بررسی روش مناسب تولید و کشت پروتوپلاست برای باززایی گیاه کامل چغندرقند

Investigation on suitable sugar beet protoplast source and culture conditions to obtain regeneration

بهروز احسانی مقدم و نسرین یاوری

چکیده

مهمترین جنبه های کاربردی کشت پروتوپلاست در چغندرقند شامل انتقال ژنهای جدید و تولید هیبریدهای غیر جنسی می باشد.بررسی قابلیت باززایی از کشت پروتوپلاست هدف تحقیق حاضر را در بر می گیرد. گیاهچه های کشت شده در شرایط استریل از گیاهان مادری رقم ۹۵۹۷ تهیه شدند. دو روش تولید پروتوپلاست بکار گرفته شد : ۱) جداسازی پروتوپلاست از بافت مزوفیل برگ ۲) جداسازی از کشت سوسپانسیون سلولی. پس از خالص سازی پروتوپلاست ها، کشت آنها در اولین محیط غذایی ($K8_p$) انجام پذیرفت. میکرو کالوس های حاصل به محیط های غذایی مختلف شامل PG_{OB} ، MS و محیط N6 حاوی هورمون های مختلف انتقال داده شدند. انتقال کالوس ها جهت جوانه زایی به محیط PG_{oB} و N6 انجام و مشخص گردید که تنها پروتوپلاستهایی که از طریق کشت سوسپانسیون سلولی تولید شده و میکروکالوس های حاصل از آنها به محیط N6 حاوی یک میلی گرم در لیتر ژیبرلیک اسید(GA_3) بنزیل آمینوپورین (BAP) منتقل شده بودند، توانایی تولید کالوس های باززا رااز خود نشان دادند.

۱- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات چغندرقند

۲- کارشناس موسسه تحقیقات چغندرقند

مقدمه

خانواده کنوپود یا سه (*Chenopodiacea*) متشکل از جنس های متعددی است که در بین آنها جنس بتا (*Beta*) با داشتن ۱۳ گونه از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. در بین گونه های مختلف جنس بتا، بتا ولگاریس (*Beta vulgaris L.*) شامل چغندرقند، چغندر علوفه ای، چغندر باغی، چغندر برگی و لبویی می باشد.

گستره جغرافیایی گونه های وحشی جنس بتا بسیار متنوع و مهمترین ناحیه جغرافیایی، شرق مدیترانه می باشد. با این حال پراکندگی آن از هندوستان و جزایر قناری تا انگلستان و کشورهای اسکاندیناوی امتداد دارد. همچنین انواع مختلف چغندر زراعی در سراسر اروپا، امریکای شمالی، آسیا و آفریقای شمالی کشت می گردد.

از زمان شناسایی گیاه چغندر تا کنون برنامه های متنوع به نژادی جهت بهبود صفات زراعی آن با بهره گیری از روش های کلاسیک و شناخته شده اصلاح نباتات صورت پذیرفته است که از آن جمله می توان به بهره گیری از صفت نر عقیمی سیتوپلاسمی و نیز تولید گیاهان تریپلوئید اشاره نمود. مهمترین کاربردهای کشت و ادغام پروتوپلاست در به نژادی گیاهان شامل موارد زیر می باشد : انتقال ژن به گیاهانی که تنها از طریق غیر جنسی ازدیاد می شوند و یا بیولوژی تولید مثل در آنها مانع تلاقی های مطلوب می گردد، یا تولید گیاهان پلی پلوئید با ترکیب ژنومی متفاوت و یا انتقال ژنهای سیتوپلاسمی از گیاهی به گیاهان دیگر که فاقد ژنهای مطلوب هستند.

روشهای نوین به نژادی عمدتاً مبتنی بر روش های بیوتکنولوژی می باشند. تولید گیاهان مقاوم به علف کش از طریق انتقال ژن مربوطه به چغندرقند از نمونه های بارز آن به شمار می رود (D'Halluin et al., 1992). از سوی دیگر پیشرفت های به عمل آمده در زمینه بیولوژی سلولی امکان کشت سلول های منفرد گیاهی بخصوص پروتوپلاست های گیاهی را فراهم ساخته که می تواند باعث دسترسی به کلون هایی با ساختار جدید ژنتیکی گردد.

انتقال ژن به پروتوپلاست چغندرقند به روش الکتروپوریشن (Electroporation) در سال ۱۹۸۹ توسط لیندسی و جونز (Lindsey, K. and M.G.K. Jones, 1989) و در سال ۱۹۹۰ توسط یورسبو وبرونشتد (Joersbo, M. and J. Brundsted, 1990) و به روش استفاده از امواج مافوق صوت (Sonication) توسط محققین اخیر به اجرا در آمد. شرط موفقیت در انتقال ژن به پروتوپلاست ادامه رشد سلولهای تراریخت و باززایی آنهاست. بات و همکاران (Bhat,. et al., 1990) با استفاده از لایه تغذیه کننده حاوی سلولهای کشت سوسپانسیون چغندر لبویی برای تغذیه سلولهای حاصل از پروتوپلاست مزوفیل برگ چغندرقند، به تولید کلنی های سلولی دست یافتند.

ادغام پروتوپلاست به عنوان ابزاری برای انتقال یک مرحله ای نر عقیمی سیتوپلاسمی به ارقام بارور و صرفه جویی در چرخه های متعدد تلاقی های برگشتی در برنامه به نژادی گیاهانی از جمله برنج، کلم، کلزا وچغندرقند با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است. (Pelltier, 1993)

مشکلات موجود بر سر راه بهره گیری از پروتوپلاست (چغندرقند) عبارتند از : موفقیت در جداسازی انبوه پروتوپلاست های سالم و زنده، خالص سازی، کشت با سودمندی بالا، باززایی و تولید گیاهچه و نهایتاً موفقیت در گزینش کلون های تراریخت. پیش از این بررسیهایی برای کشت پروتوپلاست چغندرقند با موفقیت اجرا شده است که از آن جمله می توان به جداسازی، خالص سازی و تولید میکروکالوس از کشت آنها اشاره نمود (احسانی مقدم و همکاران، ۱۹۹۶). با توجه به این که پروتوپلاستها و یا بافتهای گیاهی از نظر ژنی دارای توانایی بالقوه برای تولید یک گیاه کامل می باشند، امکان باززایی را باید در فراهم شدن زمینه بیان ژنهای مؤثر در این امر دانست که خود ناشی از یک وضعیت فیزیولوژیک خاص و متاثر از شرایط نگهداری و رشد سلولها می باشد. در این تحقیق دو روش تولید پروتوپلاست به منظور ایجاد شرایط مساعد برای باززایی مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روشها

به طور کلی از دو روش جداسازی پروتوپلاست استفاده گردید : ۱- جداسازی از بافت مزوفیل برگ ۲- جداسازی از سوسپانسیون سلولی.

مواد گیاهی

از گیاهان رگه ۹۵۹۷، منوژرم و دیپلوئید، کشت شده در شرایط استریل *(in vitro)* استفاده شد. بذور ابتدا با آب ولرم شستشو داده شد و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۸۰٪ و سپس در هیپوکلریت ۵٪ به مدت ۲۵ دقیقه ضد عفونی و پس از آبکشی با آب مقطر استریل در محیط نصف غلظت PG_{oB} (de Greef and Jacobs, 1979) جامد کشت گردیدند. حدود شش هفته پس از کشت بذور، برگهای گیاهچه ها جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. از طرف دیگر بذور استریل در محیط مذکور و حاوی سه میلی گرم در لیتر TIBA (2, 3, 5 –Triiodobenzoic Acid) کشت گردیدند. برگ های گیاهانی که بدین طریق بدست آمده بودند در یک چرخه تولید سوسپانسیون سلولی شرکت داده شدند.

تولید سوسپانسیون سلولی

برگ های بدست آمده از گیاهانی که در محیط کشت آنها ضد اکسین TIBA بکار رفته بود، به قطعات حدوداً پنج میلی متر بریده و بر روی محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) حاوی یک میلی گرم در لیتر BAP (6- benzylaminopurine) ، ۳٪ ساکارز و ۷/۵ گرم در لیتر آگار، در شرایط تاریکی کشت داده شدند. حدود دو ماه پس از کشت، کالوس های با رنگ روشن برای تولید سوسپانسیون سلولی استفاده شدند. بدین منظور حدود سه گرم از کالوس های بدست آمده از بافت گیاهی جدا گردید و در مقدار ۳۰ میلی لیتر از محیط MS فاقد هورمون و حاوی ۵۰ میلی مول پرولین (L-proline) در درون ظرف ارلن ۱۲۵ میلی لیتری قرار داده شدند. ظروف ارلن به مدت دو هفته بوسیله شیکر در شرایط تاریکی

با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. TIBA و پرولین قبل از اضافه نمودن به محیط های کشت توسط فیلتر ۰/۲ میکرون استریل گردیدند.

جداسازی و خالص سازی پروتوپلاست

جهت سهولت در جدا سازی پروتو پلاست ها و کاهش (turgor) تورم آنها، قبل از تاثیر تیمار آنزیم، بافت برگ به روش فریرسون و همکاران (Frearson, E.M, 1973) به مدت دو ساعت در محلول حاوی نمک های CPW (Cell Protoplast Washing) (۰/۸ = اسدیته)، مانیتول ۹٪ ، کلرورکلسیم + nPG (n- propylgallate) ۰/۱ میلی مول در تاریکی و دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از پیش پلاسمولیز برگ ها، محلول اولیه خارج و بافت گیاهی با اسکالپل به قطعات دو و یک میلی متری تقسیم گردید،سپس به مدت پنج ساعت در محلول آنزیمی زیر قرار داده شد :

سلولاز(OnozukaRS) ۰/۵٪ + مسروزایم (R10) ۰/۵٪ + دری سلاز ۰/۵٪ + مانیتول ۹ ٪ + CPW+ nPG ۰/۱ میلی مول.

از سوی دیگر به منظور جداسازی پروتوپلاست از سوسپانسیون سلولی، در پایان دومین هفته ازکشت سلولی ترکیب آنزیمی زیر به مدت ۱۲ ساعت به ظروف حاوی کشت اضافه گردید:

سلولاز ۱٪ + مسروزایم ۱ ٪ + دری‌سلاز ۰/۲ + مانیتول ۹٪ + nPG ۰/۱ میلی مول.

قبل از بکارگیری محلول‌های آنزیمی رسوب زدایی به کمک سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام گردید .خالص‌سازی پروتوپلاست‌ها در هر دو مورد مطابق روش زیر صورت گرفت:

۱- ته‌نشین‌سازی در محلول آنزیمی به کمک سانتریفوژ با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه.

۲- انتقال رسوب پروتوپلاست‌ها به لوله آزمایش حاوی محلول CPW9M+nPG و سانتریفوژ با سرعت ۷۰۰ دور دقیقه به مدت پنج دقیقه . این مرحله حداقل دو بار صورت‌گرفت.

۳- انتقال رسوب پروتوپلاست‌ها روی محلول حاوی CPW21 S +nPG و اضافه نمودن یک میلی مول محلول W5 برروی پروتوپلاست‌ها. سانتریفوژ به مدت پنج دقیقه و جداسازی پروتوپلاست‌های خالص از نوار مابین محلول شناور سازی (W5) و CPW21 S انجام گرفت (Hall et al., 1994).

کشت پروتوپلاست

شمارش پروتوپلاست‌ها بوسیله لام هموسایتومتر (Neubar) انجام و پس از رقیق‌سازی، باتراکم $۱۰^{۰}$ × ۱/۵ عدد در هر میلی لیتر، در محیط کشت $K8_p$ (Michayluk)) تغییر یافته در تاریکی مطلق و دمای حدود C ° ۲۵ کشت گردیدند . محیط کشت فوق فاقد کازئین هیدرولیزات بود .همچنین مقدار دو میلی گرم در لیتر هورمون 2,4-D (2/4 – dichlorophenoxyacetic acid) و یک میلی گرم در لیتر هورمونNAA (Naphthalene acetic acid)، ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۱میلی مول ماده nPG به عنوان تحریک کننده‌های رشد به محیط غذایی اضافه گردیدند(کرنزو همکاران، ۱۹۹۰). هر دو هفته، مقدار ۱ میلی لیتر محیط کشت تازه$K8_p$ به پروتوپلاست‌ها اضافه گردید.

پس از گذشت حدود ۵ فاصله هفته که میکروکالوس‌ها نمایان گشتند مقدار یک میلی لیتر از کلنی های سلولی به‌محیطهای زیر انتقال داده شدند:

a) محیط کشت PG_0 حاوی ۰/۸٪ آگارز، ۳٪ ساکارز و ۱ میکروگرم هورمونBAP

b) محیط کشت PG_0 حاوی ۳/۵ گرم در لیتر فیتاژل، ۳٪ ساکارز و یک میکروگرم هورمونBAP

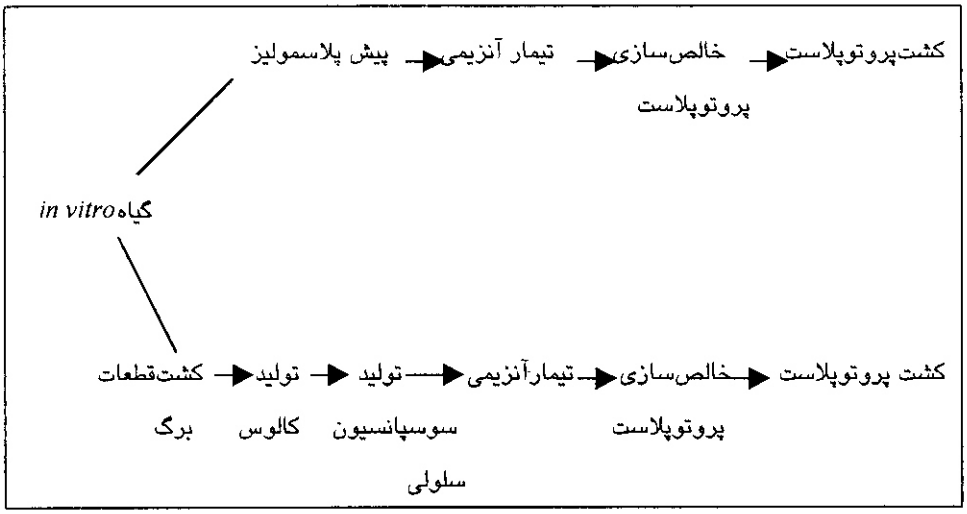
c) محیط کشت MS حاوی ۳/۵ گرم در لیتر فیتاژل، ۳٪ ساکارز، یک میلی گرم در لیتر هورمونBAP ۰/۵ میلی گرم در لیتر TIBA و ۵۰ میلی مول پرولین

d) محیط کشت N6 (Chu et al.) حاوی ٦٪ ساکارز ، ۰/۸٪ آکار، ۰/۲ میلی گرم در لیتر هورمون BAP ۰/۵ میلی گرم در لیتر هورمون NAA .

پس از گذشت یک ماه کالوس‌های بدست آمده به محیطهای جوانه‌زایی منتقل‌شدند. ۱- محیط (c) که قبلا توضیح داده شد ۲- محیط (e) شامل محیط

PG_{oB}همراه۰/۲ میلی گرم در لیترBAP، ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA و ۰/۱ میلی گرم در لیترIBA(Indole butyric acid) .

کلنی‌های سلولی تولید شده که بیانگر وجود قدرت باززایی بودند به محیطN6 حاوی یک میلی گرم در لیتر BAP، یک میلی گرم در لیتر ژیبرلیک اسید و ۳٪ ساکارز جهت القاء بهتر جوانه‌زایی انتقال داده شدند .شکل ۱، روش کلی جداسازی و کشت پروتوپلاست را به طور خلاصه نشان می‌دهد:

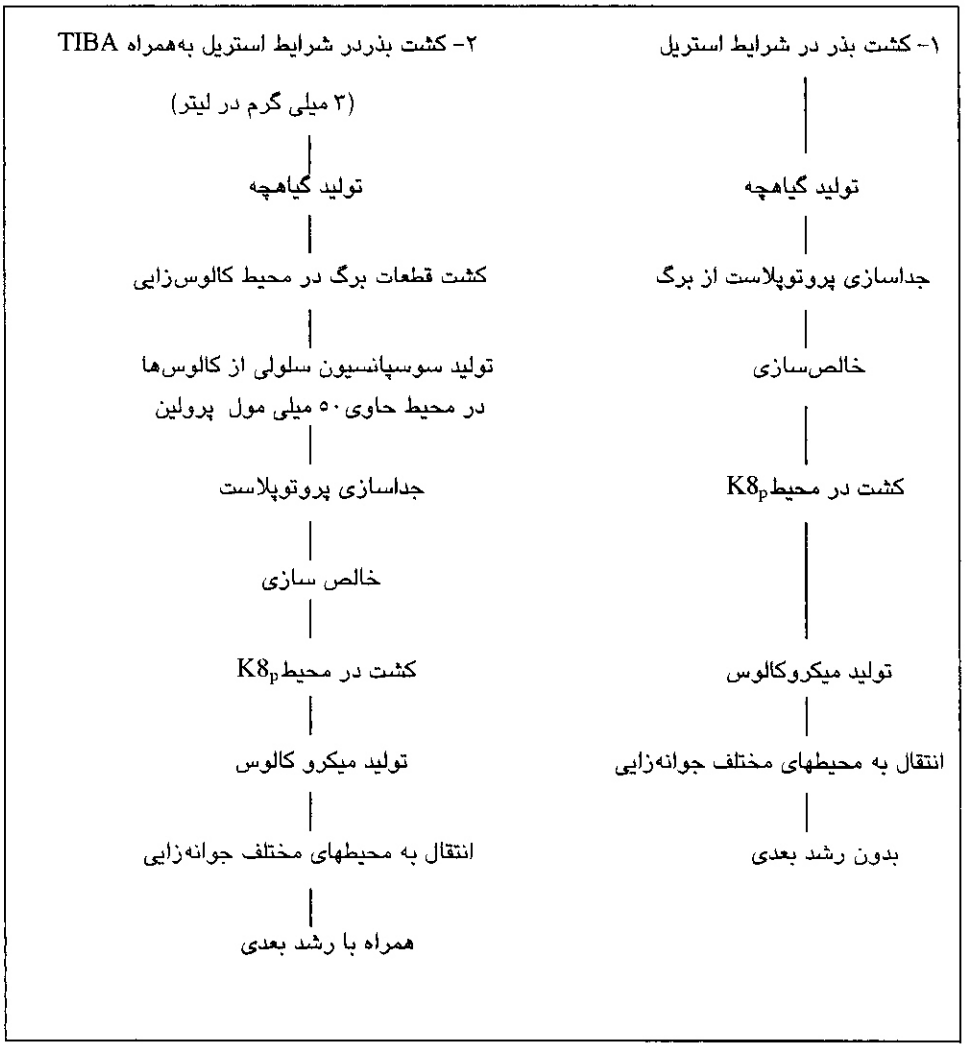


شکل ۱- چگونگی تهیه مواد گیاهی و کشت پروتوپلاستها به دو روش عمده

Fig 1. Protoplost source preparation and culture methods

نتایج و بحث

مقایسه مسیرهای دست‌یابی به پروتوپلاست خالص ، کشت آنها و نتایج حاصل درشکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- مقایسه نتایج دو بافت مختلف گیاهی برای کشت پروتوپلاست چغندرقند

Fig 2. Compared results of too different plant tissue as protoplast sources

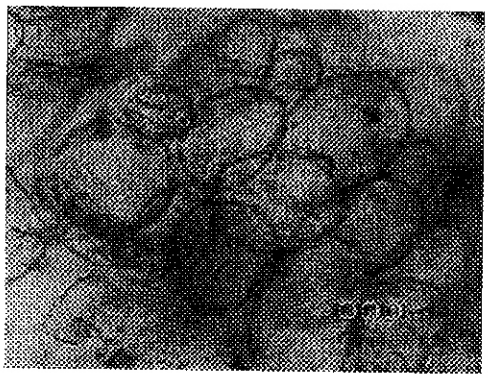
روش اول جداسازی پروتوپلاست (شکل ۱)، پیش از این توسط محققین زیادی مطرح گردیده است (هال و همکاران ۱۹۹٤). در برخی از موارد، محققینی که از این روش (استفاده از پروتوپلاست بافت‌مزوفیل برگ) استفاده نموده‌اند، به باززایی و تولید

گیاه کامل نیز دست یافتند (کرنزو همکاران، ۱۹۹۰). با اینحال بررسی‌ها نشان می‌دهد که درتحقیقاتی که پس از این تاریخ توسط سایر محققین صورت پذیرفته و از بافت مزوفیل استفاده شده است، نتایجی که دال بر موفقیت در تولید گیاه کامل و حتی جوانه‌زایی باشد گزارش نشده است(Hall, R.D. et al, 1993).. همچنین در آزمایش‌هایی که پیش از این در آزمایشگاه کشت بافت‌مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند انجام پذیرفت نیز نتایجی که حاکی ازتولید کالوس بارزایی از کشت پروتوپلاست حاصل از بافت مزوفیل برگ بوده باشد نشان داده نشد (Ehsani Moghaddam, B. et al. 1996).در بررسی فوق پس از کشت پروتوپلاست مزوفیل برگ در محیطهای غذایی، تنها میکرو کالوس‌های بسیار کوچک پدیدار گشتند. در آزمایش حاضر، چنانچه از شکل ۲ استنباط می‌گردد، باوجود بهره‌گیری از محیط کشت‌های مختلف که غالب آنها نیز محیطهای بسیار غنی و حاوی‌هورمون‌های رشد مؤثر بودند، هر گونه رشد بعدی میکرو کالوس‌های حاصل از پروتوپلاست بافت‌مزوفیل برگ با شکست روبرو شد . در حالی که یکی از محیطهای کشت بر اساس فرمول‌پیشنهادی توسط کرنز و همکاران (۱۹۹۰) تهیه شده بود. همانطور که ذکر شد، این گروه از محققین موفق‌به دست‌یابی به گیاه کامل پس از اقدام به اجرای امتزاج پروتوپلاستی، گردیدند.

شاید بتوان یکی از مهمترین علل دسترسی یا عدم دسترسی به باززایی گیاه از کشت پروتوپلاست مزوفیل را درمجموعه اطلاعات ژنتیکی سلول جستجو نمود .بطور کلی شواهد زیادی مبنی بر تأثیرژنتیک گیاه بر جوابگویی به ریزازدیادی گیاهی موجود است .به عنوان مثال تحقیقات گسترده‌ای توسط ساندرز (Saunders) که در زمینه نقش فاکتور ژنتیکی در تکثیر گیاه چغندرقند در شرایط *in* vitro اجرا گردیده به معرفی لاین‌های سلولی REL-1 و REL-2 منجر شد (Saunders, J.W. 1998) . لاینهای مذکور از نظر پاسخ گویی به روشهای تحقیقات بیوتکنولوژی همچون تکثیر از طریق‌سلول‌های سوماتیکی، انتقال ژن و دست ورزی ژنتیکی دارای وضعیت مطلوب و از قدرت باززایی‌بالایی برخوردار می‌باشند.

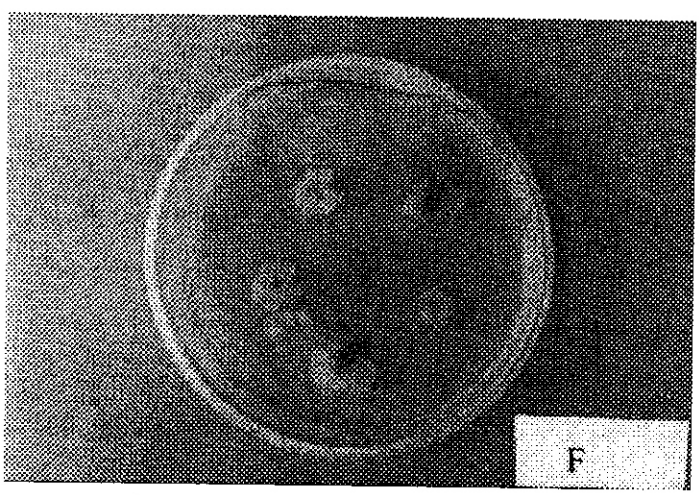
از سوی دیگر تأثیر نوع بافت گیاهی در دست‌یابی به نتیجه دلخواه بسیار زیاد می‌باشد. شواهد موجود نشان می دهد که پروتوپلاست‌های حاصل از کشت سوسپانسیون سلولی عموما از پتانسیل رشد بالایی در محیط کشت برخوردار می‌باشند. به طوریکه می‌توان تعداد زیادی پروتوپلاست‌جداسازی نمود و در نهایت از سودمندی کشت بسیار بالایی نیز برخوردار بود (لیندسی و جونز ۱۹۸۹) . با این وجود دشواری در استقرار، پایداری ژنتیکی و ظرفیت باززایی، کاربرد آن را محدود ساخته است (ساندرز و همکاران، ۱۹۹۰). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می گردد ودر آزمایش‌هایی که نتایج‌آن هم اکنون پیش‌رو می‌باشد، تنها کشت پروتوپلاست‌هایی که از سوسپانسیون سلولی جداسازی شده‌بودند، علائم جوانه زایی (Premordia) و باززایی را نشان دادند (شکلهای ۳،٤و٥).

بافت کالوسی‌که برای این منظور مورد بهره‌گیری قرار گرفت حاصل تحقیقاتی بودکه پیشتر به منظور ارائه یک روش مؤثر جهت تولید هر چه بیشتر جنین‌های سوماتیکی اجرا گردیده بود (احسانی مقدم و همکاران، ۲۰۰۰). پس از یافتن بهترین ترکیب محیط کشت و مناسب‌ترین روش تولیدجنین سوماتیک در رقم ۹۵۹۷ چغندرقند، بافت کالوسی که از طریق کشت ریز نمونه های برگ طی یک‌روند نسبتا طولانی بدست آمده بود جهت جداسازی پروتوپلاست در محیط سوسپانسیون سلولی مورداستفاده قرارگرفت.



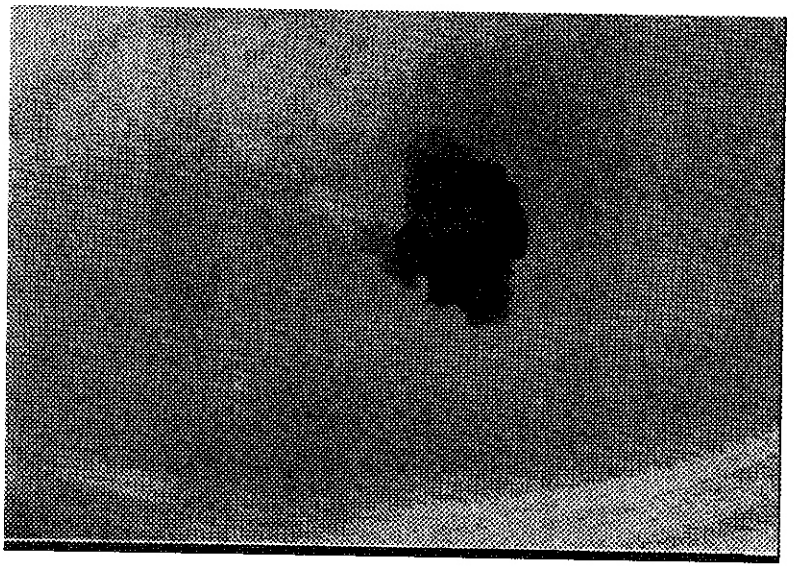
شکل ۳- کلنی سلولی حاصل از کشت پروتوپلاست (بدست آمده از سوسپانسیون سلولی) یک هفته‌پس از کشت

Fig. 3. Cell colony formation one week after protoplast culture obained from suspension cell culture



شکل ٤- کالوس‌های حاصل از کشت پروتوپلاست تولید شده از سوسپانسیون سلولی

Fig. 4. Calli obtained in protoplast culture from cell suspension source



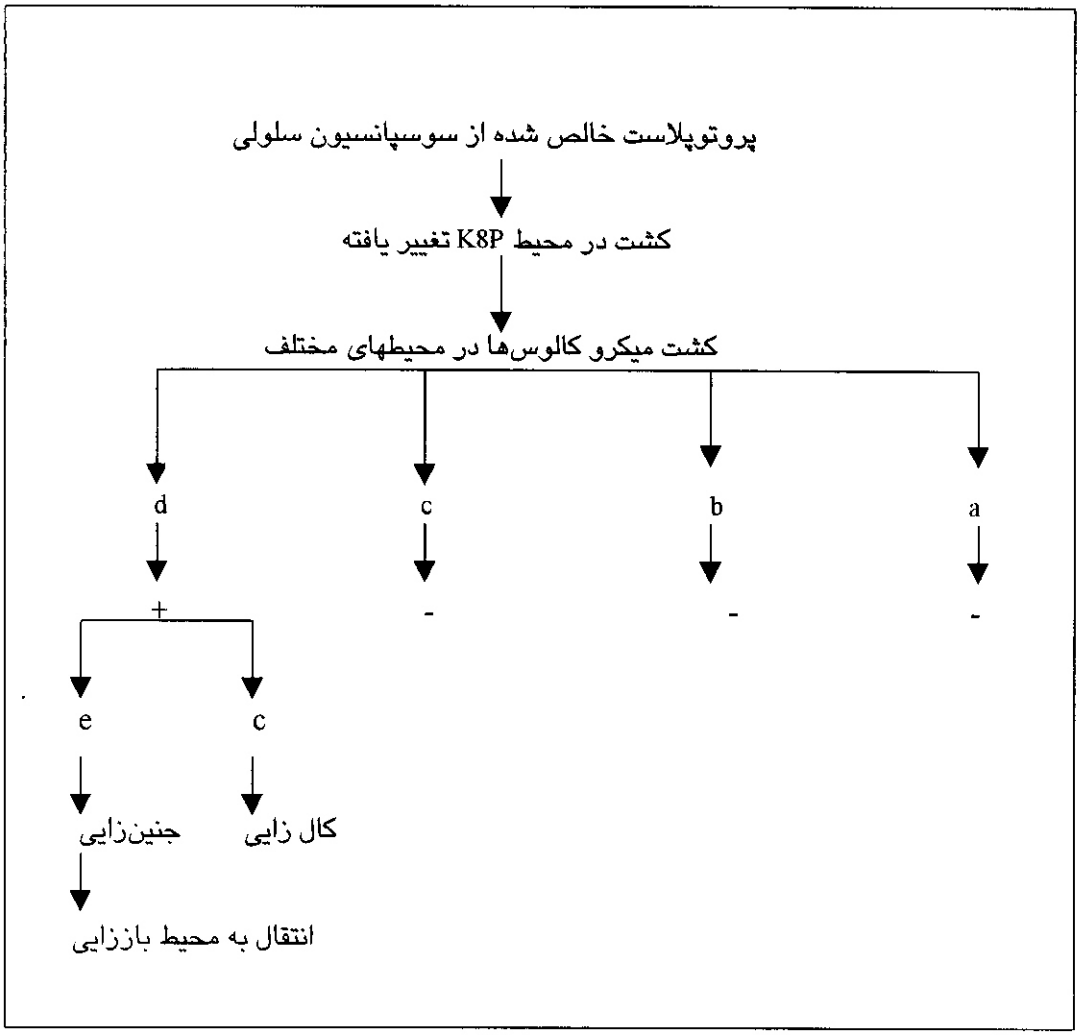
شکل ٥- ظهور علائم اندام زایی از کشت پروتوپلاست با منشاء سوسپانسیون‌سلولی

Fig. 5. Appearance of a bud formation on callus obtained from proroplasts of suspension culture source

چنین کالوسی بدلیل آنکه از قدرت باززایی خوبی برخوردار بود، پیش از آنکه در چرخه‌جنین‌زایی شرکت داده شود، می‌توانست منبع مناسبی جهت تولید پروتوپلاست‌هایی، باشد که از قدرت باززایی مناسبی برخوردار هستند.. از سوی دیگر محیط غذایی کشت نیز تأثیر تعیین کننده‌ای در تحریک هرچه بیشتر باززایی‌سلول‌ها دارد. به طوریکه از شکل شش می‌توان استنباط نمود، با وجود آنکه منبع تولید پروتوپلاست درهر چهار محیط کشتa، b، c و d یکی می‌باشد، تنها در محیطd ، رشد بعدی میکرو کالوس‌هاصورت گرفته است .محیط غذاییd ، محیط N6 حاوی ٦٪ قند می‌باشد که پیش از این جهت کشت‌تخمک و تولید گیاه هاپلوئید پیشنهاد گردیده بود (دکترینال و همکاران ۱۹۹۰، یاوری ۱۳۷٥). از سوی‌دیگر با وجود تبدیل میکروکالوس‌ها به کالوس های قابل رویت در محیط فوق، ادامه رشدآنها تا ظهوراولین

نشانه‌های جنین‌زایی(پریموردیا)، در محیط e با ترکیب پایهPG_{oB} و سطح قند ۳٪ انجام پذیرفت. علاوه بر تفاوت نمکها و درصد قند ساکارز، هورمون‌های استفاده شده در هر دومحیط نیز دارای تفاوت‌های زیادی می‌باشند .با وجودآنکه محیط c از قدرت جنین‌زایی بالایی در کشت سلول چغندرقند برخوردارمی‌باشد (احسانی مقدم، ۱۳۷۷) ولی نتایج این آزمایش نشان داد که محیط فوق قادر به تحریک باززایی‌کلنی‌های سلولی حاصل از کشت پروتوپلاست نمی‌باشد.

نتایج بررسیهای انجام شده نشان داد که بافتهای گیاهی مختلف یک رقم چغندرقند در پاسخگویی کشت پروتوپلاست و سلولهای حاصل از آنها به محرکهای غذایی و هورمونی نیز متفاوت می باشند. در این تحقیق پروتوپلاست چغندرقند از سلولهای کالوس جنین زا قابلیت بیشتری در ادامه رشد و تمایز یابی نشان داده است.



شکل ٦ - نتایج حاصل از محیطهای مختلف جوانه‌زایی در رشد بعدی میکروکالوس‌ها

- :بدون رشد میکروکالوس + : رشد میکروکالوس و تبدیل به کالوس

a,b,c,d,e : محیط کشت‌های مختلف غذایی مطابق توضیح متن

Fig 6. Results obtained from protoplast derived microcalli culture media

- : nogrowth + : microcalli growth

a – e : different culture media

قدردانی و تشکر

کلیه هزینه‌ها، مواد گیاهی، مواد شیمیایی و وسایل لازم جهت اجرای این تحقیق توسط مؤسسه‌تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند تأمین گردید که بدین وسیله از مدیریت آن مؤسسه قدردانی‌می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱- احسانی مقدم، ب. ۱۳۷۷. گزارش نهایی طرح : جنین زایی سوماتیک در چغندرقند موسسه تحقیقات چغندرقند.

۲- یاوری، ن. ۱۳۷۵. گزارش‌نهایی طرح : ایجاد گیاه هاپلوئید چغندرقند از طریق کشت تخمک تلقیح نشده موسسه تحقیقات چغندرقند.

3.Bhat, S.R, B.V. Ford – Lloyd and J.A. Callow. 1986. Isolation and culture of mesophyll protoplasts of garden, fodder and sugar beets using a nurse culture system: Callus formation and Organogenesis. J. Plant Physiol. Vol. 124: PP. 419- 423.

4. Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, pp 43- 50.

5. D'halluin K, M. Bossut, E. Bonne, B. Mazur, J. Leemans and J. Botterman. 1992. Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. Bio/Technol. 10: 309- 314.

6. Doctrinal, M. R.S. Sangwan and B.S. Sangwan – Norccel. 1990. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) : *in vitro* induction of haploids.In: Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 12. Ed. Y.P.S. Bajaj, Springer -Verlag, Berlin, pp: 3- 44.

7. De Greef W.and M. Jacobs 1979. *In vitro* culture of sugar beet: description of a cell line with a high regeneration capacity. Plant Sci. lett. 17: 55- 61.

8. Ehsani Moghaddam B. Mesbah M. and N. Yavari. 2000. The effect of *in planta* TIBA and proline treatment on somatic embryogenesis of sugar beet *(Beta vulgaris* L.). Euphytica 112 : 151 – 156.

9. Ehsani Moghaddam B. P.Ahmadian, Y. Sadeghian, S. Abdemishani, A. Talei and N. Yavari. 1996. Isolation, purification and culture of protoplast of *Beta vulgaris* L. (sugar beet). 2nd Int. Crop. Sci. Con. New Delhi, India.

10. Frearson EM, JB. Power, EC. Cocking. 1973. The isolation, culture and regeneration of Petunia leaf protoplasts. Dev. Biol. 33: 130- 137.

11. Hall R.D., C. Pedersen and F.A. Krens 1994. Regeneration of plants from protoplasts of *Beta vulgaris* (sugar beet) In: Biotechnology in Agriculture and forestry. Vol 29. Ed: Y.P.S. Bajaj, Springer- Verlag, Berlin, pp: 16- 37.

12.Joersho M. And J. Brunstedt. 1990. Direct gene transfer to plant protoplasts by elctro poration by alternating, rectangular and exponetially decaying pulses. Plant Cell Reports 8: 701- 705.

13.Joersbo, M. and J. Brunstedt. 1990. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication. Plant cell Reports 90: 207- 210.

14. Kao K.N. and M.K., Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vinca hajastana* cells and protoplasts at very low density in liquid media. Planta126: 105- 110.

15. Krens F.A. Jamar D. Rouwendal GJA. and R.D. Hall. 1990. Transfer of cytoplasm from new *Beta* CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion. I.Shoot regeneration from mesophyll protoplasts and characterization of regenerated plants. Theor Appl. Genet 79: 390- 396.

16. Lindsey K. and M.G.K.Jones 1989. Stable transformation of sugar beet protoplasts by electroporation. Plant Cell Rep. 8: 71- 74.

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

18. Pelletier, G. 1993. Somatic hybridization. In : Plant Breeding Principles and prospects. Edited by M.D. Hayward, N.D. Bosemark and I. Romagosa. Chpman & Hall., London. pp. 93- 166.

19. Saunders J.W. 1998. Regeneration of REL-1 and REL-2 sugar beet germplasms for tissue culture genetic manipulations. Crop Sci. 38: 901- 902.

20. Saunders J.W. W.P. Doley, J.C. Theurer and M.H. Yu. 1990. Somaclonal variation in sugar beet. In Y.P.S. Bajaj(ed.), Biotechnology in agriculture and forestry 11, Somaclonal variation in crop improvement 1., Springer Verlag, Berlin.pp. 465- 490.

21. Tsai Ch. J. and J.W. Saunders. 1995. Somatic embryos from callus of sugarbeet biotechnology clone REL-1. J. of Sugar Beet Res. 32: 215- 227.