فاکتورهای موثر بر باززایی مستقیم در ارقام گلابی (*Pyrus communis L.*)

مهدیه یوسفی آرا، مریم جعفر خانی کرمانی، معصومه عمادپور و علی اکبر حبشی
پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، تهران، کرج

چکیده

گلابی مهمترین محصول مناطق معتدل جهان پس از انگور و سیب است. اصلاح گلابی با استفاده از روشهای سنتی به طور عمده بر اساس هیبریداسیون درون و بین گونه ای می باشد که به علت سطح بالای هتروزیگوسی در گلابی، پلی‌ژنیک بودن صفات و دوره جوانی طولانی بکارگیری این روشها، مشکل و نیازمند صرف زمان و هزینه بسیار است. بنابراین اصلاح ژنتیکی ارقام گلابی با استفاده از روشهای نوین القا جهش و مهندسی ژنتیک مورد توجه واقع شده است. در این راستا وجود پروتکل های موثر و قابل تکرار برای سیستم های باززایی در شرایط درون شیشه ای پیش نیاز اصلی محسوب می شود. هدف از مطالعه حاضر ارائه پروتکل موثر باززایی برای دو رقم تجاری گلابی بود. به این منظور از محیط پایه Nitsch حاوی تنظیم کننده های رشد شامل TDZ با غلظت های (۰، ۲/۵، ۵ ، ۷/۵ میکرومولار) و BAP با غلظت های (۰، ٤، ۸ ، ١٦ میکرومولار) همراه با NAA (۰ و ۱ میکرومولار) برای القا باززایی مستقیم استفاده شد. ریزنمونه برگ ازگیاهچه های استقرار یافته در شرایط این ویترو جدا و با برش عمودی بر رگبرگ میانی به سه بخش تقسیم گردیدند. نتایج نشان داد که ظرفیت باززایی مستقیم در گلابی بسیار وابسته به کولتیوار می باشد به طوریکه میزان باززایی در رقم درگزی به طور معنی داری بیشتر از رقم بارتلت بود. در محیط کشت حاوی TDZ (۷/۵) میکرومولار همراه با NAA (۱) میکرومولار در هر دو کولتیواربالاترین درصد باززایی مشاهده شد.

مقدمه

گلابی مهمترین محصول مناطق معتدل جهان پس از انگور وسیب است. اصلاح گلابی با استفاده از روشهای سنتی به طورعمده براساس هیبریداسیون درون وبین گونه ای می باشد که به علت سطح بالای هتروزیگوسی در گلابی، پلی ژنیک بودن صفات و دوره جوانی طولانی بکارگیری این روشها مشکل و نیازمند صرف زمان وهزینه بسیار می باشد. بنابراین اصلاح ژنتیکی ارقام گلابی با استفاده از روشهای نوین القا جهش و مهندسی ژنتیک مورد توجه واقع شده است. دراین راستا وجود پروتکل های موثر وقابل تکرار برای سیستم های باززایی در شرایط درون شیشه ای پیش نیاز اصلی محسوب می شود. هدف از مطالعه حاضر ارائه پروتکل موثر باززایی برای دو رقم تجاری گلابی بود.

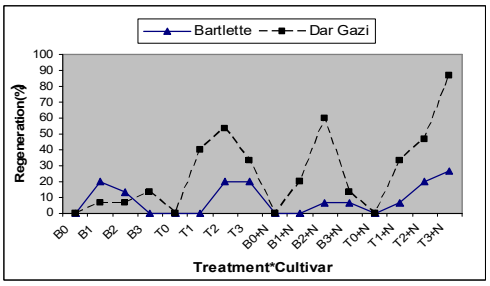
مواد و روش‌ها

برگهای توسعه یافته درون شیشه ای ارقام بارتلت و درگزی جدا شده و با دو برش عمود بررگبرگ اصلی به سه بخش تقسیم گردیدند. ریزنمونه ها در محیط کشت پایه Nitsch همراه با تیمارهای هورمونیTDZ (T0=0, T1=2.5, T2=5, T3=7.5 میکرومولار) و BAP (B0=0, B1=4, B2=8, B3=16 میکرومولار) بدون NAA یا در ترکیب با ۱ میکرومولار NAA (T0+N, T1+N, T2+N, T3+N, B0+N, B1+N, B2+N, B3+N) حاوی ۳۰ g/L ساکارز و ۷ g/L آگار (pH=5.8) کشت شدند. ریزنمونه ها به مدت ٤هفته در تاریکی قرار گرفته سپس واکشت شده و به شرایط نوری استاندارد منتقل شدند.

واکشت هر ٤ هفته یکبار انجام گرفت. شوت های باززایی شده به محیط تکثیر منتقل گردیدند(عکس). آماربرداری هر ٤هفته یکبار انجام پذیرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل درقالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و ٥ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. داده ها با کمک نرم افزار آماری JMP و MSTATC تجزیه و نمودارها در نرم افزار EXCEL2003 رسم گردیدند.

نتایج وبحث

نتایج نشان دادند که تفاوت معنی داری بین دو رقم بارتلت و درگزی نسبت به باززایی وجود داشت به طوریکه بیشترین میزان باززایی در رقم درگزی مشاهده شد (نمودار). اثر کولتیوار در باززایی در چندین مطالعه قبلی هم گزارش شده بود(Abdollahi *et al.* 2006, Tang *et al.* 2008). بین پاسخ ارقام به تیمارهای مختلف هورمونی تفاوت معنی داری مشاهده شد. براین اساس در رقم بارتلت تفاوت معنی داری میان بکارگیری TDZ وBAP مشاهده نشد وتنها در تیمار T3+Nبه طور معنی داری درصدباززایی افزایش یافته بود. در رقم درگزی نیز بیشترین درصد باززایی در همین تیمار مشاهده شد. اما در رقم درگزی در صد باززایی به طور معنی داری در تیمارهای حاوی TDZ بالاتر ازتیمارهای حاوی BAP بود (نمودار). Leblay (۱۹۹۱) هورمون TDZرا در غلظت های ۲/٥ و٥ میکرومولارمطلوب معرفی کرد. در مطالعه حاضر ترکیب TDZبا اکسین NAAبیشترین باززایی را نشان داد. در یک مطالعه غلظت پایین NAA (۱میکرومولار) همراه با BAP(۸ میکرومولار) بهترین محیط باززایی معرفی شده بود. برخی گزارشات نیز ترکیب TDZ با NAA را برای القا شوت های نابجا موثر دانسته اند(Tang *et al.* 2008). در مجموع این تحقیق نشان می دهد که: الف) ظرفیت باززایی مستقیم در گلابی بسیار وابسته به رقم می باشد ب) ترکیب سیتوکینین با اکسین در باززایی مستقیم موثرتر از بکار گیری سیتوکینین به تنهایی است و ج) مطالعه حاضر بهترین پروتکل باززایی برای دو رقم بارتلت و درگزی را که پیش نیاز برنامه های اصلاحی نوین می باشد ارائه نموده است.



منابع

1. Abdollahi H., Rosario M. and Rugini E. (2006). Optimization of regeneration and maintenance of morphogenic callus in pear *(Pyrus communis* L.) by simple and double regeneration techniques. Scientia Horticulture.108: 352-358.
2. Leblay C., Chevreau E. and Rabion L.M. (1991). Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture.25: 99-105.
3. Tang H, Luo Y. and Liu C. (2008). Plant regeneration from in vitro leaves of four commercial pyrus species. Plant Soil Environ. 54:140-148.

Factors affecting direct shoot regeneration in pear cultivars (*Pyrus communis* L.)

Yousefiara M., * Jafarkhani Kermani M., Emadpour M. and Habashi A.A.
E-mail: m.j.kermani@abrii.ac.ir

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Tehran, Karaj, Mahdasht Road, P.O. Box: 31535-1897

Abstract:

Pear (*Pyrus*) is the third most important temperate fruit in the world, next to grapes and apples. Pear breeding by conventional methods, largely based on intra- and inter-specific hybridization is difficult, because it is highly heterozygous, polygenic and has a long juvenile period. Genetic improvement of pear cultivars is possible through inducting mutations and gene transfer by genetic engineering. A general prerequisite for these approaches is to establish an efficient plant regeneration system. The objective of the present study was to develop an efficient protocol for direct regeneration of Bartlett and Dar Gazi cultivars. The basal Nitsch media supplemented with different concentration of TDZ (0, 2.5, 5, 7.5 µM) or BAP (0, 4, 8, 16 µM) in combination with NAA (0,1µM) were used. The expanded leaves of the cultivars were taken from proliferating *in vitro* shoots. The leaves were cut, perpendicular to the midrib, into three sections. The results showed that direct regeneration capacity was highly related to genotype. Although regeneration rate in Dar Gazi was significantly higher than Bartlett, the highest percentage of regeneration in both cultivars was observed in the medium containing TDZ (7.5 µM) and NAA (1 µM).