دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 13:01 +0430 on Tuesday April 23rd 2019

بررسی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان باززایی مستقیم شاخساره در شرایط درون شیشه‌ای توت‌فرنگی رقم دیامانت (*Fragaria x ananassa* Duch.)

فریبا کجوری[۱]، غفار کیانی[۲]، قربانعلی نعمت زاده[۳] و یوسف قاسمی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: f.kojori@yahoo.com)
۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳ و ۴- استاد و مربی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان
تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۸

چکیده

توت‌فرنگی گیاهی علفی، چند ساله، متعلق به خانواده فراگاریا و یکی از منابع غنی ویتامین‌ها و مواد معدنی است. مطالعه حاضر جهت تعیین مناسب‌ترین غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سایتوکینین به‌منظور دست‌یابی به بیشترین بازده در تولید گیاهچه‌های درون شیشه‌ای گیاه توت‌فرنگی (رقم دیامانت) انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در محیط کشت پایه MS اجرا گردید. در این آزمایش سطوح مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد BA (۰/۲، ۰/۵، ۱ و۲ میلی‌گرم در لیتر) IBA وNAA (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با هم جهت باززایی ریزنمونه‌های نوک شاخساره و NAA و IBA (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) جهت ریشه‌زایی به طور جداگانه بررسی شدند. تعداد و طول شاخساره‌های باززایی شده و میزان تولید ریشه و طول آن در هر ریزنمونه اندازه‌گیری و بررسی گردید. بالاترین میزان باززایی در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد. بیشترین طول شاخساره در تیمار ترکیبی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و طویل‌ترین ریشه در تیمار شاهد مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: باززایی، تنظیم‌کننده‌های رشد، توت‌فرنگی، ریشه‌زایی، شاخساره

مقدمه

توت‌فرنگی با نام علمی (*Fragaria sp*)، گیاه علفی چندساله، متعلق به تیره گلسرخیان (Rosaceae)، جنس فراگاریا می‌باشد. توت‌فرنگی‌ها به جهت عطر و طعم دلپذیر خود، مصرف تازه‌خوری، انجماد و فرآوری، میوه‌ای عامه‌پسند در سراسر جهان هستند. در میان بسیاری از ویژگی‌های مثبت، ارزش تغذیه‌ای توت فرنگی تقریباً کامل است. هشت عدد توت‌فرنگی متوسط، حاوی ویتامین C بیشتری نسبت به یک پرتقال است (۷). این گیاه به‌طور معمول به‌صورت رویشی توسط ساقه‌های رونده تکثیر می‌شود. این روش بدلیل بروز بسیاری از بیماری‌های ویروسی و قارچی، ضعیف بودن نشا در تکثیر به روش سنتی و از بین رفتن تدریجی خلوص ژنتیکی، چندان مناسب نبوده و پاسخگوی تقاضای تجاری نمی‌باشد (۴). از سوی دیگر، واردات گیاهان مادری نیز مقرون به صرفه نبوده و بوته‌های سالم جهت تکثیر به روش سنتی در دسترس نمی‌باشند. افزایش سطح زیر کشت توت‌فرنگی برای پاسخ‌گویی به تقاضای بازار، فرآوری و صادرات آن، یکی از مهم‌ترین اهداف سیاست کشاورزی است. کرهو و هاکالا (۱۵) اعلام کردند که توت‌فرنگی را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش کشت بافت تکثیر کرد. در حقیقت ریزازدیادی یک تکنیک بسیار مفید برای اصلاح این گیاه است. گزارش‌های متعددی تأیید می‌کنند که ریزازدیادی توت‌فرنگی در صفات مختلف (تعداد ساقه‌های رونده، زمان گلدهی، عملکرد میوه و اندازه تاج) در مقایسه با روش متداول تکثیر از طریق ساقه‌های رونده نسبتاً بهتر است (۲۲،۲۰،۱۵). قسمت‌های مختلف گیاه توت‌فرنگی نظیر برگ، ساقه، مریستم انتهایی، ریشه، ساقه رونده و بخش‌های مختلف گل بطور موفقیت‌آمیزی در ازدیاد شاخساره در شرایط آزمایشگاهی بکار رفته است. در این میان، ریزنمونه نوک شاخساره از پتانسیل بالایی جهت باززایی شاخه‌ها برخوردار می‌باشد. ظرفیت بالای ریزنمونه نوک شاخساره جهت استفاده در باززایی درون شیشه‌ای توت‌فرنگی تاکنون توسط محققین مختلف نیز مطالعه شده است (۱۲،۱۰،۵). در طول سال‌های اخیر، ترکیبات محیطی متعددی جهت ریزازدیادی ارقام مختلف توت‌فرنگی منتشر شده است و اغلب از محیط پایه‌ی MS همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف استفاده می‌شود. IBA و NAA به‌عنوان منبع اکسین در ترکیب با BA، BAP و TDZ به‌عنوان سایتوکینین به‌کار رفته‌اند. حسن و

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 13:01 +0430 on Tuesday April 23rd 2019

همکاران (۱۱) باززایی شاخساره توت‌فرنگی را با استفاده از محیط کشت MS همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بدست آوردند. برخی از پژوهشگران نیز باززایی شاخساره در توت‌فرنگی را با استفاده از محیط کشت MS حاوی BA و همچنین در ترکیب با کینتین گزارش کردند (۲۲،۲۰،۱۷،۱). گردکانه و همکاران (۹) با بررسی روی سه رقم توت‌فرنگی دریافتند که BA به‌تنهایی سبب باززایی بهتر شاخساره در همه ارقام می‌گردد. بررسی‌های جلیلی مرندی و همکاران (۱۴) روی رقم سلوا و همچنین آزمایش‌های اوریورداین (۱۹) روی رقم Clonar، نتیجه فوق را تأیید می‌کند. نتایج بررسی‌های ایمارا (۸) نشان داد که بالاترین پارامترهای رویشی (تعداد ساقه، طول ساقه و تعداد برگ) با استفاده از نوک ساقه رونده در محیط MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BA حاصل می‌شود. در مقابل، نتایج مطالعات بات و دار (۳)، بر روی تنظیم‌کننده‌های مختلف بکار برده شده در کشت بافت توت‌فرنگی نشان داد که کاربرد بنزیل آدنین همراه با نفتالین استیک اسید نتیجه بهتری نسبت به کینتین و یا استفاده بنزیل آدنین به‌تنهایی داشته است. این نتایج نشان می‌دهد که باززایی گیاهچه بسته به گونه و رقم بسیار متفاوت و پروتکل باززایی از یک گونه به گونه دیگر و از رقمی به رقم دیگر متفاوت است (۴). از این رو، هدف از انجام این پژوهش انتخاب مناسب‌ترین نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد جهت تعیین پروتکل ریزازدیادی رقم دیامانت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۱ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. در این پژوهش از رقم تجاری دیامانت استفاده شد. رقم دیامانت در مقایسه با سایر ارقام تجاری مانند سلوا از لحاظ عملکرد و اندازه میوه، مقاومت به آفات و بیماریها (به خصوص کنه‌های عنکبوتی و کپک پودری) و کیفیت میوه بویژه عطر و طعم، برتر است. از نوک شاخساره‌های بوته توت‌فرنگی رقم Diamante برای پرآوری در شرایط درون شیشه‌ای استفاده گردید. به همین منظور ریزنمونه‌های تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در زیر جریان آب شهری قرار گرفته و سپس به مدت ۳۰ دقیقه توسط قارچ‌کش بنومیل ۱٪ تیمار شده و مجدداً توسط جریان آب شستشو شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به هود لامینار به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰٪ و سپس هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. جهت حذف بقایای مواد ضدعفونی‌کننده، ریزنمونه‌ها پس از هر بار ضدعفونی ۳-۴ بار با آب ۲ بار تقطیر استریل، شستشو شدند. ریزنمونه‌ها پس از استریل سطحی، در ابتدا برای تولید شاخساره در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ درصد زغال فعال همراه با ۰/۵ میلی‌گرم بنزیل آدنین (BA) کشت شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از اینکه گیاهچه‌ها به حد کافی رشد کردند، نوک شاخساره بهمراه یک تا دو برگ اولیه جدا شده و برای بهینه‌سازی محیط ریزازدیادی رقم مربوطه، به محیط کشت MS همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد بنزیل آدنین در ۴ سطح (۰/۲، ۰/۵، ۱ و۲ میلی‌گرم در لیتر) و ایندول بوتیریک اسید در ۳ سطح (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین ۳ سطح از نفتالین استیک اسید (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. پس از گذشت ۴ هفته، تعداد شاخساره‌های باززایی شده و ارتفاع گیاهان، یادداشت‌برداری شد. به‌منظور ریشه‌زایی، گیاهان بدست آمده به محیط MS ۱/۲ با ۳ سطح متفاوت از ایندول بوتیریک اسید (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. نمونه‌های شاهد در محیط MS ۱/۲ فاقد تنظیم کننده‌های رشد قرار گرفتند. نتایج این مرحله شامل تعداد و طول ریشه‌های تولید شده پس از گذشت ۴ هفته ثبت شد. این پژوهش بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. تجزیه آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار GEN STAT 12 و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون LSD در سطح ۵ درصد و ۱ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

طبق نتایج تجزیه واریانس، اثرات ساده اکسین (IBA ,NAA) و سایتوکینین (BA) در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شدند. اثرات متقابل میان اکسین‌ها و سایتوکینین بر صفات اندازه‌گیری شده متفاوت بوده به طوری که اثر متقابل آنها برای صفت طول شاخساره در سطح یک درصد معنی‌دار بوده اما برای تعداد شاخساره باززایی شده تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 13:01 +0430 on Tuesday April 23rd 2019

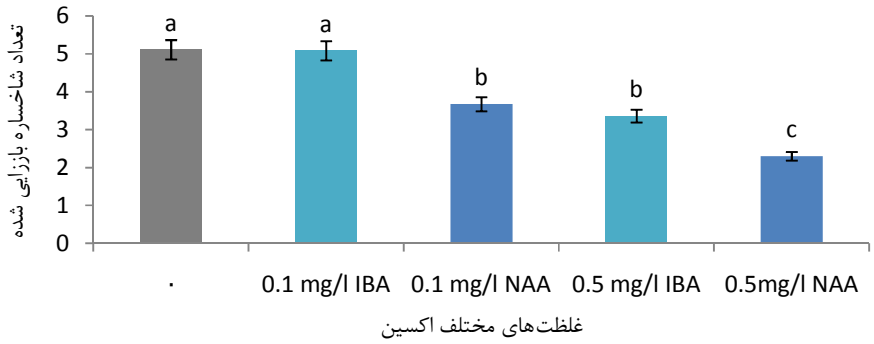
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی تحت‌تأثیر تیمارهای ترکیبی سیتوکینین و اکسین

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد شاخساره	طول شاخساره
BA	۳	۷/۴۸**	۱۵/۶**
IBA,NAA	۴	۱۷/۳۲**	۷۵۵/۳**
BA × IBA,NAA	۱۲	۱/۴۸ns	۷۰/۵۲**
خطای آزمایشی	۴۰	۰/۷۸	۳/۶۲
ضریب تغییرات		۲۲/۹	۹/۲

ns، * و **: به ترتیب بیانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد می‌باشد.

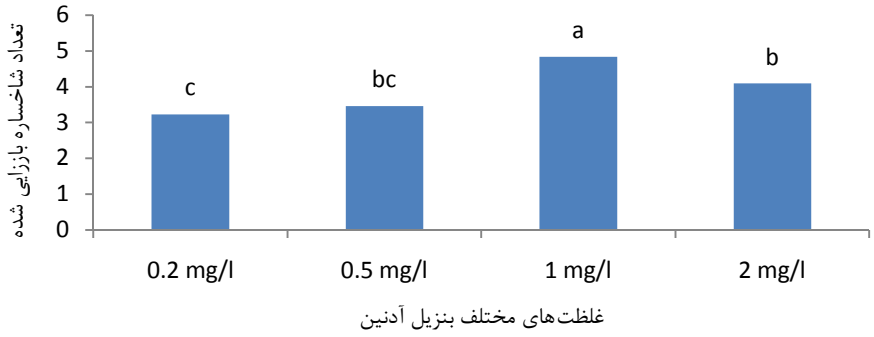
مرحله پرآوری شاخه

همان‌طورکه در جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشاهده شد، اثرات متقابل هورمون‌های سایتوکینین و اکسین برای صفت تعداد شاخساره معنی‌دار نبوده است. به همین دلیل، به‌منظور مقایسه میانگین صفت موردنظر، به بررسی جداگانه اثرات ساده سایتوکینین و اکسین‌ها پرداخته شد. اثر غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر تعداد شاخساره‌های باززایی شده در (شکل ۱) نشان داده شده است. صرف‌نظر از اثر BA، مقایسه میانگین اثرات ساده NAA و IBA نشان می‌دهد که حضور اکسین جهت باززایی رقم دیامانت ضروری نمی‌باشد زیرا همانطور که مشاهده می‌شود اختلاف معنی‌داری بین IBA در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و محیط فاقد اکسین وجود ندارد (شکل ۱). از طرفی با افزایش غلظت این هورمون‌ها در محیط، تعداد شاخساره‌های باززایی شده کاهش یافت.



شکل ۱- اثر اکسین NAA و IBA بر تعداد شاخساره باززایی شده میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

در مقایسه سطوح مختلف بنزیل آدنین، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۴/۸۴ عدد شاخساره در هر ریزنمونه، بیشترین تأثیر را بر باززایی شاخساره‌ها داشته است و در غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر، تعداد شاخساره‌های باززایی شده کاهش یافت (شکل ۲).

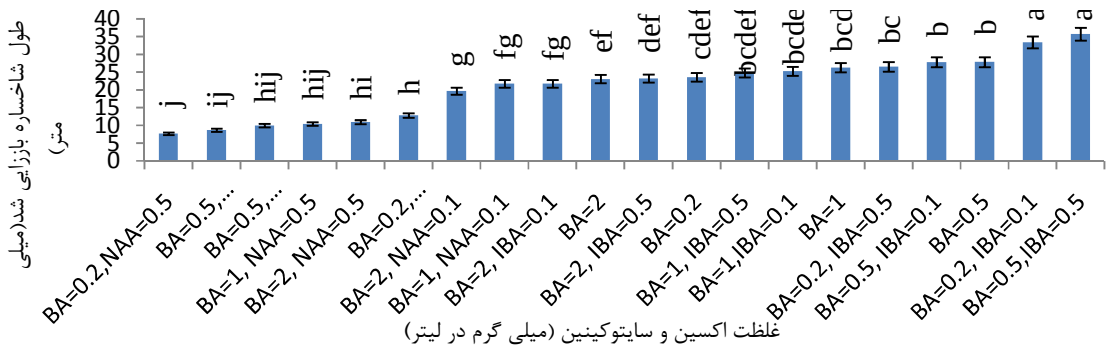


شکل ۲- اثر سایتوکینین BA بر تعداد شاخساره باززایی شده میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 13:01 +0430 on Tuesday April 23rd 2019

طول شاخساره باززایی شده

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثرات ساده اکسین و سایتوکینین و همچنین اثرات متقابل آنها بر طول شاخساره‌های باززایی شده در سطح یک درصد، معنی‌دار شده است. نتایج مقایسه میانگین BA و اکسین نشان می‌دهد که ترکیبات تیماری مختلف اثرات متفاوتی بر طول شاخساره‌های باززایی شده داشتند (شکل ۳). ۴ هفته پس از کشت، بیشترین طول شاخساره (۳۵/۷۷ mm) در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدست آمد. با این حال، ترکیب تیماری ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر BA در ترکیب با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA با میانگین ۳۳/۴۷ میلی‌متر، از نظر طول شاخساره با بهترین محیط کشت از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. بیشترین طول شاخساره در تیمار ترکیبی BA و IBA (۰/۵+ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین طول شاخساره در تیمارهای ترکیبی BA و NAA (۰/۲+ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. با افزایش غلظت BA از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، طول شاخساره‌ها کاهش یافت. از طرفی همانطور که در (شکل ۳) مشاهده می‌شود هورمون IBA نسبت به هورمون NAA، در افزایش طول شاخسارهای باززایی شده مؤثرتر بود که نشان‌دهنده تأثیرات متفاوت اکسین‌ها بر ریزنمونه می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۳- اثر متقابل غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر طول شاخساره باززایی شده میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

مرحله ریشه‌زایی

گیاهان بدست آمده از مرحله باززایی، به‌منظور ریشه‌زایی به محیط MS ۱/۲ با ۳ سطح متفاوت از ایندول بوتیریک اسید (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) برای مدت ۴ هفته، منتقل شدند. نمونه‌های شاهد در محیط MS ۱/۲ فاقد تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر ساده اکسین‌ها (NAA , IBA) بر تعداد و طول ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده است (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی تحت تأثیر تیمارهای NAA و IBA

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تعداد ریشه	طول ریشه
IBA,NAA	۶	۱۳/۹۷**	۴۷۷/۸۳**
خطای آزمایشی	۱۴	۰/۶۶	۵/۹۲
ضریب تغییرات		۹/۶	۹/۸

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

نتایج مقایسه میانگین مؤید آن است که غلظت و نوع اکسین، اثرات متفاوتی روی تعداد و طول ریشه تولید شده دارند. بیشترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS ۱/۲ شامل ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA با میانگین ۱۲/۴ عدد ریشه مشاهده شد و محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA با میانگین ۶ عدد ریشه در هر نمونه، کمترین ریشه‌زایی را داشت. طویل‌ترین ریشه از گیاهان کشت شده در محیط کشت MS ۱/۲ فاقد هورمون (شاهد) با میانگین ۳۹/۹۰ میلی‌متر بدست آمد (جدول ۳).

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 13:01 +0430 on Tuesday April 23rd 2019

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات مورد ارزیابی با استفاده از تیمارهای نفتالین استیک اسید و ایندول بوتیریک اسید

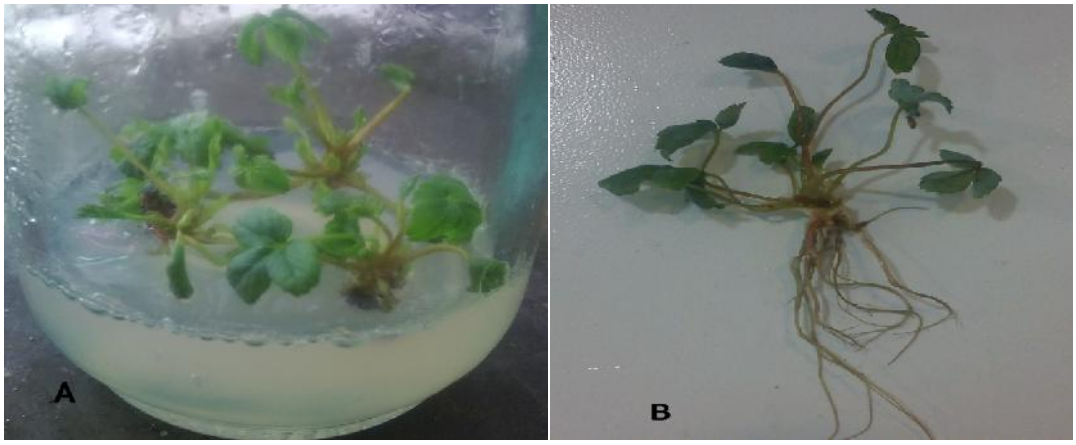
تنظیم‌کننده‌های رشد	تعداد ریشه	طول ریشه
۰	۹/۵۶۷[b]	۳۹/۹۰[a]
IBA (mg/l)		
۰/۲	۷/۱۶۷[c]	۳۵/۶۷[a]
۰/۵	۸/۶۶۷[b]	۲۷/۶۷[b]
۱	۶/۰[c]	۲۲/۴۰[c]
NAA (mg/l)		
۰/۲	۱۲/۴۰[a]	۳۱/۲۳[b]
۰/۵	۹/۲۵۰[b]	۹/۶۷[d]
۱	۶/۷۶۷[c]	۶/۷۷[d]

میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ ٪ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

نتایج این بررسی نشان داد که کاربرد هورمون BA به تنهایی در مقایسه با تیمار ترکیبی BA و اکسین، موجب باززایی بیشتری در ریزنمونه‌ها می‌شود. به عبارت دیگر، در محیط‌های کشت فاقد اکسین که حاوی غلظت‌های مختلفی از BA (۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بودند، بیشترین شاخساره تولید گردید که اثر مثبت بنزیل آدنین را در پرآوری نشان می‌دهد و با نتایج برخی پژوهشگران هماهنگ می‌باشد (۱۹،۹،۴). بنزیل آدنین با کاهش چیرگی انتهایی و طول شاخساره‌ها، سبب افزایش تعداد شاخساره می‌شود. در گزارش ایمارا (۸) آمده است که BA در رشد توت‌فرنگی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به Kin و TDZ مؤثرتر است. سایتوکینین‌ها در گیاهان باعث اندام‌زایی و تسریع در تقسیم سلولی می‌شوند. در مقایسه سطوح مختلف BA مشخص شد که بیشترین تعداد شاخساره در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر با تولید متوسط ۴/۸۴ عدد شاخساره در هر ریزنمونه بدست آمد و در غلظت‌های کمتر و بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد شاخساره‌ها کاهش یافت (شکل ۴-A). بر اساس گزارش اوریورداین (۱۹)، استفاده بیش از اندازه BA در محیط کشت، برای رشد شاخساره‌ها مضر بوده و شرایط کشت را نامناسب می‌کند. برخی از محققین نیز غلظت بالای سایتوکینین را موجب کاهش تعداد شاخساره‌های باززایی شده دانستند (۲۲،۱۰،۱). در رقم مورد بررسی، حضور اکسین در محیط کشت باززایی اثر منفی داشته و برخلاف بسیاری از تحقیقات صورت گرفته در ارقام دیگر توت‌فرنگی، نیازی به افزودن اکسین در مرحله باززایی نیست. حضور اکسین‌ها بطورکلی برای رشد و باززایی شاخه امری بدیهی است و موجب افزایش کارایی اندام‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود. در برخی از گونه‌ها و ارقام، سطوح داخلی هورمون‌های اکسین و سایتوکینین به گونه‌ای است که استفاده خارجی تنظیم‌کننده‌های رشد را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. این احتمال وجود دارد که میزان اکسین داخلی رقم دیامانت بالا بوده، بنابراین، افزودن اکسین به محیط درون شیشه‌ای موجب کاهش میزان باززایی شده است. واکنش متفاوت برخی از ارقام توت فرنگی به هورمون‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت، ممکن است به تفاوت ژنوتیپ‌ها و وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها نسبت داده شود. باززایی یک فرآیند بسیار پیچیده است که عوامل متعدد کمی و کیفی مانند خصوصیات ژنتیکی گیاه، موقعیت اولیه قلمه روی گیاه، سن قلمه، فصل سال، میزان هورمون‌های درون‌زا، اندازه قلمه، مقدار مواد تنظیم‌کننده رشد وغیره بر آن تأثیر می‌گذارند (۲). در بخش دیگری از این پژوهش، بررسی اثرات اکسین و سایتوکینین بر طول شاخساره‌های باززایی شده نشان داد که بیشترین طول شاخساره در تیمار ترکیبی BA و IBA (۰/۵ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین طول شاخساره در تیمارهای ترکیبی BA و NAA (۰/۲ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. با افزایش غلظت BA از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، طول شاخساره‌ها کاهش یافت. بر اساس یافته‌های چین ینگ و همکاران (۵)، غلظت پایین BA طول شاخساره را افزایش داده، اما موجب کاهش تشکیل تعداد شاخساره میگردد، و با افزایش غلظت BA در محیط کشت، علی‌رغم کاهش ارتفاع، تعداد شاخساره افزایش می‌یابد. مرادی و همکاران (۱۷) گزارش کردند زمانی که BA همراه با IBA در محیط بکار رفت، میزان تکثیر شاخساره‌ها در هر ریزنمونه کاهش یافت اما شاخساره‌ها طویل‌تر شدند. بنابراین می‌توان گفت در تیمارهایی که تعداد شاخه‌های باززایی شده بیشتر است بدلیل استفاده آنها از هورمون‌ها و مواد غذایی موجود در محیط کشت، شاخه‌های باززایی شده در این محیط‌ها، رشد کمتری دارند. مقایسه اثر اکسین‌ها برصفات طول و تعداد ریشه نشان داد که با افزایش غلظت این هورمون‌ها در محیط کشت، ریشه‌ها کمتر و کوتاه‌تر می‌شوند. همچنین مشخص شد که در محیط MS ۱/۲ حاوی NAA، بین تعداد و طول ریشه در هر ریزنمونه رابطه عکس وجود دارد به نحوی که بیشترین تعداد ریشه با میانگین ۱۲/۴ عدد و در عین حال کمترین طول ریشه با میانگین ۶/۷۷ میلی‌متر در این محیط مشاهده گردید.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 13:01 +0430 on Tuesday April 23rd 2019

افزایش غلظت IBA و NAA از ۰/۲ به ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش تشکیل ریشه و افزایش القای کالوس در انتهای ساقه گیاهان شده است. بات و دار (۳)، ۱ میکرو مولار NAA را بهترین غلظت برای القای ۹۷ درصد ریشه در توت‌فرنگی وحشی گزارش کردند. همچنین آنها دریافتند که با افزایش غلظت NAA، درصد و تعداد ریشه در هر ریزنمونه کاهش می‌یابد که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد. بطورکلی تولید کالوس در حضور IBA و NAA ممکن است باعث جلوگیری از طویل شدن ریشه شود زیرا کالوس پوششی روی ساقه ایجاد کرده و از ظهور ریشه ممانعت می‌کند. در گزارشی که حدادی و همکاران (۱۰) ارائه کردند، مناسب‌ترین محیط برای القای بیشترین تعداد ریشه در هر نمونه، بالاترین درصد ریشه‌زایی نمونه و بیشترین میانگین طول ریشه به ترتیب شامل ۱ میکرو مولار NAA، ۱ میکرو مولار IBA و محیط MS فاقد هورمون بود. سریواستاوا و حسینی (۱۳) نشان دادند که با استفاده از محیط MS ۱/۲ شامل ۵ میکرو مولار IBA بیشترین درصد ریشه‌زایی برای توت‌فرنگی حاصل می‌شود. در مجموع، نتایج این بررسی نشان می‌دهد که محیط MS ۱/۲ فاقد هورمون از نظر تولید تعداد و طول ریشه نسبت به تیمارهای هورمونی NAA و IBA، مطلوب تر است که با بررسی‌های دبنات (۶) که نشان داد محیط MS بدون هورمون ریشه‌های مناسبی برای سازگاری گیاه توت فرنگی تولید می‌کند مطابقت دارد (شکل ۴-B).



شکل ۴- اثرات تنظیم کننده‌های رشد روی باززایی شاخساره و القای ریشه در توت فرنگی رقم دیامانت. A) گیاهان باززایی شده از رقم دیامانت ۴ هفته پس از کشت در محیط MS محتوی ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین. B) ریشه‌های تولید شده از رقم دیامانت در محیط کشت MS ۱/۲ فاقد هورمون پس از گذشت ۴ هفته.

در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف BA (۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، IBA (صفر، ۰/۱ و۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفر، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین غلظت‌های IBA (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) بطور جداگانه برای بررسی ریشه‌زایی بکار گرفته شد. نتایج نشان داد که بیشرین میزان باززایی با میانگین ۴/۸۴ عدد شاخساره در هر ریزنمونه در محیط MS شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد. در رقم مورد بررسی، حضور اکسین در محیط کشت باززایی اثر منفی داشته و برخلاف بسیاری از تحقیقات صورت گرفته در ارقام دیگر توت فرنگی، نیازی به افزودن اکسین در مرحله باززایی نیست. بیشترین طول شاخساره (۳۵/۷۷ mm) در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدست آمد. همچنین تفاوت معنی‌داری بین نوع و غلظت مورد استفاده اکسین بر ریشه‌زایی این رقم مشاهده شد. هر چند بیشترین تعداد ریشه در محیط کشت MS ۱/۲ حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیترنفتالین استیک اسید مشاهده گردید اما بیشترین طول ریشه از محیط کشت شاهد یا بدون هورمون اکسین بدست آمد. در تحقیقات آتی می‌توان میزان تولید ساقه رونده و عملکرد گیاهان مذکور را در شرایط گلخانه‌ای بررسی کرد. همچنین می‌توان باززایی رقم دیامانت را با ارقام دیگر توت فرنگی مورد مقایسه با استفاده از ریزنمونه‌های مختلف، مورد بررسی قرار داد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان انجام شد.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 13:01 +0430 on Tuesday April 23rd 2019

منابع

1. Ara, T., M.R. Karim, M.A. Aziz, R. Karim, R. Islam and M. Hossain. 2013. Micropropagation and field evaluation of seven strawberry genotypes suitable for agro-climatic condition of Bangladesh. African Journal of Agricultural Research, 8(13): 1194-1199.
2. Bagheri, A. and M. Saffari. 1997. In vitro culture of Higher Plants. Ferdowsi University of Mashhad press, 406 pp. (In Persian)
3. Bhatt, I.D. and U. Dhar. 2000. Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 60: 83-88.
4. Biswas, M.K., R. Islam and M. Hossain. 2008. Micropropagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. Journal of Agricultural Technology, 4(1): 167-182.
5. Chien-Ying, K., A.M. Al-Abdulkarim, S.M. Al-Jowid and A. Al-Baiz. 2009. An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. African Journal of Biotechnology, 8(11): 2611-2615.
6. Debnath, S.C. 2005. Strawberry sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. *In Vitro* Cell, 41: 671-676.
7. Driscoll, S. 2004. http://www.driscolls.com/strawberries/nutrition.html
8. Emarah. 2008. Factors affecting propagation of strawberry (*Fragaria spp.*) through tissue cultures. International Journal of Product Development, 13(1): 191-212.
9. Gerdakaneh, M., A.A. Mozafari and R. Gholami. 2011. Effect of different concentrations of growth regulators on shoot regeneration and proliferation in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cultivars. Plant Production Technology, 3(1): 25-36. (In Persian)
10. Haddadi, F., M. Abd Aziz, G. Saleh, A. Abd Rashid and H. Kamaladini. 2010. Micropropagation of Strawberry *cv*. Camarosa: prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using thidiazuron with N6-benzylamino-purine. Horticulture Science, 45(3): 453-456.
11. Hasan, M.N., S. Nigar, M.A.K. Rabbi, S.B. Mizan and M.S. Rahman. 2010. Micropropagation of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). International Journal of Sustainable Crop Production, 5(4): 36-41.
12. Elmana, H.E.M., A.A. El Hassan and M.M.A. Elballa. 2003. In vitro propagation of strawberry (*Fraaaria ananassa* Duch.) Using Shoot Tip Explants. University of Khartoum Journal of Agricultural Sciences (Sudan). 11(3): 349-359.
13. Husaini, A.M. and D.K. Srivastava. 2006. Plant regeneration and agrobacterium-mediated gene transfer studies in strawberry tissues (*Fragaria ananassa* Duch.) Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences, 8: 671-678.
14. Jalili Marandi, R., L. Naseri1, M. Mohseniazer1, R. Hajitagiloo1 and M.R Marhamati1. 2011. Investigation on Interaction Effect of Benzyladenine and Chitosan on *in vitro* Proliferation of Strawberry (*Fragaria ananassa* cv. Selva). Agricultural Biotechnology, 10: 1. (In Persian)
15. Karhu, S. and K. Hakala. 2007. Micropropagated Strawberries on the field. Acta Horticulturae, 567: 321-324.
16. Karhu, S. and K. Hakala. 2002. Micropropagated strawberries on the field. Acta Horticulturae, 2: 182 pp.
17. Moradi, K., M. Otroshy and M.R. Azimi. 2011. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures. Journal of Agricultural Technology, 7(6): 1755-1763. (In Persian)
18. Mozafari, A.A. and M. Gerdakaneh.2012. Influence of media and growth regulators on regeneration and morphological characteristics of strawberry cvs Kurdistan and Merck (Fragaria x ananassa Duch.). International Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 4(5): 99-104. (In Persian)
19. O'Riordain, F. 1987. The effects of benzyladenine, indole butyric acid and gibberellic acid on the micropropagation of the strawberry cultivar Clonard. *In Vitro* Culture of Strawberry Plants, 47-53.
20. Rama Bhat, P., M. Kheroda Devi, H. Jayalaxmi, I. Sophia and P.S. Prajna. 2012. Effect of plant growth regulators on establishment and growth of strawberry (*Fragaria* X *ananassa* Duch.) var. chandler *in vitro*. Agricultural Science Research Journals, 2(12): 623-632.
21. Singh, A.K., A.K. Dubey and D. Vibha. 2004. Phenotipic stability of *in vitro* regenerated plants of strawberry (*Fragaria x ananassa*. Duch.). Progressive Horticulture, 36(1): 5-7.
22. Zobayer, N., S.H. Prodhan, S.U. Sikdar, F. Azim and M. Ashrafuzzaman. 2011. Study of Shoot Multiplication of Strawberry (Fragaria ananassa). International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology, 1(1&2), 69-72 pp.
23. Zebrowska, J.I., J. Czernas, J. Gawronski and J.A. Hortynski. 2003. Suitability of strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) microplants to the field cultivation. Food, Agriculture & Environment, 1: 190-193.

Effects of Different Growth Regulators on *In vitro* Direct Shoot Regeneration of Strawberry *cv.* Diamante (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Fariba Kojori[1], Ghafar Kiani[2], Ghorbanali Nematzadeh[3] and Yousef Ghasemi[4]

1- M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: f.kojori@yahoo.com)
2- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3 and 4- Professor and Instructor, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan
Received: December 7, 2013 Accepted: January 28, 2014

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 13:01 +0430 on Tuesday April 23rd 2019

Abstract

Strawberry is perennial, herbaceous plants belonging to the family of fragaria, with a rich source of vitamins and minerals. The aim of present study was to evaluate the effects of different concentrations of growth regulators including auxin and cytokinin to identify the best hormonal concentration to obtain the highest yield of *in vitro* produced plantlets from strawberry *cv* Diamante. Experiment was performed in a factorial experiment based on a completely randomized design, using the basal MS culture medium. In this experiment the effects of different concentrations of BA (0/2, 0/5, 1 and 2 mg/l) , IBA (0, 0/1 and 0/5 mg/l) and NAA (0, 0/1 and 0/5 mg/l) alone or in combination with each other for regeneration of shoot tip explants and NAA (0/2, 0/5 and 1 mg/l) and IBA (0/2 , 0/5 and 1 mg/l) for rooting were studied alone. Number and length of shoots and roots produced per explants were evaluated. Results showed that the highest number of regeneration obtained from MS medium included 1 mg/l BA. The highest shoot length was found in the combined treatment of BA and IBA (0/5 + 0/5) mg/l.The maximum rooting was observed in the 1/2 MS medium containing 0/2 mg/l NAA and the longest roots obtained from control treatment.

Keywords: Growth regulators, Regeneration, Rooting, Strawberry, Shoot