

تأثیر مصرف TIBA در گیاهچه و پرولین در محیط کشت سلولی بر تولید جنین‌های سوماتیک در گیاه چغندر قند

(*Beta vulgaris* L.)

The effect of *in planta* TIBA and L-proline in cell culture
media on somatic embryogenesis of sugar beet

(*Beta vulgaris* L.)

بهرروز احسانی مقدم، محمود مصباح، نسرین یاوری و مرتضی توده فلاح
مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند - کرج

چکیده

اثرات تیمار TIBA در مرحله جوانه‌زنی بذر^۱ در شرایط *in vitro* و نیز پرولین در مراحل مختلف کشت سلول گیاه چغندر قند به عنوان یک گیاه دولپه‌ای بررسی گردید. بذور رقم ۹۵۹۷ چغندر قند پس از ضدعفونی سطحی در محیط نصف غلظت MS حاوی صفر و ۳ میلی‌گرم در لیتر، TIBA کشت داده شدند. برگهای گیاهچه‌های جوان، بر روی محیط حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP کشت و کالوس‌های بدست آمده در محیط MS فاقد هورمون و حاوی صفر و ۵۰ میلی‌مول پرولین تبدیل به سوسپانسیون سلولی شدند. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون بدست آمده بر روی محیط کشت اولیه جنین‌زایی حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TIBA، صفر و ۵۰ میلی‌مول پرولین به مدت سه هفته کشت و سپس کالوس‌های جنین‌زا به مدت سه هفته به محیط کشت ثانویه

1- *in planta*

جنین‌زایی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA انتقال داده شدند. پس از این مدت مشاهده گردید که پتری‌هایی که سلول‌های آنها تحت تیمار پرولین و گیاه مادری آنها نیز تحت بیش تیمار TIBA قرار داشتند، به طور متوسط حاوی ۲۰ جنین غیر جنسی بودند که این مقدار بیش از سایر تیمارها بود.

کلمات کلیدی

چغندر قند، جنین‌زایی رویشی، کشت سلول، Proline، TIBA

علائم خلاصه شده

ABA: *cis, trans*- abscisic acid; BAP: 6- benzylaminopurine; IBA: indole-3 butyric acid; MS: Murashige & Skoog inorganic salts (1962); NAA: 1-naphthaleneacetic acid; TIBA: 2,3,5- triiodobenzoic acid

مقدمه

برای اولین بار آتاناسوف (۱۹۷۶) در گیاه چغندر قند تولید جنین‌های رویشی یا غیرجنسی^۱ از سوسپانسیون سلولی را گزارش نمود ولی موفق به تولید گیاه از آنها نگردید. تتو و همکاران (۱۹۸۷) در آزمایش‌های خویش بر روی چغندر قند با تغییرات سطوح هورمونی توانستند از کالوس‌های بدست آمده از ریز نمونه‌های دمبرگ، جنین‌های رویشی را تولید نمایند. در گزارش مذکور تغییر در سطوح هورمون‌ها عاملی ضروری جهت تولید جنین‌ها ذکر گردیده است. از طرف دیگر فری‌تاگ و همکاران (۱۹۸۸) با افزودن تعدادی اسید آمینه و برخی از ویتامین‌ها به محیط MS همراه هورمون‌های BAP، IBA، بدون تغییر در سطوح آنها توانستند جنین‌های سوماتیکی را در چغندر قند بدست آورند. همچنین محققین دیگری از جمله پیدرسن و اندرسن (۱۹۸۸)، کوبالاکوا (۱۹۹۰) و تسای و ساندروز (۱۹۹۵) با تغییر سطوح هورمونی و استفاده از انواع هورمون‌ها و نیز تنینگ و همکاران (۱۹۹۲) و کولش‌رشنا و کوتز (۱۹۹۷) مستقیماً با بهره‌گیری از بافت جنین‌های زایشی توانستند مقادیر نسبتاً مناسبی از جنین‌های

1- Somatic embryo

رویشی را در چغندر قند بدست آورند.

از جمله کاربردهای جنین‌های رویشی می‌توان به بکارگیری آنها در برنامه‌های مختلف انتقال ژن و تولید گیاهان تراریخت^۱ اشاره نمود. به عنوان مثال دی‌هالوین و همکاران (۱۹۹۲) با قرار دادن جنین‌های سوماتیکی چغندر قند، در معرض اگروباکتریوم گیاهان ترانسفورم شده و گیاهانی با ساختار ژنتیکی جدید را تولید نمودند. همچنین تولید کلون‌هایی با خصوصیات جدید و مقاوم به تنش‌های زیستی و غیر زیستی به کمک روش تنوع رویشی^۲ و نیز تهیه بذور مصنوعی^۳ که با پوشش دار کردن جنین‌های رویشی توسط یک ماده ژلاتینی حاوی مواد مغذی صورت می‌گیرد (گری و پورهیت ۱۹۹۱) از دیگر موارد کاربرد آنها می‌باشد.

از آنجایی که در اغلب مواقع انتقال ژن در سطح سلولی صورت گرفته و باززایی سلول یا بافت تراریخت شده به عنوان یکی از مهمترین مسائل در بکارگیری تکنیک‌های مختلف انتقال ژن مطرح می‌باشد، افزودن سودمندی تولید لاینهای سلولی و از آن جمله تولید جنین‌های سوماتیک همواره مطلوب محققین مربوطه می‌باشد. این مقاله، بخشی از نتایج بدست آمده از تحقیقاتی است که برای اولین بار تأثیر دو عامل: ضد اکسین TIBA و اسید آمینه غیر ضروری پرولین را به طور همزمان بر یک گیاه دولپه‌ای روشن می‌سازد. این تحقیقات با هدف دست یابی به روشی تکرار پذیر و به خصوص با سودمندی بالا جهت بدست آوردن تعداد کثیری از جنین‌های رویشی مورد نیاز در تحقیقات آینده انتقال ژن و تولید لاینهای سلولی مقاوم به استرس‌ها در گیاه چغندر قند طرح‌ریزی گردید.

مواد و روشها

مواد گیاهی:

بذور رقم ۹۵۹۷ (دیپلوئید و منورژم) توسط آب ولرم شستشو داده شد و سپس به کمک الکل اتیلیک ۸۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه و نیم ساعت استریلیزه و پس از آبکشی، بر روی محیط نصف غلظت MS حاوی TIBA به غلظت‌های

1- Transformed

2- Somaclonal variation

3- Synthetic Seed

۰ و ۳ میلی گرم، ۳٪ ساکارز و ۰/۸٪ آگار کشت داده شدند. قبل از اضافه نمودن TIBA به محیط جوانه زنی، این ماده توسط میکروفیلتر (0.22 میکرون، Millipore) استریل گردید. از برگ گیاهانی که در مرحله ۶ هفتگی رشد بودند جهت آزمایش استفاده شد. مراحل تولید کالوس، تهیه سوسپانسیون سلولی و کشت سلول با اندک تغییراتی مشابه روش تسای و ساندروز (۱۹۹۵) می باشد (جدول ۱).

تولید کالوس:

برگها به قطعاتی حدوداً ۵ میلی متر مربع تقسیم و بر روی محیط MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP، ۳٪ ساکارز و ۲/۵ گرم در لیتر فیتاژل در محیط تاریکی و درجه حرارت 25°C کشت داده شدند. حدود ۲ ماه پس از کشت، کالوس های با رنگ روشن جهت مرحله بعدی به کار گرفته شدند.

سوسپانسیون سلولی:

محیط MS حاوی مقادیر صفر و ۵۰ میلی مول پرولین و بدون هورمون های گیاهی برای تولید سوسپانسیون سلولی استفاده گردید. بدین منظور ۶ عدد ارلن ۱۲۵ میلی لیتری که هر یک حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط غذایی و ۳ گرم از بافت کالوس بود در دو تکرار بکار گرفته شد. کلیه ظروف کشت به مدت دو هفته در تاریکی و بر روی دستگاه تکان دهنده (شیکر) با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شدند.

کشت سلول و تولید جنین:

پس از دو هفته، سوسپانسیون سلولی از صافی فولادی استریل به قطر ۸۰۰ میکرون گذرانده شد و سلول هایی که از صافی گذرانده شده بودند با محلول MS فاقد هورمون دوبار شستشو داده شدند. مقدار ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلول های فوق درون ۳۲ عدد ظرف پتری حاوی محیط MS شامل ۱۰۰ میلی گرم در لیتر میواینوسیتول، ۱ میلی گرم در لیتر تیامین، ۰/۵ میلی گرم در لیتر نیکوتینیک اسید، ۰/۵ میلی گرم در لیتر پیریدوکسین، همراه با ۵۰ میلی مول، پرولین و بدون آن بعلاوه ۳٪ ساکارز و ۲/۵ گرم در لیتر فیتاژل در روشنایی ضعیف و دمای 25°C به مدت سه هفته کشت داده شدند. تنظیم

کننده‌های رشد شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TIBA بودند. سلول‌هایی که در محیط سوسپانسیون حاوی پرولین کشت شدند در محیط کشت بعدی آنها (محیط کشت اولیه جنین‌زایی) نیز این ماده به همان مقدار اضافه شد. در مرحله بعدی، کالوس‌های حاصل از کشت سوسپانسیون به محیط کشت ثانویه جنین‌زایی جهت تحریک هرچه بیشتر تولید جنین انتقال داده شدند که شامل محیط MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر یا ۳٪ ساکارز و ۳/۵ گرم در لیتر با ۰/۳۵٪ فیتاژل بود. هورمون‌های این مرحله عبارت بودند از: ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA.

باززایی گیاه:

پس از سه هفته جنین‌های بدست آمده به محیط پیش تیمار MS ۱/۲ فاقد هورمون، انتقال داده شدند و حدوداً سه هفته در این محیط استقرار یافتند. این جنین‌ها سرانجام جهت تولید هر چه بیشتر ریشه، قبل از انتقال گیاهچه به خاک، به محیط MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA کشت داده شدند. جدول ۱ خلاصه محیط کشت‌های مختلف حاوی پرولین و هورمون‌های مورد استفاده و مدت زمان هر یک از مراحل کشت را نشان می‌دهد.

نتایج و بحث

با توجه به ترکیب تیمار TIBA (در مرحله گیاهچه‌ای) و پرولین (در مرحله کشت سوسپانسیون سلولی و اولین محیط جنین‌زایی)، کلیه ظروف پتری در چهار دسته تقسیم‌بندی گردید:

(A) تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر TIBA همراه با ۵۰ میلی‌مول پرولین، (B) تیمار ۳ میلی‌گرم در لیتر TIBA بدون پرولین، (C) بدون TIBA همراه با ۵۰ میلی‌مول پرولین و (D) بدون TIBA و پرولین.

بذوری که در تکرارهای حاوی ۳ mg/l TIBA کشت شده بودند (A و B) تولید گیاهچه‌هایی را نمودند که در مقایسه با شاهد کوچک و ضعیف و دارای برگ‌های پیچیده و فنری شکل بودند. ریشه‌های این گیاهان خاصیت ژئوتروپیسم منفی داشتند و در نتیجه به سمت بالا رشد نموده بودند.

جدول شماره ۱- ترکیب محیط کشت، پرولین و هورمون‌های مورد استفاده و مدت زمان هریک از مراحل کشت ریز نمونه جهت تولید جنین‌های سوماتیک در گیاه چغندر قند *B. vulgaris*

Table 1- *In vitro* culture stages, media composition and growth conditions for sugar beet somatic embryogenesis and plant regeneration.

مرحله Culture stage	محیط کشت Culture medium	هورمون‌های رشد (mg/l) Growth regulators				L- Proline (mM)	طول مدت هفته Culture duration (weeks)
		BAP	NAA	TIBA	IBA		
تهیه گیاهچه Seedling growth	1/2MS	-	-	0-3	-	-	6
تولید کالوس Callus induction	MS	1.0	-	-	-	-	9
سوسپانسیون سلولی Cell suspension	MS	-	-	-	-	0-50	2
محیط کشت اولیه جنین زایی Primary embryo induction medium	MS	1.0	-	0.5	-	0-50	3
محیط کشت ثانویه جنین زایی Secondary embryo induction medium	MS	0.5	0.2	-	-	-	3
محیط پیش تیمار گیاه کامل Whole plant pretreatment	1/2MS	-	-	-	-	-	3
محیط ریشه زایی root growth	MS	-	-	-	3	-	4

البته چنین علائمی قابل پیش‌بینی بود، زیرا TIBA در حقیقت ضد اکسینی است که از حرکت اکسین‌های داخلی در بافت‌های گیاهی جلوگیری به عمل می‌آورد و احتمالاً باعث بر هم خوردن نسبت اکسین : سیتوکنین در گیاه می‌گردد (روسی و همکاران ۱۹۹۶). کالوس‌های بدست آمده از ریز نمونه‌هایی که گیاهچه‌های مادری آنها تحت پیش تیمار ۳ میلی گرم در لیتر این ماده بودند (A و B) بیشتر به رنگ سفید و یا زرد روشن بودند. در عوض کالوس‌های حاصل از کشت ریز نمونه‌هایی که گیاهان مادری آنها تحت پیش تیمار TIBA قرار نداشتند، دارای نقاط قهوه‌ای تیره زیادتری بودند. همچنین سوسپانسیون سلولی بدست آمده از کالوس‌های سفیدرنگ تیمار شده با TIBA پس از

گذشت ۲ هفته (در مرحله رشد لگاریتمی^۱) دارای رنگی لیمویی بود، که در مراحل بعدی رشد، کلنی‌ها و کالوس‌های حاصل از سلول‌های فوق رنگ روشن خویش را حفظ نمودند (شکل A-۱) در حالیکه نمونه‌های شاهد (کالوس‌های تیمار نشده)، دارای رنگی تیره بودند. ادامه مراحل کشت سلول جهت تولید جنین‌های سوماتیکی با استفاده از کالوس‌های حاصله از گیاهان تیمار نشده با TIBA (جدول ۲-C و D) و نیز نمونه‌هایی که در محیط کشت اولیه جنین‌زایی آنها از ترکیبات هورمونی NAA و ABA استفاده گردید (نتایج نشان داده نشده است)، هیچکدام منجر به ظهور جنین نگردیدند که این نتایج مغایر با نتایج تسای و ساندرز (۱۹۹۵) می‌باشد زیرا آنها با ترکیبات مختلف NAA و ABA توانستند حدود ۱۵ جنین سوماتیکی در هر پتری تولید نمایند. شاید بتوان گفت که یکی از دلایل این مغایرت به علت رقم مورد استفاده در تولید جنین‌زایی بوده است. شواهد حاکی است که رقمی که این دو محقق از آن استفاده نمودند عبارت بود از REL-1 که صرفاً جهت تحقیقات بیوتکنولوژی و از آن جمله تحقیقات مربوط به مهندسی ژنتیک و تکثیر بهتر در شرایط *in vitro* تولید گردیده است. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که داشتن خصوصیت باززایی و ریزازدیادی از صفات ژنتیکی بوده که حتی قابل اصلاح در گیاه نیز می‌باشد (ساندرز ۱۹۹۸).

تاکنون تفاوت سیتولوژیکی سلول‌های جنین‌زا با غیرجنین‌زا و نحوه تشکیل جنین‌های سوماتیک و تأثیر هورمون‌ها در جنین‌زایی در منابع مختلف به تفصیل توضیح داده شده است (پی‌ریک، ۱۹۸۷). به طور خلاصه سلول‌های جنین‌زا دارای صفات عمومی مشخصی می‌باشند از جمله به قدرت تکثیر بالا، اندازه کوچک، غلظت زیاد محتویات سیتوپلاسمی، هسته بزرگ و واکوئل کوچک می‌توان اشاره نمود. در تحقیق حاضر مطالعه سیتولوژیکی سلول‌ها و کلنی‌های آنها یک هفته پس از انتقال سلول‌ها به محیط کشت اولیه جنین‌زایی حاکی از تعداد بیشتر سلول‌ها و کلنی‌های جنین‌زا (شکل C-۱) نسبت به سلول‌های غیرجنین‌زا (شکل B-۱) در نمونه‌هایی بود که گیاه مادری آنها تحت تأثیر تیمار TIBA قرار داشتند و از پرولین در مراحل مختلف کشت سلولی آنها استفاده شده بود (نمونه‌های A).

۳ هفته پس از انتقال سلول‌های حاصل از سوسپانسیون که گیاه مادری آنها تحت تیمار TIBA در مرحله جوانه‌زنی قرار داشتند، به محیط کشت اولیه جنین‌زایی فاقد پرولین (B)، کالوس‌های اندام‌زا با مشخصات رنگ سبز روشن، نرم و با سرعت رشد زیاد و در بعضی موارد به رنگ زرد روشن و نسبتاً فشرده مشاهده شدند. در صورتیکه همه پتری‌های حاوی سلول‌هایی که گیاه مادری آنها تحت تیمار TIBA قرار داشتند و از پرولین در کشت سلولی استفاده شده بود (A) عمدتاً کالوس‌های جنین‌زا با سرعت رشد کم مشاهده گردید (شکل D-۱). با انتقال کالوس‌های جنین‌زای هر دو نمونه به محیط کشت ثانویه جنین‌زایی در تکرارهایی که از پرولین در مراحل کشت سلولی آنها استفاده نشده بود (جدول ۲ (B)) بطور متوسط ۲ جنین و در پتری‌هایی که از پرولین در مراحل کشت سلولی آنها استفاده شده بود (جدول ۲ (A))، بطور متوسط ۲۰ جنین شناسایی گردید. اشکال جنین‌های مشاهده شده عبارت بودند از جنین با کوتیلدون‌های کامل و هیپوکوتیل سفید (شکل E-۱) به صورت قلبی (کوتیلون‌های به هم چسپیده) و بیضوی و در مراحل پیشرفته‌تر با کوتیلدون‌های مشخص و سبز روشن که این جنین‌ها به سادگی قابل جداسازی از کالوس بودند (شکل F-۱) که پس از جمع‌آوری آنها (شکل G-۱) جهت تولید گیاه کامل به محیط $1/2 MS$ انتقال داده شدند (شکل H , I -۱). در این حال، بیشترین میزان جنین که عبارت بود از ۲۵ عدد در هر ظرف پتری در تیمار (A) مشاهده گردید.

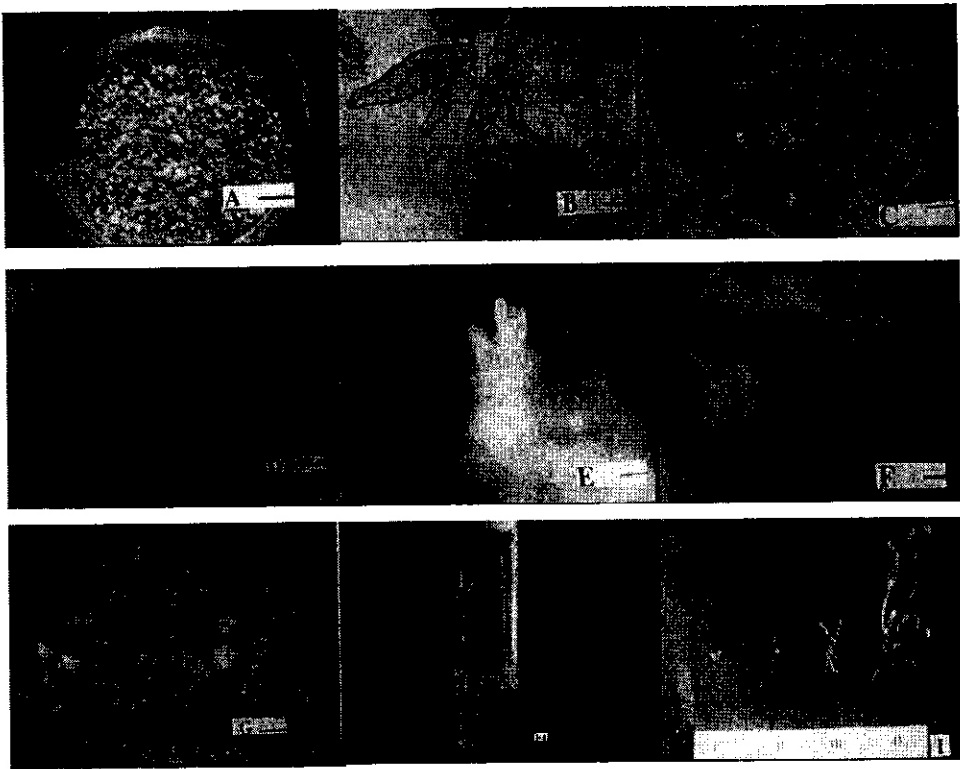
بنابراین جنین بنظر می‌رسد که گرچه TIBA به خصوص در مرحله پیش تیمار گیاهان مادری نقش تعیین کننده‌ای بر ظهور مراحل مختلف اندام‌زایی در کشت ریز نمونه‌های بافت برگ چغندر فند دارد ولی صرف استفاده از آن با یک سیتوکینین (در اینجا BAP) باعث جنین‌زایی کمتر می‌شود. از سوی دیگر با افزودن تنها پرولین در مراحل کشت سلولی (جدول ۱) نمونه‌هایی که گیاهان مادری آنها تحت تیمار TIBA قرار نداشتند، حتی با گذشت دو ماه از انتقال سلول‌های سوسپانسیون به محیط جنین‌زایی، هیچ علائم مشخصی از جنین‌زایی و حتی اندام‌زایی نشان ندادند. در صورتیکه ترکیب این دو عامل یعنی استفاده از TIBA به صورت اضافه نمودن به محیط کشت بذور (و تولید جوانه بذری) و افزودن پرولین به محیط‌های کشت سلولی تا مرحله ظهور جنین‌های سوماتیکی (نمونه‌های A) باعث تولید تعداد قابل ملاحظه‌ای جنین ۶ هفته پس از کشت سلولی می‌شود.

جدول شماره ۲- تأثیر تیمار TIBA در مرحله جوانه‌زنی بذر و پرولین بر جنین‌زایی سوماتیکی، سه هفته پس از انتقال کالوس‌ها بر محیط کشت ثانویه جنین‌زایی

Table 2- The effect of *in planta* TIBA treatment and proline on somatic embryogenesis three weeks after the transfer of calli onto the second embryo induction medium

تعداد جنین‌های سوماتیک در هر ظرف Number of somatic embryos per plate				
ظرف Plate	همراه با ۲mg/l TIBA <i>in planta</i> 3mg/l <i>in planta</i> TIBA treatment		بدون تیمار TIBA <i>in planta</i> Without <i>in planta</i> TIBA treatment	
	With 50 mM Proline (A)	Without proline (B)	With 50 mM Proline (C)	Without proline (D)
1	15	2	0	0
2	22	1	0	0
3	21	0	0	0
4	18	0	0	0
5	19	3	0	0
6	17	3	0	0
7	23	4	0	0
8	25	3	0	0
میانگین Mean	20	2	0	0

پیش از این نتایج متفاوتی از به کارگیری TIBA در مراحل مختلف کشت‌بافت چغندر قند گزارش شده است. نتایج تحقیقات هوکرونا بوریس (۱۹۷۵)، تتو و همکاران (۱۹۸۷)، جک و همکاران (۱۹۹۲ و ۱۹۹۳) حاکی از تأثیر مثبت آن در مراحل مختلف اندام‌زایی بوده است. در حالی که تسای و ساندروز (۱۹۹۷) اهمیت این ماده را در جنین‌زایی سماتیک ناچیز تشخیص دادند و کولشرشتا و کوتز (۱۹۹۷) تأثیر مثبت آن بر جنین‌زایی رویشی را گزارش نمودند. نتایج ارائه شده در این مقاله اثر مثبت تیمار TIBA بر بافت گیاه مادری، در مرحله جوانه‌زنی بذر و در حضور پرولین در مراحل رشد سلولی و بافت گیاهی چغندر قند را برای تولید جنین‌های رویشی نشان می‌دهد.



شکل ۱- جنین‌زایی سوماتیک در گیاه چغندرقد (*Beta vulgaris*) از طریق کشت سوسپانسیون سلولی (A) کشت سلولی بر روی اولین محیط جنین‌زایی پس از گذشت ۲ هفته، شاخص ۵/۸ میلی‌لیتر، (B) سلول‌های غیر جنین‌زا، شاخص ۱۳۰ میکرون، (C) کلنی سلول‌های جنین‌زا، شاخص ۳۵ میکرون، (D) کالوس‌های جنین‌زا، پس از گذشت ۳ هفته، شاخص ۲/۵ میلی‌لیتر، (E) جنین رویشی با هیپوکوتیل و کوتیلدون‌های سفید رنگ، شاخص ۱ سانتی‌متر، (F) جنین رویشی با کوتیلدون‌های اولیه سبز رنگ، شاخص ۰/۴۸ میلی‌لیتر، (G) جنین‌های جداسازی شده با شکل‌های مختلف، شاخص ۱/۲ میلی‌متر، (H) گیاه کامل حاصل از جنین رویشی و (I) مراحل مختلف تبدیل یک جنین سوماتیکی به گیاه

Fig 1- Somatic embryogenesis of *B. vulgaris* through cell suspension culture. (A) Culture of the cells on the first embryogenesis induction medium after 2 weeks, bar: 5.8 mm; (B) Non-embryogenic cells, bar: 130 μ m; (C) Embryogenic cell colony, bar: 35 μ m; (D) Embryogenic calli after 3 weeks, bar: 2.5 mm; (E) Somatic embryo with white hypocotyl and cotyledons, bar: 1 cm; (F) Somatic embryo with light green primary cotyledon, bar: 0.48 mm; (G) Isolated somatic embryos with different shapes, bar: 1.2mm; (H) Whole plant from somatic embryo & (I) Development of somatic embryo to whole plant.

همچنین در گزارش دیگری، آبیاری گیاهان چغندر قند کشت شده در گلخانه با محلول غذایی حاوی TIBA و کشت قطعات برگ این گیاهان در شرایط *in vitro* گیاهان بسیاری باززایی گردیدند در صورتیکه کالوس‌های گیاهان شاهد که تحت تیمار این ماده قرار نداشتند توانایی تولید جوانه را نشان ندادند (روسی و همکاران ۱۹۹۶). البته در گزارش فوق به تاثیر این تیمار بر جنین‌زایی سوماتیک اشاره‌ای نشده است. از طرف دیگر گزارش‌های دیگری نیز با بررسی چگونگی تاثیر پرولین در کشت بافت برخی گیاهان تک لپه از تاثیر مثبت آن در تولید جنین در کشت کالوس ذرت (آرمسترانگ و گرین ۱۹۸۵، سوپراسنا و همکاران ۱۹۹۴، پردی و پتولینو ۱۹۹۰) و نیشکر (واسیل و واسیل ۱۹۸۶، فیتچ و مور ۱۹۹۳) و کشت سوسپانسیون سلولی در برنج (اوزاوا و کومامین ۱۹۸۹) دلالت دارد. همچنین گفته شده است که پرولین باعث تحریک باززایی گیاه از جنین‌های رویشی برخی تک‌لپه‌ایها نظیر جو، ذرت، برنج و علف *Miscanthus* شده است (رنگل و ژلاسکا ۱۹۸۶، آرمسترانگ و گرین ۱۹۸۵، چودهری و همکاران ۱۹۹۳، هولم و همکاران ۱۹۹۷). ولی تاکنون گزارشی حاکی از تاثیر TIBA بر جنین‌زایی یا اندام‌زایی ریز نمونه‌های حاصل از گیاهانی که تحت تاثیر این ماده در شرایط *in vitro* رشد کرده باشند و همچنین از چگونگی تاثیر پرولین در کشت سلول یا بافت و باززایی آن در گیاهان دولپه‌ای و بخصوص چغندر قند و تاثیر متقابل این دو ماده، ارائه نشده است. تاکنون نقش فیزیولوژیکی اسید آمینه غیر ضروری پرولین جهت تنظیم عملکرد آنزیم‌های مؤثر در گیاهان تحت تنش (استوارت و بوگس ۱۹۷۷) و همچنین در چگونگی ذخیره‌سازی منابع ازت و کربن در گیاهان تحت تنش مشخص شده است (جاگر و میر ۱۹۷۷). ولی مکانیسم تاثیر بیوشیمیائی این ماده در کشت بافت گیاهی و بخصوص در کشت سلول چندان روشن نمی‌باشد. هرچند که در کشت بافت برخی گیاهان به نظر می‌رسد که اثر متقابلی بین پرولین و سایر اسیدهای آمینه موجود در محیط کشت قابل تأمل باشد (تریجیانو و کونگر ۱۹۸۷)، بنابراین به نظر می‌رسد که افزودن پرولین به محیط کشت سلولی ضمن کاهش پتانسیل آبی محیط سلولی، باعث افزایش تنش در سلول‌ها شده که تاثیر اخیر باعث افزایش تجمع مواد غذایی در سلول میگردد. به این ترتیب شاید بتوان گفت که در حضور ضد اکسین TIBA سلول‌های تحت تنش که انباشته از مواد غذایی می‌باشند، تمایل بیشتری به زادآوری و تولید سریع‌تر جنین غیر جنسی از

خود نشان می‌دهند، پدیده‌ای که در طبیعت (افزایش زادآوری به هنگام تنش در گیاه) نیز مشاهده می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- 1- Armstrong, C.L & C.E. Green, 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214.
- 2- Atanasov, A.I. 1976. Analysis of organogenetic abilities of continuously cultivated somatic tissues of sugar beet on the basis of obtaining single-celled clones and suspension cultures. Pages 69-80. In F.J. Novak (ed.): Use of tissue cultures in plant breeding. Institute of Ex. Bot., Olomouc.
- 3- Chowdhry, C.N., A.K. Tyagi, N. Maheshwari, & S.C. Maheshwari, 1993. Effect of L-proline and L-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. CV. Pusa 169). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 357-361.
- 4- D'Halluin, K., M. Bossut, E. Bonne, B. Mazur, J. Leemans, & J. Botterman, 1992. Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Bio/Techno/.* 10: 309-314.
- 5- Freytag, A.H., S.C. Anand, A.P. Rao-Arelli, & L.D. Owens, 1988. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 7: 30-34.
- 6- Fitch M.M.M & P.H. Moore 1993. Long-term culture of embryogenic sugarcane callus. *Plant Cell Tiss & Org. Cult.* 32: 335- 343.
- 7- Gray, D.J., & A. Purohit, 1991. Somatic embryogenesis in development of synthetic seed technology. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 33- 61.
- 8- Holm, I.B., P. Krogstrup & J. Hansen, 1997. Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus* X

- ogiformis Honda Giganteus, as affected by proline. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50: 203- 210.
- 9- Hooker, M.P., & M.W. Nabors, 1977. Callus initiation, growth, and organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris L.*). Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, 84: 237- 46.
- 10- Jacq, B., T. Tetu, R.S. Sangwan, A. DE. Laat, & B.S. Sangwan-Norreel, 1992. Plant regeneration from sugar beet (*Beta vulgaris L.*) hypocotyls culture *in vitro* and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants. Plant Cell Rep. 11: 329- 333.
- 11- Jacq, B., T. Tetu, R.S. Sangwan, A. DE. Laat & B.S. Sangwan-Norreel, 1993. Efficient production of uniform plants from cotyledon explants of sugar beet (*Beta vulgaris L.*). Plant Breeding 110: 185- 191.
- 12- Jäger, H-J & H.R. Meyer, 1977. Effect of water stress on growth and proline metabolism of *Phaseolus vulgaris L.* Oecologia 30:83- 96.
- 13- Kubalakova, M., 1990. Somatic embryogenesis and cytoplasmic sterility in *Beta vulgaris L.* var. *saccharifera*. Biol. Plant. 32:414-419.
- 14- Kulshreshtha, S., & R.H.A. Coutts, 1997. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from mature sugar beet (*Beta vulgaris L.*) Zygotic cotyledons. Plant Growth Regulation 22:87-92.
- 15- Murashige, T. & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473- 497.
- 16- Ozawa, K. & A. Komamine, 1989. Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long-term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa L.*). Theor. Appl. Genet. 77: 205- 211.
- 17- Paredy D.R. & J.F. Petolino, 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. Plant Sci. 67: 211- 219.

Beta. Helsingør.

- 19- Pierik, R.L.M., 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. The Netherlands. p 222.
- 20- Rengel, Z. & S. Jelaska, 1986. The effect of L-proline on somatic embryogenesis in long-term callus culture of *Hordeum vulgare*. Acta Bot. Croat 45: 71- 75.
- 21- Roussy, I., F. Dubois, R.S. Sangwan & B.S. Sangwan-Norreel, 1996. *In planta* 2,3,5 triiodobenzoic and treatment promotes high frequency and routine *in vitro* regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Plants. Plant Cell Rep. 16: 142-146.
- 22- Saunders, J.W., 1998. Registration of REL-1 and REL-2 sugar beet germplasms for tissue culture genetic manipulations Crop Sci. 38: 901- 902.
- 23- Stewart, C.R. & S.F. Boggess, 1977. The effect of wilting on the conversion of arginine, ornithine, and glutamate to proline in bean leaves. Plant. Sci. Lett. 8: 147-153.
- 24- Suprasanna, P., K.V. Rao & G.M. Reddy, 1994. Embryogenic callus in maize: Genotypic and aminoacid effects. Cereal Res. Commun 22: 79- 82.
- 25-Tenning, P., E.W. Weich, U.B. Kjarsgaard, M.A. Lelu, & M. Nihlgard, 1992. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Plant Sci. 81: 103-109.
- 26- Tetu, T., R.S. Sangwan, & B.S. Sangwan-Norreel, 1987. Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus. J. Exp. Bot. 38: 506- 517.
- 27- Trigiano, R.N. & B.V. Conger, 1987. Regulation of growth and somatic embryogenesis by proline and serine in suspension cultures of *Dactylis glomerata*. J. Plant Physiol. 130: 49- 55.
- 28- Tsai, C.J. & J.W. Saunders, 1995. Somatic embryos from callus of sugar beet

- glomerata*. J. Plant Physiol. 130: 49- 55.
- 28- Tsai, C.J. & J.W. Saunders, 1995. Somatic embryos from callus of sugar beet Biotechnology clone REL-1. J. Sugar Beet Res. 32: 215- 227.
- 29- Vasil, V & I.K. Vasil, IK. 1986. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. J. Plant Physiol. 124: 399- 408.