶ در حد کیلوگرم بذر S1 و هیبرید حاصل‌از کلون کشت بافت در مزرعه در قالب طرح تحقیقاتی «تهیه گرده‌افشان تتراپلوئید مقاوم به ریزومانیا با بهره‌گیری از کلون‌های کشت بافت در چغندرقند» به‌دست آمد. این مطلب در خبرنامه داخلی چغندرقند نیز به تأیید رسیده است (بی‌نام ۱۳۸۶). به طوری که مقدار بذر بوجاری شده از پنج کلون خودگشن شده در حدود ۶۰ تا ۳۶۰ گرم متغیر بود. هم‌چنین در هر ایزوله بذرگیری، پایه‌های مادری گرده‌افشانی شده با کلون‌های پایه پدری در حدود ۶۰۰ تا ۲۰۰۰ گرم بذر بوجاری شده دارای قوه نامیه تولید کردند. استفاده‌از کلون‌های حاصل از کشت بافت در تهیه ارقام چغندرقند در حفظ خصوصیات لاین‌های والدی تشکیل‌دهنده هیبرید از اهمیت زیادی برخوردار است. تکثیر این لاین‌ها از طریق بذر باعث تغییراتی در ژنوتیپ و در نتیجه در ترکیب‌پذیری آن‌ها می‌شود (Middelberg 2002-2004). لذا تکنیک ریزازدیادی تا حدود زیادی این مشکلات را مرتفع می‌سازد. بنابراین، از طریق ریزازدیادی کلونی می‌توان به مقدار موردنیاز بذر استوک با حفظ خصوصیات آن جهت تهیه بذر الیت و سپس والد گرده‌افشان رقم هیبرید تجارتی دست یافت. تهیه و نگهداری کلون از ژنوتیپ‌های اولیه یکی از روش‌های مهم کاربردی است که می‌تواند خصوصیات هر یک از ژنوتیپ‌های موردنظر را حفظ کند. مراحل تهیه کلون کشت بافت، سازگاری به شرایط محیطی و تولید بذر کلون در شرایط مزرعه در شکل دو نشان داده شده است.

شکل ۲ مراحل تهیه کلون کشت بافت چغندرقند، سازگاری و تولید بذر انبوه در مزرعه: (الف) تهیه و تکثیر جوانه یا کلون کشت بافت. (ب) انتقال کلون‌ها به گلدان ۱۰۰ گرمی و سازگاری به شرایط اتاقک رشد. (ج) انتقال کلون‌ها به گلدان ۲۵۰ گرمی و سازگاری در گلخانه. (د) انتقال کلون‌ها به گلدان سه کیلوگرمی و سازگاری در خارج از گلخانه. (ه) گلدهی کلون‌ها در مزرعه. (و) خشک کردن شاخه‌های بذری در کنار مزرعه.

منابع مورد استفاده: References:

بی‌نام. ۱۳۸۶. تولید بذر از کلون‌های مقاوم به ریزومانیای چغندرقند حاصل‌از کشت بافت در سطح مزرعه. خبرنامه داخلی چغندرقند. شماره ۱۴. آبان ماه. صفحه ۱.

گوهری، ج. توحیدلو، ق و و. یوسف آبادی . ۱۳۷۷. بررسی روند رشد چغندرقند در کرج. گزارش نهایی مؤسسه تحقیقات چغندرقند.

نوروزی، پ. ۱۳۸۱. اثر هورمون‌ها بر جوانه‌زایی مستقیم از جداکشت‌های گیاه چغندرقند. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد۳۳. شماره ۲ . صفحات ۲۴۰-۲۳۳.

نوروزی پ. ۱۳۸۵. نشاء مستقیم جوانه‌های بدون ریشه حاصل از کشت بافت چغندرقند به درون گلدان و سازگاری به شـرایط محیطی، ثبت اختراع ۳۷۳۱۳ اداره کل ثبت شرکت‌ها و مالکیت صنعتی.

یاوری ن. ۱۳۸۰. تولید گیاهچه‌های کلونی فتواتوتروفیک با به کارگیری دستگاه آب‌کشت، مجله چغندرقند. جلد ۱۷، شماره ۲، صفحه ۱۳۲.

Atanassov A, Kikindonov T, Antonova G (1978) Cytological changes in permanent sugar beet tissue cultures cultivated in vitro. In: Stoilov M (ed) Proc Intl. symp. Exp. Mut. Plants BAN, Sofia, Bolgaria, pp. 309-31

Atanassov AI (1980) Method for continuous bud formation in tissue cultures of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Breeding, 84:23-29

Coumans-Gilles MF, Kevers CI, Coumans M, Ceulemans E, Gaspar Th (1981). Vegetative multiplication of sugarbeet through *in vitro* culture of infleorescence pieces. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1: 93-101

Detrez C, Tetu T, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1989) Direct organogensis from petiole and cell layer explants in sugar beet cultured *in vitro*. Journal of Experimental Botany, 39: 917-926

Dyer AF (1963) The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations. Stain Technique, 38: 85-90

Freytag AH, Anand SC, Rao-Ardelli AP, Owens LD (1988) An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro*. Plant Cell Reports, 7: 30–34

Gamborg OL, Miler RA, Ojima K (1968) Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell. Experimental Cell Research, 50: 151-158

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water cultuer method for growing plants without soil. California Experiment Station Circ, 32:347

Hussey G, Hepher A (1978) Clonal propagation of sugar beet plants and the formation of poly ploids by tissue culture. Annals of Botany, 42: 477-479

Jianfeng Z, Tianran L, Xianglan D (1997) Highly efficient induction of sugar beet plant regeneration. Chinese Journal of Biotechnology, 13:185-191

Margara J (1970) Neoformation de bourgons in vitro chez la bettrave sucriere, *Beta vulgaris* L.C. R. Acade. Sci. Paris, Serie D, 270: 698-701

Margara J (1977) La multiplication Vegetative de la betterave (*Beta vulgaris* L.) en culture in vitro .r. Acad. Sci. Paris, 2850: 1041-1044

Mezei S, Jelaska S, Kovacev L (1993) Vegetative propagation of sugar beet from floral ramets. Journal of sugar beet research, 27:90-96

Middelberg MCG (2000-2004) Sugarbeet breeding methods (reports). Sugar Beet Seed Institute, Karaj. Iran

Midema P (1982) A tissue culture technique for vegetative propagation and low temperature preservation of *Beta vulgaris*, Euphytica, 31: 635-643

Mikami T, Kinoshita T, Saito H (1985) Clonal propagation of sugar beet plants by apical meristem culture. J. Fac. Agri, Hokkaido Univ., 62: 325-331

Mikami T, Sudoh R, Nagao E, Kinoshita T (1989) Genotypic variation in the *in vitro* morphogensis from leaf explants of *Beta valgaris* L. and *B. maritima*. Euphytica, 40: 271-273

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497

Owens LD, Debra RE (1991) Sugar beet leaf disc culture: an improved procedure for inducing morphogenesis. Plant Cell Tissue Organ Culture, 41: 165-170

Sabir AA, Ford-Lioyd BV (1990) Processing crop plant germplasm *in vitro* for mass production of regenerants: a case study with beet. Journal of Biotechnology, 17: 257-258

Saunders JW, Doley WP, Theurer JC, Yu MH (1990) Somaclonal variation in sugar beet. Biotechnology in Agriculture and Forestry. 11: 465-489

Tetu T, Sangwan RS, Sangwan-Norreel BS (1987) Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta valgaris* callus. Journal of Experimental Botany, 38: 506-517