

تأثیر غلظت های مختلف های BAP و CPPU در ترکیب با NAA بر شاخه زایی از ریزنمونه برگ در پایه محلی سیب "گمی آلماسی"

راضیه صفرعلیزاده (۱)، حسن مهدوی کیا (۲)، ناصر مهنا (۳)، علیرضا مطلبی آذر (۳)، فریبرز زارع نهندی (۳)
۱- دانشجوی ارشد میوه کاری دانشگاه تبریز ۲- دانشجوی دکتری سبزیکاری دانشگاه تبریز ۳- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه تبریز

اهمیت پایه های یک دست وهمگن و ایجاد باغات مترام، استفاده از روشهای تکثیر رویشی و از بین آنها ازدیاد درون شیشه ای را که اقتصادی ترین و سالم ترین روش تکثیر رویشی است، ملزم می سازد. باززایی شاخه یک مرحله بحرانی برای انتقال ژن توسط آگروباکتريوم می باشد و در بسیاری از سیستم ها عدم کارایی باززایی، فاکتور محدود کننده توسعه تکنولوژی انتقال ژن در محصولات چند ساله می باشد. سیب از جمله محصولات مهم در ایران و جهان است و همین موضوع زمینه ای برای انجام تحقیقات وسیع جهت دستیابی به حداکثر عملکرد و کیفیت این میوه گردیده است. سیب گمی آلماسی یکی از درختان پاکوتاه بومی منطقه آذربایجان است، ویژگی های این پایه بالقوه سیب، محققین متعددی را برای تحقیق روی آن ترغیب نموده است. برای ایجاد امکان دستکاری ژنتیکی این پایه وجود یک پروتوکول کارآمد باززایی ضروری و اجتناب ناپذیر است. لذا در این تحقیق، اثر دو نوع سیتوکینین BAP و CPPU در ترکیب با اکسین بر میزان باززایی شاخساره از نمونه های برگ یک ماهه درون شیشه ای یک ژنوتیپ گمی آلماسی مورد بررسی قرار گرفت. درصد تشکیل شاخه نابجا در تیمار انجام گرفته با BAP ۲۱٪ و در تیمار CPPU ۴۴٪ بود.

کلمات کلیدی: آگروباکتريوم، باززایی، گمی آلماسی، سیتوکینین، اکسین

مقدمه:

سیب یکی از مهم ترین میوه های مناطق معتدله و دومین محصول میوه ای در جهان بعد از موز می باشد (۷/۷ میلیون تن در سال) (۴). در خاکهای آهکی ایران به دلیل بالا بودن pH، وجود آهک فراوان و مصرف روزافزون کودهای فسفاته، جذب آهن و منگنز توسط گیاه کم بوده و تحت چنین شرایطی کمبود آهن و روی بیشتر دیده می شود (۱). در این شرایط، پایه های پاکوتاه اروپایی که با pH پایین (اسیدی) سازگار هستند، قابلیت رشد بهینه را نداشته و علائم زردی ناشی از کمبود آهن را نشان می دهند (۲ و ۳). توده بومی گمی آلماسی^{۲۹}، پایه پاکوتاه بومی آذربایجان می باشد که برطبق آزمایشات درون شیشه ای نسبت به پایه های پاکوتاه موجود مالینگ و مالینگ مرتون علائم کمبود آهن و زردی را دیرتر نشان می دهد (۲). برای امکان دستکاری ژنتیکی این پایه و رفع مشکلات احتمالی آن مانند سطحی بودن ریشه ها و پاجوش فراوان، دستیابی به یک پروتوکول کارآمد باززایی^{۳۰} ضروری بنظر می رسد.

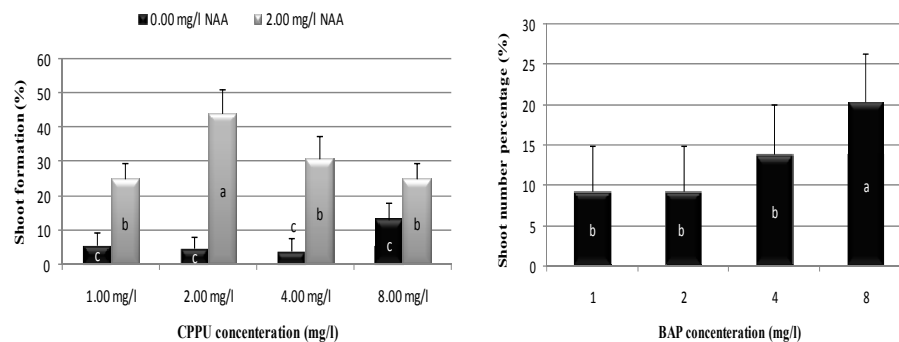
مواد و روش ها:

محیط کشت استفاده شده در باززایی محیط کشت پایه MS بود که همراه با ویتامینهای MS به اضافه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز تهیه شده بود. تنظیم کننده های رشدی که در محیط باززایی استفاده شد، شامل سیتوکینین های CPPU، BAP در مقادیر ۱، ۲، ۴، ۸ میلی گرم در لیتر همراه با NAA در دو غلظت ۰ و ۲ میلی گرم در لیتر بوده است. pH محیط کشت در ۵/۸ تنظیم شده و بعد از افزودن ۸ گرم در لیتر آگار به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو شدند. به دلیل حساسیت سیتوکینین - CPPU به حرارت بالا، این هورمون بعد از اتوکلاو شدن محیط کشت زیر هود لامینار با روش فیلترکردن، توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتری استریل شده و به محیط کشت اضافه شدند. محیط کشت ها بعد از سرد شدن به اندازه ای که آگار جامد نشده، در پتری دیس های ۸۰ میلی متری پخش شدند. برگهای انتهایی گیاهچه های یک ماهه سیب گمی آلماسی توسط قیچی بریده شده و

ریزنمونه‌های برگ کامل توسط اسکالپل از محل رگبرگ اصلی در پشت برگ زخمی شده و از قسمت پشتی برگ طوری که با محیط کشت تماس داشته باشد در پتری‌دیش قرار گرفتند. سپس پتری‌دیش‌ها با پارافیلیم بسته شده و کشت‌ها در تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد به مدت ۲۱ روز قرار گرفتند و به دنبال آن به شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتیگراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. تقریباً ۳ هفته پس از قرارگیری کشت‌ها در روشنایی، تعداد شاخه‌های نابجای باززایی شده در پتری‌دیش (کل شاخه‌های تشکیل شده به صورت مستقیم و غیرمستقیم) یادداشت‌برداری شدند. داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با نرم‌افزار SPSS vr.16 تجزیه واریانس شدند. مقایسات میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰.۵٪، انجام و نمودارها با نرم افزار Excel ترسیم شد.

نتیجه‌گیری و بحث:

نقش تنظیم‌کنندگی CPPU به عنوان هورمون سیتوکینین ثابت شد و می‌توان گفت که گیرنده‌هایی در گیاه وجود دارد که ممکن است این گیرنده‌ها مشابه با گیرنده‌های BAP یا کاملاً متفاوت با آن گیرنده‌ها باشد که سیگنال‌های CPPU را دریافت کرده و پاسخی مشابه به پاسخ سیتوکینین از خود نشان می‌دهند. حضور اکسین در محیط کشت باززایی در ترکیب با سیتوکینین ضروری بود. CPPU در غلظت‌های پایین‌تر شاخه‌زایی بیشتری نسبت به BAP با غلظت‌های بالاتر نشان داد. تعداد شاخه‌های نابجای تشکیل شده در آزمایش دوم (تیمار CPPU) نسبت به آزمایش اول (تیمار BAP) بیشتر بود. بیشترین درصد شاخه‌زایی نابجا در تیمار BAP، ۲۱٪ (شکل ۱) و در تیمار CPPU ۴۴٪ بود (شکل ۲) که میزان باززایی در آزمایش دوم بیشتر از دو برابر آزمایش اول بود.



شکل ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف BAP روی درصد شاخه‌زایی کل
شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف CPPU و NAA روی درصد شاخه‌زایی نابجا

منابع:

- ۱- طباطبایی، سید جلال. ۱۳۸۸. اصول تغذیه معدنی گیاهان. انتشارات مولف.
- ۲- مهدوی کیا، حسن. ۱۳۸۸. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. گروه علوم باغبانی. دانشگاه تبریز.
- ۳- وجودی، لمیا. ۱۳۸۳. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. گروه علوم باغبانی. دانشگاه تبریز
- 4- Faostat.2009.http://www.faostat.org.

The effect of different concentrations of BAP and CPPU on shoot regeneration from leaf explants of an endemic apple rootstock “Gami-Almasi”

RaziyehSafarAlizade[§].HasanMahdavi^{kia}. Nasser Mahna*.AlirezaMotallebi-Azar.

FariborzZaareNahandi

Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract:

The importance of homogeneous rootstocks and creating apple regular gardens using an intensive cultivation technology have raised interest in using *in vitro* propagation methods which are more economic and safe. Shoot regeneration is a critical stage for genetic transformation through *Agrobacterium tumefaciens*. In most systems, the lack of adequate regeneration efficiency is one of the most important limiting factors in gene transfer technology in perennial plants. Apple is the second fruit in importance and production quantity in Iran and in the world as well. Therefore, it necessitates the optimization of an efficient regeneration protocol for “GamiAlmasi” which is a dwarf tree and native to Azerbaijan. The potentials of this apple rootstock encourages researchers to investigate more aspects of it. In this research, the effect of two cytokinins (BAP & CPPU) in combination with an auxin on the efficiency of shoot regeneration from leaf explants in “GamiAlmasi” was evaluated. The maximum percentage of adventitious shoot regeneration in the treatments with BAP was 21%, while it was 44% in the CPPU treatments.

Key words: Agrobacterium, Regeneration, Gami almasi, Cytokinin, Auxin