بررسی اثر Pluronic F-68 بر باززایی دو رقم گلابی (*Pyrus communis*) درگزی و بارتلت

سوده دشتی (۱و۲)، علی اکبر حبشی (۲)، علی وطن پور ازغندی (۲)، حمید عبدالهی (۳)، ساره دشتی (٤)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ۳- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ٤- دانشگاه مالزی، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی اجتماعی

Pluronic F-68 پلیمری از اکسید اتیلن و اکسید پروپیلن است که به صورت گسترده برای جلوگیری از استرس های هیدرودینامیکی سلول های جانوری و گیاهی در بیوراکتورها و اخیرا در محیط های همکشتی ریزنمونه های تراریخت استفاده می شود. در بحث انتقال ژن گیاه گلابی، باززایی ریزنمونه ها در محیط انتخابی همواره با مشکلات عدیده ای همراه بوده است. در این تحقیق اثر روکنشگر Pluronic F-68 (pl) بر باززایی ریزنمونه های برگی دو رقم گلابی (*Pyrus communis* L.) شامل درگزی و بارتلت، مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی تاثیر pl بر باززایی این دو رقم گلابی پنج غلظت این ماده در دو محیط پایه Quoirin and Lepoivre (QL) Nitsch & Nitsch (NN) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حضور pl ۱ ٪ (w/v) بر رقم بارتلت درهر دو محیط باعث افزایش باززایی گردید. از سوی دیگر رقم درگزی فقط در محیط NN و مقدار pl ۲٪ (w/v) افزایش باززایی نشان داد. به طور کلی در محیط QL باززایی کمتر از محیط NN بود. در محیط QL ۵/۲٪ از برگ های درگزی و ۳۳/۵٪ از برگ های بارتلت باززا شدند که اختلاف آنها معنی دار بود در صورتی که این اختلاف در محیط NN معنی دار نبود.

کلمات کلیدی: Pluronic F-68 ، گلابی ، باززایی

مقدمه:

Pluronic F-68 پلیمردوتایی از اکسید اتیلن و اکسید پروپیلن است که به صورت گسترده برای جلوگیری از استرس های هیدرودینامیکی سلولهای جانوری و حشرات در بیوراکتورها مورد استفاده قرار میگیرد (Murhammer et al., 1990; Wu et al., 1997) . مکانیزم حفاظتی پلورونیک به علت واکنش هایی است که با سطح سلول میدهد و باعث کاهش جذب سطحی بین سلول و حباب های هوا در محیط اطراف می شود و سلول ها می توانند از حبابهای پاره کننده دیواره در امان بمانند. اخیرا این ماده به عنوان القا کننده رشد و باززایی به محیط رشد سلول ها و بافت های چندین گیاه اضافه گردیده و اثرات آن مورد بررسی قرار گرفته است (Lowe et al., 1993). مطالعات بر روی *Chrysanthemum capsularis* نشان داده است که القای باززایی در لپه های همراه با دمبرگ به تعادل هیدروفیلیک-هیدروفوبیک حاصل از مواد غیر یونی موجود در محیط کشت وابسته است (Davey et al., 2003). گلابی از مهمترین درختان میوه در مناطق معتدله محسوب می شود. در برنامه انتقال ژن در گلابی افزایش درصد باززایی و کالوس زایی از ریزنمونه های تلقیح شده با اگروباکتریوم همواره مورد توجه قرار داشته است. در این پژوهش سعی شده استفاده از این ماده روکنشگر در دو رقم گلابی و در محیط های مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها:

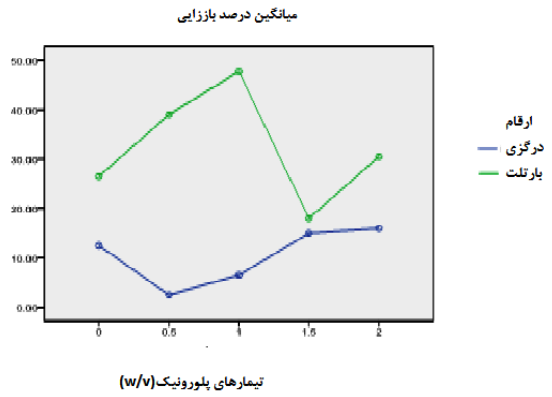
در این آزمایش ریزنمونه های برگی از شاخه های جوان ٤ هفته ای ارقام درگزی و بارتلت استفاده گردید. این گیاهان درمحیط پایه QL به همراه ویتامین های تغییر یافته بر اساس روش (Leblay et al. 1991) تکثیر می شدند پنج غلظت پلورونیک شامل ۰٪ ،۰/۵٪ ،۱٪ ، ۱/۵٪ ، ۲٪ (w/v) مورد مطالعه قرار گرفت . Pluronic F-68 در آب دو بار تقطیر حل شد و به وسیله فیلتر با قطر ۰/۲۲ µm استریل گردید. دو محیط پایه مختلف QL (Quoirin and Lepoivre) و NN (Nitsch and Nitsch) هردو به همراه TDZ (Thidiazuron) ۲/۵ µM و NAA (Naphtalen acetic ۱ µM

(acid به همراه g/l ۳۰ ساکارز و ۰/۷ ٪ آگار در اسیدیته ۵/۸ مورد بررسی قرار گرفتند. برگهای جوان ۲-۳ میلیمتری از گیاهان جمع آوری و پس از ایجاد دو خراش افقی عمود بر رگبرگ اصلی کشت گردیدند (Matsuda *et al.*, 2005). هر تیمار شامل ٤ تکرار و هرتکرار حاوی ۵ ریزنمونه بود. تیمارها به مدت ٤ هفته در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ در تاریکی قرار داده شدند و پس از آن به روشنایی منتقل شدند. درصد باززایی در هر ریز نمونه در هفته هشتم موردبررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث:

تولید کالوس در قسمت های خراش داده شده در ۲ هفته اول مشهود بود. اکثر جوانه های اولیه حاصل از باززایی پس از هفته چهارم و با انتقال به روشنایی شکل گرفتند (شکل۱). باززایی ریزنمونه ها تحت تاثیر غلظت پلورونیک قرار گرفت (نمودار ۱). محیط QL میزان کمتری از درصد باززایی را نسبت به محیط NN از خود نشان داد. به صورتی که در QL میزان باززایی ۲۰/٤٪ و در محیط NN این رقم به ۲۸/۵٪ رسید که در سطح ۵٪ معنی دار بود.

شکل۱: باززایی حاصل از ریزنمونه برگی



نمودار۱: تفاوت های میزان باززایی در دو رقم مورد بررسی

به طور کلی درصد باززایی در ارقام مورد بررسی نیز با سطح معنی دار ۱٪ اختلاف زیادی از خود نشان دادند. درصد میانگین باززایی در رقم درگزی ۱۵٪ و برای رقم بارتلت ۳۳/۹۵٪ بود. اختلاف در باززایی مانند اکثر مطالعات قبلی در ارقام مختلف گلابی قابل پیش بود (Abdollahi et al., 2004). محیط QL در رقم درگزی باعث ۸/٦٦٪ باززایی گردید درحالی که این میزان برای رقم بارتلت ۳۲/۲۵٪ بود که در سطح ۵٪ معنی دار شد. ازسوی دیگر محیط NN اختلاف معنی داری را در دو رقم از خود نشان نداد و میزان باززایی در رقم درگزی ۲۱/۳۳٪ و برای بارتلت ۳۵/٦٦٪ بدست آمد.

بالاترین میزان باززایی برای بارتلت در غلظت (w/v) ۱٪ پلورونیک بدست آمد که در محیط QL ٤٦/۲۵٪ و در محیط NN ۵۳/۳۵٪ بود. در محیط QL میزان (w/v) ۱/۵٪ پلورونیک باعث افزایش باززایی تا حدود ۲۵٪ گردید و در محیط NN (w/v)۲٪ پلورونیک باززایی را به ۳۷٪ رساند.بررسی اثرات متقابل در این آزمایش نشان داد که پلورونیک و رقم اثر متقابلی معنی داری (در سطح ۱٪) بر هم دارند .

منابع:

Abdollahi H., Muleo R. and Rugini E. 2006. Optimisation of Regeneration and Maintenance of Morphogenic Callus in Pear (Pyrus communis L.) by Simple and Double Regeneration Techniques. Scientia Horticulturae Vol 108, 352-358

Davey MR, Marchant R, Power JB. ; 2003Protoplasts of grain and forage legumes: their exploitation in genetic manipulation, physiological investigations and plant–pathogen

interactions. In: Jaiwal PK, Singh RP, editors. Improvement strategies for leguminosae biotechnology. Dordrecht, The Netherlands7 Kluwer Academic Publishers. p. 133–53.
Leblay C., Chevreau E. and Raboin L.M., 1991 .Adventious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivars (Pyrus Communis L). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 25(2): 99-105.
Lowe KC, Davey MR, Power JB, Mulligan BJ .,1993. Surfactant supplements in plant culture systems. Agro-Ind. Hi-Tech. 4: 9-13.
Matsuda, A., Gao, M., Isuzugawa, K., Takashina, T. and Nishimura, K. 2005. Development of an Agrobacterium-mediated transformation method for pear (Pyrus communis L.) with leaf-section and axillary. Plant Cell Rep. 24: 45–51.
Murhammer et al., 1990 Murhammer D.W. and Goochee, C.F. 1990. Structural features of non-ionic polymer molecules responsible for protective effect in sparged animal cell bioreactors. Biotechnol. Prog. 6, 391-397.
Wu, J., Q. Ruan, and H. Y. P. Lam. 1997. Effects of surfaceactive medium additives on insect cell surface hydrophobicity relating to cell protection against bubble damage. Enzyme Microb. Technol. 21: 341-348.

Effects of Pluronic F-68 on regeneration of two pear cultivars (*Pyrus communis* L.) Dargazi and Bartlett

Soudeh Dashti [1, 2], Ali Akbar Habashi[2]*, Ali Vatanpour Azghandi [2], Hamid Abdollahi[3] Sareh Dashti

Department of Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agricultural Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj
Departments of Horticultural Research, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj
University of Malaya, Faculty of Medicine Department of Social and Preventive Medicine

Abstract

Pluronic F-68, a copolymer of ethylene oxide and propylene oxide has been widely used to protect animal or plant cells from hydrodynamic stress in bioreactors and it has been used for co-cultivation media in some transgenic researches. In aria of transformation of pear, regeneration of explants in selectable media always is problematic issue. In this research the effects of a non-ionic surfactant, pluronic F-68, on regeneration of leaf explants of two cultivars of pear (Pyrus communis L,), Dargazi and Bartlett were studied. Effect of 5 concentrations of pluronic added in to 2 basal media, Quoirin and Lepoivre (QL) and Nitsch & Nitsch (NN) were examined on regeneration enhancement of two pear cultivars. The results showed that the present of 1% (w/v) pluronic F-68 was effective on Bartlett regeneration in both QL and NN media. Also, NN medium supplemented with 2% (w/v) pluronic F-68 had a positive influence on regeneration of Dargazi cultivar. In general, QL resulted in a slightly lower regeneration rate than NN medium that was not significant. QL medium regenerated 5.2% of Dargazi leaves while Bartlett leaves regenerated 33.5% in this medium which was significantly higher than Dargazi. NN medium seemed have no significant effect on none of Dargazi and Bartlett leaves.

Key words: Pluronic F-68, pear, regeneration