مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۴، شماره ۳، ۱۳۹۲ (۵۱۵-۵۰۷)

دستیابی به لاین های مقاوم به ریزومانیا در چغندر قند با استفاده از روش دابل هاپلوییدی

فرانک روزبه[1*]، داریوش داودی[2]، سهیلا تکلو[3]، مژده کاکویی نژاد[1] و سمر خیامیم[3]
۱، موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه بذر چغندر قند
۲، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۳، گروه زراعت واصلاح نباتات دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۸ - تاریخ تصویب:۹۲/۸/۱)

چکیده

علیرغم توسعه تکنولوژی دابل هاپلوییدی برای بهبود صفت مقاومت به بیماری در گیاهان مختلف، گزارشات معدودی در ارتباط با ایجاد لاین های دابلوییدمقاوم به ریزومانیا در چغندرقند وجود دارد. در این تحقیق به منظور دستیابی به لاین های خالص مقاوم به ریزومانیا وبذرگیری از آنها، از چهار توده چغندرقند دارای مقاومت نسبی به این بیماری کشت تخمک انجام گرفت. تخمک های جدا شده در محیط N6 با هورمونهای BA و NAA کشت شدند. برای تولید گیاهان دابل هاپلوییدی، گیاهچه های حاصل به صورت تک جوانه در تیمار کلشی سین در شرایط درون شیشه قرار گرفتند. ریشه زایی گیاهچه ها به صورت درون شیشه ای انجام شد و پس از سه هفته گیاهان به گلخانه منتقل شدند. پس از حذف گیاهان با تعداد کروموزومهای نامتعادل،گیاهان دابل شده پس از طی دوره مناسب سرمادهی جهت بذرگیری به مزرعه منتقل شدند و در مزرعه از آنها بذر گیری به عمل آمد. میزان پاسخگویی تخمکها در توده های مورد استفاده از ۱/۶ تا ۴ درصد متفاوت بود. بررسی های سیتولوژیکی جهت تعیین سطح پلوئیدی گیاهان حاصل از کشت تخمک، نشان داد که ۲۴/۵ درصد هاپلوییدی، ۵۹ درصد دیپلوییدی و ۱۶/۴ درصد گیاهان تتراپلوییدی بودند و میکسوپلوییدی مشاهده نشد. آزمون الایزا نشان داد لاین های دابل هاپلوییدی منشاء گرفته از توده های ۲۷۶۲۱، ۲۷۶۲۶ و ۲۷۶۲۴ از نظر مقاومت به بیماری ریزومانیا با لاین شاهد مقاوم خارجی در یک گروه قرار دارند و به عنوان لاین مقاوم حاصل از تکنیک دابل هاپلوییدی معرفی می شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که این توده ها منابع والدی مناسبی برای برنامه های اصلاحی ایجاد ارقام مقاوم به ریزومانیا در چغندرقند هستند و از طرف دیگر با استفاده از تکنیک هاپلوییدی در این گیاه دگرگشن می توان در زمان کوتاهتری به لاین های کاملاً خالص دارای صفت مقاومت به ریزومانیا در برنامه اصلاحی دست یافت.

واژه های کلیدی: مقاومت به ریزومانیا، دابل هاپلوییدی، تیمار کلشی سین، چغندر قند

مقدمه

ریزومانیا به عنوان یک بیماری جدی و خسارت‌زا در زراعت چغندرقند در جهان مطرح است و باعث کاهش شدید عملکرد ریشه و عیار قند می شود (Schimer et al., 2005; McGrann et al., 2009). این بیماری در بسیاری از مناطق چغندر کاری ایران از جمله استان خراسان و فارس گسترده است و موجب ۳۰ تا ۱۰۰ درصد کاهش در عملکرد ریشه چغندرقند می

* نویسنده مسئول: فرانک روزبه تلفن: E-mail: fardalia@yahoo.com

گردد (Todeh Falah et al., Mehrvar et al., 2009; 2000). اختلاف سطح آلودگی به ریزومانیا در مناطق مختلف کشور بین صفر تا ۵۲% گزارش شده است (Taleghani et al., 2011). بهترین روش کنترل این بیماری به عنوان مهم ترین بیماری چغندر قند، استفاده از ارقام مقاوم می باشد (Scholten et al., 2000).

دستیابی به ارقام مقاوم از طریق روش های کلاسیک اصلاح نباتات معمولاً زمان بر و پرهزینه می باشد اما کاربرد تکنولوژی دابل هاپلوییدی بویژه در چغندرقند که گیاهی دگر گشن است موجب دستیابی به لاین کاملاً خالص در زمان کوتاهتر و هزینه کمتر می گردد. بهترین روش برای تولید دابل هاپلویید در چغندر قند کشت درون شیشه‌ای تخمک لقاح نیافته است (Lux et al., 1990; d'Halluin & Keimer, 1989; Goska, 1985; Pierik, 1989 Gurel et al., 1998).

کشت تخمک در چغندر قند اولین بار در سال۱۹۸۳ گزارش شد (Hosemans & Bossoutrot, 1983). در سال ۱۹۸۵، گاسکا در لهستان پس از سال‌ها تلاش برای دستیابی به گیاه هاپلویید چغندرقند توانست به تولید حدود ۲/۴ درصد گیاه هاپلویید چغندرقند برسد (Goska, 1985). پس از آن محققان مختلف جهت دستیابی به گیاهان دابل هاپلویید در چغندرقند از کشت تخمک استفاده کردند (Doctrinal, et al., 1989 ; d'Halluin & Keimer, 1989; Doctrinal, 1995; Pedersen & Keimer, 1996).

جهت دوبرابر کردن کروموزوم های گیاه هاپلویید از تیمارهای متفاوتی استفاده می شود و گزارشات متعددی در مورد استفاده از کلشی سین به عنوان مؤثرترین عامل دوبرابر کردن کروموزوم‌ها منتشر شده است (Rao et al., 1996, Hansen. et al., 2000, Hansen et al., 2009). بررسی‌های انجام شده در آزمایشگاه کشت بافت مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند نشان داد که بهترین تیمار کلشی سین در گیاهچه های تک جوانه چغندرقند، قبل از مرحله ریشه زایی در شرایط درون شیشه ای است (Yavari, 2000; Rouzbeh., 2004).

برای ارزیابی مقاومت به ریزومانیا آزمون‌های گلخانه‌ای گوناگون براساس روشهای تلقیح متفاوت تشریح شده است(Grassi et al., 1988; Paul et al., 1992). آزمون‌های گلخانه‌ای براساس خاک آلوده به BNYVV و سپس برآورد غلظت ویروس در ریشه چه‌های گیاهان، باعث می‌شود که متخصصین اصلاح نباتات نیاز کمتری به آلوده نمودن مزارع برای ارزیابی مواد ژنتیکی خود داشته باشند. بنابراین، کارایی اصلاح برای مقاومت به ریزومانیا افزایش می یابد (Scholten et al., 2000). علیرغم توسعه تکنولوژی دابل هاپلوییدی برای بهبود صفت مقاومت به بیماری در گیاهان مختلف، گزارشات معدودی در ارتباط با ایجاد لاین های دابلوییدِ مقاوم به ریزومانیا در چغندرقند وجود دارد (Pedersen & Keimer,1996). با توجه به خسارت بیماری ریزومانیا در سطح کشور و نیاز مبرم به ارقام چغندرقند مقاوم به این بیماری و پتانسیل تولید لاین های کاملاً هموزیگوت در مدت زمان کم با استفاده از روش دابل هاپلوییدی، این تحقیق به منظور دستیابی به لاین های خالص مقاوم به ریزومانیا با استفاده از کشت تخمک وسپس تهیه بذر مقاوم از آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق طی سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۸۹ در موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه بذر چغندر قند طی مراحل ذیل انجام شد.

مواد گیاهی: ریشه ورنالیزه شده توده های چغندر قند با مقاومت نسبی به ریزومانیا (Mesbah et al., 2005) با شماره های: ۲۷۶۲۱، ۲۷۶۲۴، ۲۷۶۲۶ و ۲۷۶۲۹ پس از کشت در گلدان درگلخانه با شرایط نوری ۲۰۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه و دمای حداقل/حداکثر ۲۵/۱۵ ورطوبت ۶۰٪ قرار داده شدند.

پس از رشد رویشی و زایشی یعنی به ساقه رفتن گیاهان، تمام گیاهانی که به ساقه نرفتند و عقیم بودند ساقه روی تمام گیاهان عقیم حذف شده و بقیه بوته‌ها جهت رشد بهتر هر دو هفته یکبار با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند (Hoagland et al., 1950).

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها جهت کشت تخمک: پس از تشکیل ساقه گل دهنده روی بوته‌ها، از ساقه‌هایی که در قاعده آنها شکفتن گلها آغاز شده ولی اکثر غنچه‌ها ناشکفته بودند، نمونه‌برداری از ساقه های منوژرم طبق روش Doctrinal et al., (1990) انجام

گرفت. این نمونه‌ها همراه با مشخصات گیاه به آزمایشگاه منتقل شد. سپس ساقه های برداشت شده پس از حذف گل‌های شکفته و برگچه‌های اضافه، ضد عفونی شدند.

کشت تخمک و تهیه گیاهچه هاپلوئید : پس از مراحل استریلیزاسیون کشت تخمک انجام شد. در طی مراحل انجام کشت تخمک سعی گردید تخمک‌های کامل و کاملا رسیده با رنگ سفید مایل به شیری در پتری دیش کشت گردد. تخمک غنچه‌های رسیده و کاملاً بسته (Doctrinal et al., 1990; Yavari., 1996) با استفاده از میکروسکوپ تشریح از درون تخمدان گل بوسیله سوزن تشریح بیرون آورده شد و در پتری دیش حاوی محیط N6 با هورمون‌های BA و NAA به ترتیب به میزان ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر و ساکارز ۶ % و ۱ گرم در لیتر پودر زغال کشت شدند و در تاریکی و دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ماه نگهداری شدند (Roozbeh, 2004). در طی مدت انکوباسیون، پتری های حاوی تخمک‌های کشت شده مرتب بازنگری شده وتخمکهایی که باززایی مستقیم داشتند (شکل۱ چپ) به محیط N6 با هورمون‌های BA و NAA و به ترتیب به میزان ۰/۵ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر و ساکارز ۳% منتقل شدند. تخمک‌هایی که رشد کالوسی داشتند به محیط PGOB با هورمونهای BA و NAA به ترتیب به میزان ۰/۲ و۰/۵ جهت تحریک جوانه‌زنی منتقل شدند (Gürel et al., 2002; Roozbeh, 2004) .

سپس گیاهچه‌های هاپلویید به دست آمده در محیط N6 حاوی هورمونهای BA وGA3 و NAA به ترتیب ۰/۵ و ۰/۱ و ۰/۲ جهت رشد و تکثیر قرار گرفتند (Roozbeh, 2004) . تهیه گیاهان دابل هاپلوئید: برای تولید گیاهان دابل هاپلوئید، گیاهچه های هاپلویید حاصل بصورت تک جوانه در تیمار کلشی سین در شرایط درون شیشه قرار گرفتند. این تیمار با محلول میکروفیلتر شده کلشی سین ۰/۱% و دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۱/۵% در محیط N6 و ساکارز ۳ درصد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سپس گیاهچه ها به محیط پایه N6 که فقط حاوی هورمون BA به میزان ۰/۲ میلی گرم در لیتر و ساکارز ۳ % بود منتقل شدند (Yavari, 2000 ; Roozbeh, 2004). ریشه دار نمودن گیاهچه های دابل هاپلویید: برای ریشه دار کردن گیاهچه های دابل هاپلویید، از محیط کشت پایه MS همراه با ۳ میلی گرم در لیتر هورمون NAA استفاده شد. گیاهچه‌های دابل هاپلویید پس از کشت در محیط مذکور در شرایط محیطی با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی در فیتوترون قرار داده شدند. پس از سه هفته گیاهان دابل هاپلویید ریشه دار شده از شیشه های کشت خارج کرده و ریشه های آنها کاملا با آب جاری شسته شدند و سپس در گلدانهای استکانی حاوی ترکیبی از پیت ماس، خاک گلخانه وپرلیت با نسبت ۲:۴:۴ کشت شده و در جعبه های شفاف جهت سازگاری در فیتوترون قرار گرفتند وپس از دو هفته به گلخانه منتقل و در گلدان‌های بزرگ یک کیلویی حاوی پیت ماوس و خاک مزرعه به نسبت ۳:۱ کشت شدند (Roozbeh, 2004). در گلخانه مراقبت‌های تغذیه‌ای وسم پاشی انجام شد.

بررسی های سیتولوژیکی: قبل از انتقال گیاهان دابلد هاپلوئید به مزرعه، آزمایشات سیتولوژیکی به منظور شمارش کروموزومی با استفاده از مریستم انتهائی ریشه صورت گرفت (Sharma et al., 1965; Arjmand, 1976) . این مرحله به منظور تعیین پلوییدی قبل از انتقال گیاهان دابل هاپلویید به مزرعه انجام شد تا تنها گیاهان دابل شده پس از طی دوره مناسب سرمادهی جهت بذرگیری به مزرعه منتقل شوند. گیاهان دابل هاپلویید ورنالیزه شده در اوایل اردیبهشت به مزرعه منتقل شدند و در زمان مناسب جهت جلوگیری از گرده افشانی ناخواسته و به منظور بذرگیری، کیج گذاری انجام شد. آزمایشات گلخانه ای و آزمون الایزا: بدین منظوربذرهای به دست آمده از لاین های دابل هاپلوئید به همراه دو شاهد حساس (ارقام رسول و رجینا) و یک شاهد مقاوم (رقم بریجیتا) در قالب طرح کاملا تصادفی نامتعادل در شرایط گلخانه از نظر مقاومت به بیماری ریزومانیا مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا بذرها در جعبه های گلدانی حاوی کمپوست استریل کشت شد. دو ماه بعد از کاشت، گیاهچه های رشد یافته به گلدانهای حاوی ۴ واحد خاک آلوده به ریزومانیا و ۶ واحد کمپوست استریل منتقل و یک ماه در گلخانه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تعداد تکرار برای هر لاین معادل تعداد گیاهچه های رشد یافته آن لاین و هر

گیاهچه در یک گلدان قرار داده شد (جدول ۳). آزمون الایزا برای گیاهچه های هر لاین به روش ساندویچ دو طرفه آنتی بادی بر اساس روش (1977) ,.Clark et al، با کمی تغییرات انجام شد. از عصاره برگ Nicotiana clevelandii که آلوده به ویروس BNYVV بود، به عنوان شاهد مثبت و عصاره نمونه سالم به عنوان شاهد منفی (رقم حساس چغندرقند رجینا کاشته شده در ماسه استریل) استفاده شد (تعداد تکرار عصاره های شاهد مثبت و منفی در جدول ۳ آورده شده است). جهت تعیین غلظت ویروس هر یک از نمونه‌ها از دستگاه پلیت خوان (Elisa reader) با طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد. با اندازه گیری میانگین اعداد ثبت شده در چاهک های شاهد منفی (X) ، نمونه های دارای طول موج بالاتر از 2X بعنوان آلوده و نمونه هایی با طول موج‌های کمتر از آن بعنوان نمونه های سالم در نظر گرفته شد(Amiri, et al., 2009).

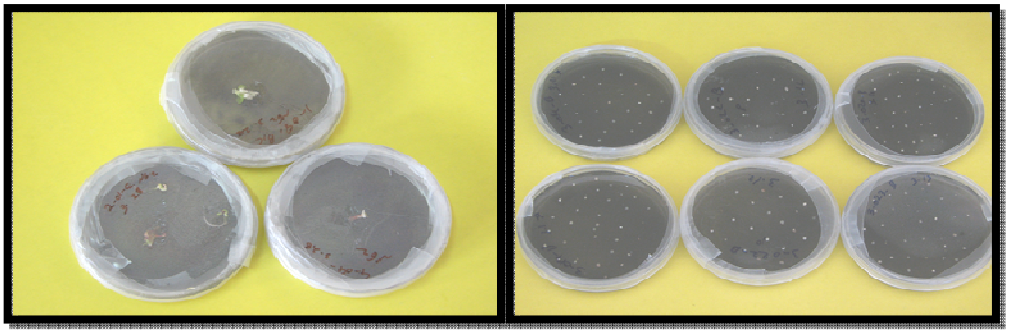
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های بدست آمده از آزمایش‌های ارزیابی مقاومت با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده ها و مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

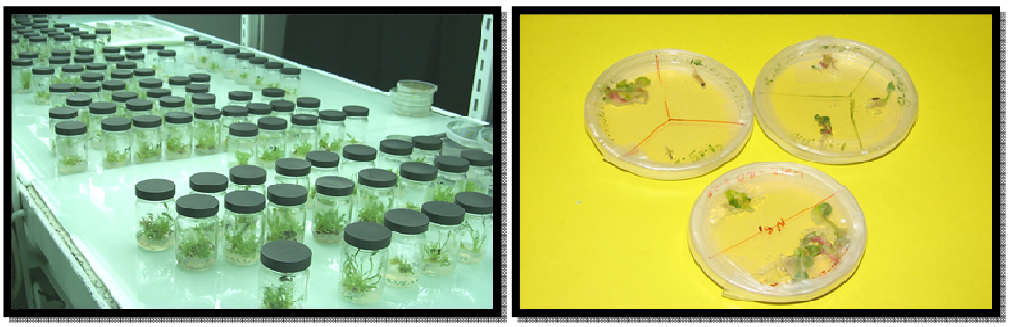
تخمک‌هایی که علائم جوانه زنی مستقیم نشان دادند به محیط رشد و تکثیر (ذکر شده در مواد وروشها) منتقل شدند (شکل ۱چپ). در تعدادی از توده ها، که پاسخ تخمکها بصورت کالزایی بود پس از بازایی از کالوس، جوانه ها به محیط رشد وتکثیر منتقل شدند (شکل ۲ راست). میزان پاسخگویی تخمکها به جوانه زنی مستقیم در توده های مورد استفاده چغندر قند از ۱/۶ تا ۴ درصد متفاوت بود. همچنین درصد بازایی در کالوسها نیزاز ۱/۱۵ تا ۲ درصد از کل تخمکهای کشت شده متغیر بود. نتایج (جدول ۱) دلالت بر تفاوت ژنتیکی توده ها در نرخ بازایی وجوانه زنی در کشت تخمک چغندر قند دارد. تأثیر عوامل مختلف بر پاسخگویی کشت تخمک در چغندر قند در شرایط این ویترو از جمله ژنوتیپ گیاه، مرحله رشد تخمک در هنگام جداسازی، نحوه رشد گیاه مادری، و ترکیب محیط کشت در تحقیقات قبلی گزارش شده است. Lux et al., (1990) گزارش نمودند میزان تولید گیاهان هاپلویید در چغندرقند بستگی به ژنوتیپ داشته از صفر تا ۱۳% متفاوت و متوسط پاسخگویی ۱% بوده است. علاوه بر نرخ بازایی نمودهای مورفولوژیکی ومیزان سرعت تکثیر نیز تابع ژنوتیپ است (Katoh et al., 1993; Gurel et al., 2000; Gurel et al., 2003; Bhat et al., 2007). درنتایج حاصل از تحقیقاتی که در سال ۲۰۰۴ ارائه شد، حداکثر میزان بازایی تخمک چغندر قند (۵,۲۱%) با میانگین (۲/۰۴ %) اعلام شد (Nagal et al., 2004). اثر ژنوتیپ نه تنها در مرحله کشت تخمک بلکه در تمام مراحل تهیه گیاه دابل هاپلویید برای بسیاری از گیاهان زراعی موثر است بطوریکه چگونگی پاسخ به تیمار کلشی سین نیز منشاء ژنتیکی دارد (Ragot et al., 1992). مرحله رشد تخمک در هنگام جداسازی و کشت نیز از عوامل مهم بوده و تخمکهای کوچک تر از ۰/۲ میلی متر معمولاً خشک و نکروزه می شوند (Bhat et al., 2007). همچنین نحوه رشد گیاه مادری تحت شرایط کنترل شده و تأمین شرایط فیزیولوژیکی مناسب برای گیاه مادری نیز در پاسخگویی تخمکها به کشت تأثیر بسزایی دارند (Shalaby, 2007; Bhat et al., 2007). از دیگر عوامل مؤثر ترکیب محیط کشت است (Zhang et al., 1997). علاوه بر عناصر معدنی و ویتامینها و تاثیر ذغال فعال در بازایی، ساکارز بعنوان منبع قند مورد استفاده قرار می گیرد و تأمین کننده انرژی است. علاوه بر این نقش پائین آوردن پتاسیل اسمزی در محیط کشت را نیز داراست و در غلظت ۶ تا ۱۲ درصد استفاده می شود (Shugar, 1998; Gurel et al., 2000; Shalaby, 2007).

جدول ۱- پاسخگویی به کشت تخمک در توده های مختلف چغندرقند

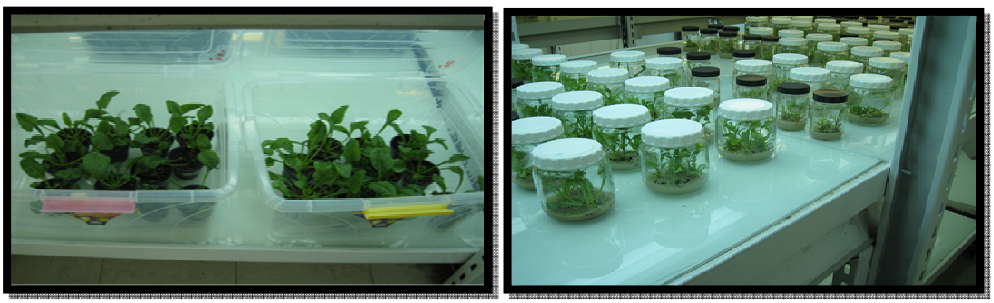
ردیف	شماره توده	وضعیت پلی ژرمی	تعداد تخمک کشت شده	میزان پاسخگویی تخمک(درصد)	میزان باززایی (درصد)
۱	۲۷۶۲۱	پلی ژرم	۲۸۷۰	۲	۲
۲	۲۷۶۲۴	پلی ژرم	۱۱۳۰	۳/۲	۱/۳
۳	۲۷۶۲۹	پلی ژرم	۱۳۶۰	۴	۱/۱۵
۴	۲۷۶۲۶	پلی ژرم	۲۲۴۶	۱/۶	۱/۳



شکل۱- تخمک های کشت شده در محیط درون شیشه (راست) وتخمک هایی با باززایی مستقیم (چپ).



شکل۲- کالوس های باززایی شده (راست) و گیاهچه های هاپلویید حاصل از کشت تخمک (چپ)



شکل ۳- گیاهچه های دابلد هاپلویید پس از تیمار کلشی سین (سمت راست)و طی دوره سازگاری (سمت چپ).

انتقال به محیط تکثیر برای دستیابی به تعداد زیاد گیاهچه هاپلوئید برای اجرای تیمار کلشی سین انجام شد (شکل۲ چپ) چرا که در این مرحله درصدی از گیاهان آسیب می بینند. قابلیت تکثیر لاین‌ها در این مرحله متفاوت بود و بعضی از لاین‌ها سیکل تکثیر آنها بیشتر بود. این بدلیل وجود تنوع ژنتیکی چغندر قند وتاثیر ژنوتیپ در تمام جنبه‌های کشت بافتی است (Gurel et al., 2003; Hansen et al., 1995). برای دو برابر کردن کروموزوم های گیاه هاپلویید چغندر قند ازتیمارهای متفاوتی مثل اوریزالین، پرونامید، تری فلورالین، آمیپروفوس-متیل استفاده شده است. Gurel et al., (2000) در مقایسه بین کلشی سین وتریفلورالین به درصد بیشتر دابل شدن در گیاهچه های چغندرقند با کلشی سین (۲۵/۳ درصد) در مقایسه باتریفلورالین (۱۸/۲ درصد) رسیدند. گزارشات متعدد نشان می دهند که کلشی سین به عنوان موثرترین ماده برای دو برابر کردن تعداد کروموزوم ها مطرح می باشد، اما کارآیی و نتیجه مطلوب مورد انتظار به غلظت مصرف، نوع بافت ویا سلول و مرحله رشد آن بستگی دارد (Gurel et al., 2003; Hansen et al., 2000; Rao et al., 1996; Levan, 1995). بررسی های انجام شده در آزمایشگاه کشت بافت چغندرقند نشان داد که اجرای تیمار کلشی سین در مراحل ریشه زایی درون شیشه و ازدیاد جوانه ها امکان پذیر می باشد. بهترین تیمار کلشی سین برای دو برابر کردن کروموزوم ها غلظت ۰/۱

درصد به مدت ۲۴ ساعت در محیط باززایی نیمه جامد گزارش گردید (Yavari, 2000; Roozbeh, 2004) (شکل ۳راست). آزمایشات سیتولوژیکی جهت تعیین پلوئیدی گیاهان حاصل از کشت تخمک، نشان داد که ۲۴/۵ درصد گیاهان هاپلویید و ۵۹ درصد گیاهان دیپلویید و ۱۶/۴ درصد گیاهان تتراپلویید بودند و میکسوپلوییدی مشاهده نشد.

Bossoutrot et al., (1985) این نسبت ها را در تهیه دابلد هاپلوییدی چغندر قند به میزان ۷۷/۷ تا ۱۰۰ درصد هاپلوییدی و صفر تا ۱۱ درصد دیپلویید و۱۴/۳ درصد میکسو پلوییدی گزارش نمودند. نتایج مشابهی توسط محققان دیگر گزارش شده است (Doctrinal et al., 1989; Lux et al.,1990). در بررسی اثرآمیپروفوس-متیل بر دابل هاپلوییدی چغندرقند محققین به محدوده ای مابین ۵۶ تا ۶۴ درصد رسیدند اما استفاده از این ماده علاوه بر اثر سمی برشکل‌گیری جنین، دارای درصد بالای تتراپلوییدی نیز بود (Hansen et al., 2000). در آخرین تحقیقاتی که توسط آنها در سال ۲۰۰۹ با تاثیر تیمار کلشی سین بر تخمک چغندر قند انجام شد میزان تهیه گیاهان دابلد هاپلویید ۵ درصد گزارش شد (Hansen et al., 2009). Sowa et al., (2010) در پژوهش جامعی بر روی کشت تخمک چغندر قند، ۳۲ درصد هاپلوییدی، ۴۵/۸ درصد دیپلوییدی و ۲۱/۵ درصد میکسو پلوییدی گزارش کردند. درصد تولید گیاه دابلد هاپلویید درگونه گیاهان دیگر نیز مشابه است. مطالعات سیتولوژیکی در کدو مبین تولید ۳۵ درصد دیپلوییدی و ۶۵ درصد هاپلوییدی (Shalaby, 2007) و در تنباکو ۳۶ درصد دیپلویید و۶۴ درصد هاپلویید گزارش شده است (Katoh et al., 1993). نتایج آزمون الایزا و تجزیه واریانس آن نشان داد که بین نمونه های مورد بررسی از نظر عکس العمل به بیماری ریزومانیا اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۲). با توجه به وجود ارقام حساس (رسول و رجینا) و مقاوم (بریجیتا) در نمونه های مورد آزمون، تجزیه واریانس به تنهایی نمی تواند برای ارزیابی مقاومت لاین های دابلد هاپلویید و مقایسه آن با میزان مقاومت ارقام شاهد مورد استفاده قرار بگیرد لذا گروه بندی دانکن بر اساس مقادیر جذب نور (Optical Density) حاصل از قرائت دستگاه پلیت خوان (ELISA Reader) انجام شد که نتایج آن در جدول ۳ و شکل ۴ آورده شده است.

آزمون دانکن، شاهد مقاوم بریجیتا و گیاهان دابل هاپلویید تولیدی از توده های شماره ۲۷۶۲۶، ۲۷۶۲۱ و ۲۷۶۲۴ در یک گروه و شاهد حساس رسول و رجینا را در گروه دیگر دسته بندی نمود (جدول ۳).

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس صفت میانگین جذب نور (شاخص مقاومت به بیماری) لاین های دابل هاپلویید و ارقام شاهد

منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	F-value
تیمار	۵	۱/۳۱۷۴۲	۲۹/۴۲**
خطا	۱۵۱	۰/۰۴۴۷	

** معنی دار در سطح احتمال ۱٪

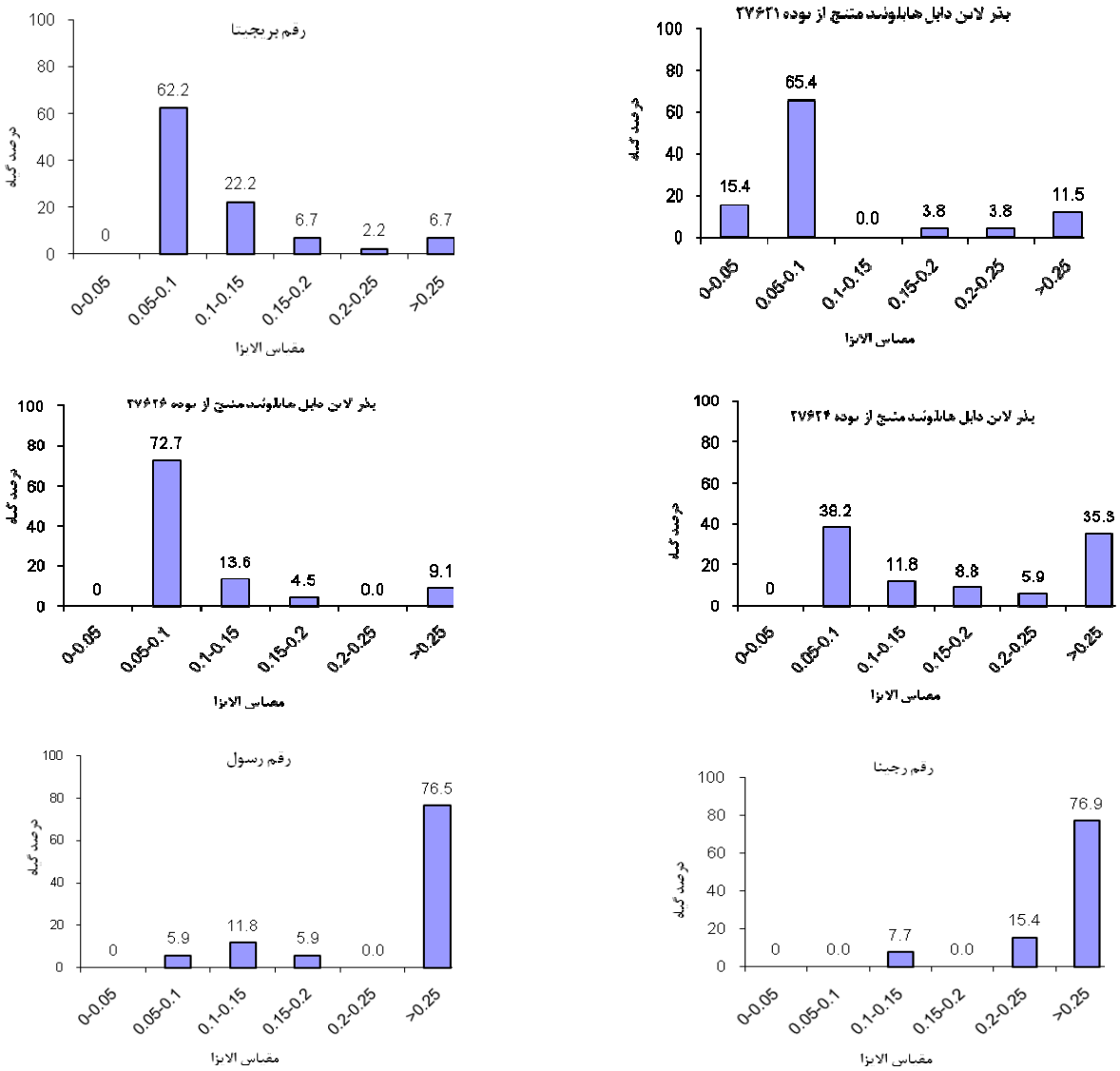
جدول ۳- داده های مربوط به آزمون الایزا ونتایج مقایسه میانگین دانکن برای گیاهان دابل هاپلویید وگیاهان شاهد

ژنوتیپ	تعداد تکرار	درصد آلودگی بر مبنای $2\bar{x}$		میانگین جذب نور*
رقم رجینا (شاهد حساس)	۱۳	۹۲/۳۱	a	۰/۵۷۵
رقم رسول (شاهد حساس)	۱۷	۸۲/۳۵	a	۰/۷۰۶
رقم برجیتا (شاهد مقاوم)	۴۵	۱۷/۷۸	b	۰/ ۱۱۷
گیاهان دابل هاپلوئید منتج از توده ۲۷۶۲۶	۲۲	۲۲/۷۳	b	۰/۱۲۵
گیاهان دابل هاپلوئید منتج از توده ۲۷۶۲۱	۲۶	۱۹/۲۳	b	۰/۱۱۴
گیاهان دابل هاپلوئید منتج از توده ۲۷۶۲۴	۳۴	۵۵/۸۸	b	۰/۲۰۳

*:اختلاف بین میانگین های دارای حروف مشترک معنی دار نیست.

معیار دو برابر میانگین جذب نور گیاهان شاهد سالم ($2\bar{x}$) که در این تحقیق جهت مقایسه درصد آلودگی مورد استفاده قرار گرفت قبلاً نیز توسط محققین دیگری به عنوان آستانه آلودگی گزارش شده بود (Sutula et al., 1986 و Amiri et al., 2003). بر این اساس لاین دابل هاپلوئید منتج از توده شماره ۲۷۶۲۱ در میان لاین های دیگر کمترین درصد آلودگی را از خود نشان داد. ارقام رجینا و رسول نیز به عنوان شاهد

حساس بیشترین درصد آلودگی را به ترتیب با ۹۲/۳۱ و ۸۲/۳۵ درصد داشتند (جدول ۳). گاهی در ارقام حساس به بیماری ریزومانیا بوته هایی با عکس العمل مقاومت مشاهده می گردد که به دلیل فرار از بیماری رخ می دهد. فرار از بیماری در آزمایشهای زیست سنجی (Bioassay) از معایب و محدودیتهای این روش است که در تحقیق حاضر سعی گردید با استفاده از تکرار زیاد و آلودگی بالای خاک، احتمال فرار از بیماری کاهش یابد. Pedersen et al., (1996) لاین های دابل هاپلوئید متحمل به ریزومانیا رادر آزمایشهای مزرعه ای در خاک آلوده به ریزومانیا مورد بررسی قرار دادند . جمعیت های دابل هاپلوئید که خود گرده افشانی کرده بودند، به طور واضحی به لاینهای حساس تا متحمل تفرق پیدا کردند که از بین آنها تعدادی لاین دابل هاپلوئید انتخاب و در برنامه های اصلاحی جهت معرفی ارقام متحمل مورد استفاده قرار گرفت. از آنجائیکه مقاومت به ریزومانیا در چغندرقند تک ژنی و به صورت غالب به ارث می رسد (Amiri et al., 2003)، لذا درصد بوته های سالم نشان دهنده درصد بوته های حامل ژن مقاومت می باشد. با توجه به شکل ۴ بیشترین درصد تک بوته با مقیاس الایزای کوچکتر از ۰/۱ در لاین دابل هاپلوئید ۲۷۶۲۱ (۸۰/۸ درصد)، در مقایسه با شاهد مقاوم (۶۲/۲ درصد) و لاین های دیگر مشاهده گردید.



شکل ۴- توزیع مقادیر الایزا در تک بوته های لاین های دابل هاپلوئید و ارقام مورد بررسی در واکنش به بیماری ریزومانیا

این مساله موید این مطلب است که لاین دابل هاپلوئید ۲۷۶۲۱ از میزان مقاومت بالائی برخوردار است..نتایج این تحقیق نشان داد که توده های شماره ۲۷۶۲۶، ۲۷۶۲۱ و ۲۷۶۲۴ چغندرقند منابع والدی مناسبی برای برنامه های اصلاحی ایجاد ارقام مقاوم به ریزومانیا هستند و از طرف دیگر لاین های دابل هاپلوییید، منشاء گرفته از ین توده ها از نظر مقاومت به بیماری ریزومانیا با لاین شاهد مقاوم خارجی در یک گروه قرار گرفتند و به عنوان ژنوتیپ مقاوم حاصل از تکنیک دابل هاپلوییدی معرفی می شوند.

REFERENCES

1. Amiri, R. Moghaddam, M. Mesbah, M., Sadeghian, S.Y., Ghannadha, M.R. & Izadpanah, K. (2003). The inheritance of resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in *B. vulgaris* subsp. *maritima*, accession WB42: statistical comparisons with Holly-1-4. *Euphytica*, 132, 363-373.
2. Arjomand, M.N (1986). *Introduction to different methods of cytology and chromosome study in sugar beet* .Final report of research project, Sugar beet seed institute. (In Farsi).
3. Bhat. J.G & Murthy, H.N. (2007). Factors affecting in-vitro Gynogenic haploid production in niger (*Guizatia abyssinica* (L.F) Cass). *Plant Growth Regulation*, 52, (3), 241-248.
4. Clark, M.F. & Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol*, 34, 475-483.
5. d'Halluin, K. & Keimer, B. (1989). Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris*) by ovule culture, in: Horn, W., Jensen. J.C., Odenbach.W. & Schieder,O. (Eds.) *Genetic Manipulation in Plant Breeding Walter deGruther Berlin*, pp: 307-309.
6. Doctrinal, M., Sangwan R.S., & Sangwan-Norreel B.S. (1989). In vitro gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effect of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Tiss, Org. Cult*, 17,1-12.
7. Doctrinal, M., R.S. Sangwan, Sangwan-Norreel, B.S. (1990). Sugar beet (*Beta vulgaris* L) in vitro induction of aploids, In Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 12, 346-357.
8. Goska, M. (1985). Sugar beet haploids obtained in vitro culture. Bull .Polish Acad .*Sci Biological Sciences*, 33, 31-33.
9. Grassi, G., Fantini, R. & Biancardi, E. (1988). Prospective method of selecting sugar beet for resistance to rhizomania virus (BNYVV), *Zuckerindustrie*, 113, 594–596.
10. Gürel, E. & Gürel, S. (1998). Plant regeneration from unfertilized ovaries of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured in vitro. Tr.J. Botany, 22, 233-238.
11. Gürel, S., Gürel, E. & Kaya, Z. (2000). Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (Beta *vulgaris* L.), Plant Cell Repotrs, 19(12),1155-1159.
12. Gürel, S., Gürel, E. & Kaya, Z. (2002).Establishment of cell suspension cultures and plant regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.).Truk J.Bot, 26,197-205.
13. Gürel, S., Gürel, E., Kaya, Z., & Erdal, M. (2003). Effects of antimitotic agents on haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 17/2003/2.
14. Hansen, A. L., Gertz, M., Joersboand, S. & Andersen, B. (1995). Shoot duration colchicine treatment for in vitro chromosome doubling during ovule culture of *Beta vulgaris* L. *Plant Breeding*, 114, 515-519.
15. Hansen, A.L., Gertz, M., Joersboand, S. & Andersen, B. (2000). Chromosome doubling in vitro with Amiprophose-Methyl in *Beta vulgaris* ovule culture, Acta Agriculture Scandinavica, Section B,-*Plant Soil Science*, 50(2), 89-95.
16. Hansen. A.L., Plever, C., Pedersen, H. C., Keimer, B. & Andersen, S.B. (2009). Efficient invitro chromosome doubling during *Beta vulgaris* ovule culture, *Plant Breeding*, 112(2), 89-95.
17. Hoagland, D.R. Arnon, H.I. (1950) .The water-culture method for growing plants without soil. California Experimental Agriculture Station Circular, 347. Berkeley, 32p.
18. Hosemans, D. & Bossoutrot, D. (1983). Induction of haploid plants from invitro culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.), *Z Pflanzenzucht*, 91, 74-77.
19. Katoh, N. & Sumio, Iwai. (1993). Induction of haploid plants from unpollinated ovules in Nicotina rustica, *Plant Tissue Culture Letters*, 10(2), 123-129.
20. Levan, A. (1995). A haploid sugar beet after colchicine treatment, Hereditas, 31, 399-410.
21. Lux, H., Herrmann, L. & Wetzel, C. (1990). Production of Haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by cultruring unpollinated ovules. *Plant Breeding*, 104, 177-183.
22. McGrann, G.R.D. Grimmer, M.K, Mutasa-Gottgens E.S. Stevens. (2009). Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. Mol. *Plant Pathol*, 10,129-141.

23. Mehrvar, M. Valizadeh, J. Koening, R. Bragard, C. G. (2009). Iranianbeet necrotic yellow vein virus(BNYVV): pronounced diversity of the p25 coding region in A-type BNYVV and identification of p-typeBNYVV lacking a fifth RNA species . *Arch.Virol*, 154, 501-506.
24. Mesbah. M. (2005). Transfering of resistance gene(s) to rhizomania from resistant sources of Holly and WB42 to sugar beet monogerm cultivars. final report of research project. Sugar beet seed institute. (In Farsi)
25. Nagl, N., Mezei, S., Kovacev, L. & Cacic, N. (2004). Induction and micropropagation potential of sugar beet haploids, Genetika, 36(3), 187-194.
26. Paul, H., Henken, B. & Alderlieste, M.F.J. (1992). A greenhouse test for screening sugar-beet (*Beta vulgaris*) for resistance to beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), *Neth. J. Pl., Path*, 98, 65-75.
27. Pedersen, H.C. & B. Keimer. (1996). Haploidy in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) In Mohan Jain, S.., Sopory, S.K., and Veilleus, R.E. (Ed.) *In vitro Haploid production in Higher Plants*, l3, 17-36).
28. Pierik, R.L.M. (1989). In vitro culture of higher plants, 243-256.
29. Rao,P.S. & Suprasanna P. (1996). Methods to double haploid chromosome numbers. In: Jain, S.M., Sopory, S.K. & Veilleus, R.E. (Ed.) In vitro haploid Production in Higher Plants. 1, 317-339). Kluwer Academic Publishers,The Netherlands.
30. Rogot, M. & Steen, P. (1992). Genetic and environmental effects on chromosome doubling of sugar beet (*Beta vugaris* L.) *haploids*, *Euphytica*, 63,233-237.
31. Rouzbeh. F. (2004). Production of DH sugar beet lines resistant to curly top.final report of research project. Sugar beet seed institute. (In Farsi).
32. Schimer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A. Bragard. C. Gilmer, D. & Lemaire, O. (2005). Phylogenetic analysis of isolites of BEET necrotic yellow vein virus collected world wide.J. Gen. Virol, 86, 2897-2911.
33. Scholten, O. E., & Lange, W. (2000). Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review, Euphytica, 112,219-231.
34. Shalaby, T.A. (2007). Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.), *Scientia Horticulturae*, 115(1), 1-6.
35. Sharma, A. K. & Sharma, A. (1965). Chromosome Techniques (Theory and Practice) London: Butterworth & Co.
36. Shugar, B. (1998). Application of double-haploid system. Barley newsletter, Hyland seeds, W.G. Thompson Sons Limited Nairn, Ontario, Canada. Available Online: http://wheat. pw. usda. gov/ggpages/Barley Newsletter/42/oral04. html.
37. Sowa, M. (2010). Cytometric analyses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants from unfertilized ovules cultured in vitro, EJPAU 13(4), 09. Available Online: http://www.ejpau.media.pl/volume13/issue4/art-09.html
38. Zhang, J., Li ,T. & Deng, X. (1997). Highly efficient induction of sugar beet plant regeneration. *Chin J Biotehnol*, 13(3),185-91.
39. Taleghani, D.F,. Sadeghzadeh, S. & M. Mesbah. (2011). Sterategic Framwork for Sugar beet Research .Sugar beet Seed Institute. (In Farsi).
40. Todeh Falah. M; M. Naser Arjmand. & B. Mahmoodi. (2000). Investigation on distribution and infection of sugar beet growing areas in Iran by Rhizomania. Proceeding of the 14th Iranian Plant Protection congress. 2, 72.(In Farsi).
41. Yavari. N. (1996). Production of haploid sugar beet plants via ovule culture. final report of research project. Sugar beet seed institute. (In Farsi).
42. Yavari. N. (2000). Study of sugar beet haplodiploidization in Iran. Proceeding of the first national congress on biotechnology, 2, 58-63.