



## بررسی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر میزان باززایی مستقیم شاخصاره در شرایط درون (*Fragaria x ananassa* Duch.)

فریبا کجوری<sup>۱</sup>، غفار کیانی<sup>۲</sup>، قربانعلی نعمت‌زاده<sup>۳</sup> و یوسف قاسمی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسؤول: f.kojori@yahoo.com)

۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- ۴- استاد و مریب، 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 غلاظت تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سایتوكینین 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، ۰/۱، ۰/۰۵) میلی‌گرم در لیتر (NAA و IBA (صفر، ۰/۰، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با هم جهت باززایی ریزنمونه‌های نوک شاخصاره و IBA و NAA (۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) جهت ریشه‌زایی به طور جداگانه بررسی شدند. تعداد و طول شاخصاره‌های 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 شاخصاره در تیمار ترکیبی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA مشاهده شد. بیشترین میزان ریشه‌زایی در محیط کشت ۱/۲ MS حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و طویل‌ترین ریشه در تیمار شاهد مشاهده گردید.

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

### مقدمه

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 (۱۵، ۲۰، ۲۲). قسمت‌های مختلف گیاه توت‌فرنگی نظیر برگ، ساقه، مریستم انتهایی، ریشه، ساقه رونده و بخش‌های مختلف گل به طور موققیت‌آمیزی در ازدیاد شاخصاره در شرایط آزمایشگاهی بکار رفته است. در این میان، ریزنمونه نوک شاخصاره از پتانسیل بالایی جهت باززایی شاخه‌ها برخوردار می‌باشد. ظرفیت بالای ریزنمونه نوک شاخصاره جهت استفاده در باززایی درون شیشه‌ای توت‌فرنگی تاکنون توسط محققین مختلف نیز مطالعه شده است (۱۰، ۱۲، ۱۵). 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 به عنوان منبع اکسین در ترکیب با BA، TDZ و BAP به عنوان سایتوكینین به کار رفته‌اند. حسن و

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، انجاماد و فرآوری، میوه‌ای عامه‌پسند در سراسر جهان هستند. در میان بسیاری از ویژگی‌های مثبت، ارزش تغذیه‌ای توت‌فرنگی تقریباً کامل است. هشت عدد توت‌فرنگی متوسط، حاوی ویتامین C بیشتری نسبت به یک گیاه به طور عمومی به صورت 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 مقرر 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. کره و هاکالا (۱۵) اعلام کردند که توت‌فرنگی را می‌توان در

الکل اتیلیک ۷۰٪ و سپس هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن کلرید جیوه ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدغونی شدند. جهت حذف بقایای مواد ضدغونی کننده، ریزنمونه‌ها پس از هر بار ضدغونی ۳-۴ بار با آب ۲ بار تقطیر استریل، شستشو شدند. ریزنمونه‌ها پس از استریل سطحی، در ابتدا برای تولید شاخصاره در محیط کشت MS حاوی ۵٪ درصد زغال فعال همراه با ۵٪ میلی‌گرم بنزیل آدنین (BA) کشت شدند. کشت‌ها در اتفاق رشد تحت شرایط ۱۶ ساعت روشناختی و ۸ ساعت تاریکی در دمای  $25\pm 2$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از اینکه گیاهچه‌ها به حد کافی رشد کردند، نوک شاخصاره بهمراه یک تا دو برگ اولیه جدا شده و برای بهینه‌سازی محیط ریازادیادی رقم مربوطه، به محیط کشت MS همراه با تنظیم کننده‌های رشد بنزیل آدنین در ۴ سطح (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر) و ایندول بوتیریک اسید در ۳ سطح (صفرا، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و همچنین ۳ سطح از نفتالین استیک اسید (صفرا، ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. پس از گذشت ۴ هفته، تعداد شاخصاره‌های بازیابی شده و ارتفاع گیاهان، یادداشت برداری شد. به منظور ریشه‌زایی، گیاهان بدست آمده به محیط MS ۱/۲ با ۳ سطح متفاوت از ایندول بوتیریک اسید (۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید (۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ 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) و سایتوکینین (NAA) در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شدند. اثرات متقابل میان اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها بر صفات اندازه‌گیری شده متفاوت بوده به طوری که اثر متقابل آنها برای صفت طول شاخصاره در سطح یک درصد معنی دار بوده اما برای تعداد شاخصاره بازیابی شده تفاوت معنی داری نشان نداد (جدول ۱).

همکاران (۱۱) بازیابی شاخصاره 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 بازیابی شاخصاره در توت‌فرنگی را با استفاده از محیط کشت MS حاوی BA و همچنین در ترکیب با کینتین گزارش کردند (۲۰، ۱۷، ۱۱). گردانه و همکاران (۹) با بررسی روی سه رقم توت‌فرنگی دریافتند که BA بهترین سبب بازیابی بهتر شاخصاره در همه ارقام می‌گردد. بررسی‌های جلیلی مرندي 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 پلامترهای 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 تنظیم کننده‌های 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 بهتری داشته است. این نتایج نشان می‌دهد که بازیابی گیاهچه بسته به گونه و رقم بسیار متفاوت و پروتکل بازیابی 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 غلط‌ت از تنظیم کننده‌های رشد جهت تعیین پروتکل ریازادیادی 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 شاخصاره‌های 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

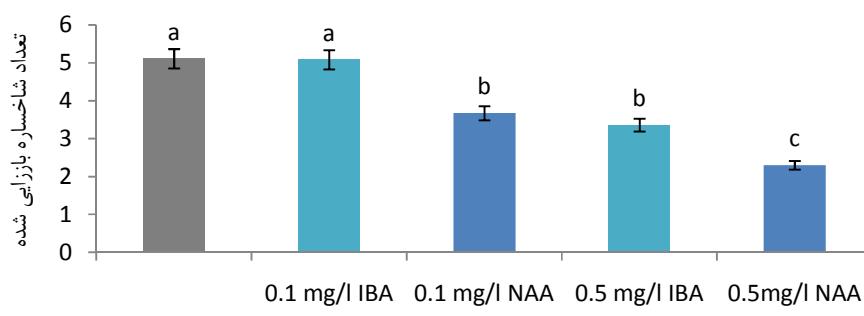
منابع تغییرات	جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی تحت تأثیر تیمارهای ترکیبی سایتوکینین و اکسین
میانگین مربعات	درجه آزادی
تعداد شاخصاره	طول شاخصاره
BA	۳
IBA,NAA	۴
BA × IBA,NAA	۱۲
خطای آزمایشی	۴۰
ضریب تغییرات	۲۲/۹
ns	۰/۷۸
**	۷/۴۸**
ns	۱۷/۳۲**
ns	۱/۴۸ns
*	۱۵/۶**
ns	۷۵۵/۳**
ns	۷۰/۵۲**
ns	۳/۶۲
ns	۹/۲

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

داده شده است. صرف‌نظر از اثر BA، مقایسه میانگین اثرات ساده NAA و IBA نشان می‌دهد که حضور اکسین جهت بازیابی 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 شاخصاره‌های بازیابی شده کاهش یافت.

### مرحله پرآوری شاخه

همان‌طور که در جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشاهده شد، اثرات متقابل هورمون‌های سایتوکینین و اکسین برای صفت تعداد شاخصاره معنی‌دار نبوده است. به همین دلیل، به منظور مقایسه میانگین صفت موردنظر، به بررسی جدایانه اثرات ساده سایتوکینین و اکسین‌ها پرداخته شد. اثر غلظت‌های مختلف IBA و NAA بر تعداد شاخصاره‌های بازیابی شده در (شکل ۱) نشان

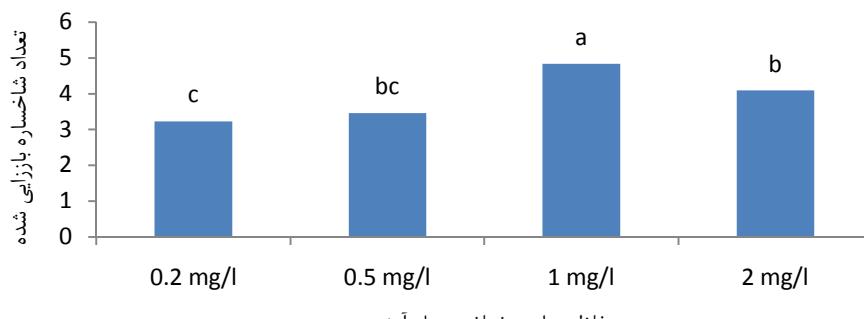


غلظت‌های مختلف اکسین

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

است و در غلظت‌های پایین‌تر و بالاتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر، تعداد شاخصاره‌های بازیابی شده کاهش یافت (شکل ۲).

در مقایسه سطوح مختلف بنزیل آدنین، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر با میانگین ۴/۸۴ عدد شاخصاره در هر ریزنمونه، بیشترین تأثیر را بر بازیابی شاخصاره‌ها داشته



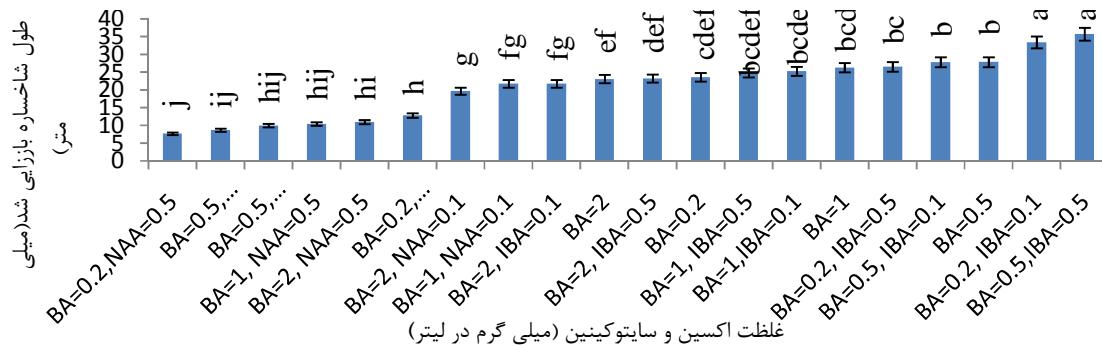
غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین

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

از نظر طول شاخصاره با بهترین محیط کشت از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت. بیشترین طول شاخصاره در تیمار ترکیبی BA و IBA  $0/5 + 0/5$  میلی گرم در لیتر) و کمترین طول شاخصاره در تیمارهای ترکیبی BA و NAA  $0/5 + 0/2$  میلی گرم در لیتر) بدست آمد. با افزایش غلظت BA از  $0/5$  به  $2/0$  میلی گرم در لیتر، طول شاخصاره ها کاهش یافت. از طرفی همانطور که در (شکل ۳) مشاهده می شود هورمون IBA نسبت به هورمون NAA، در افزایش طول شاخصاره های بازیابی شده مؤثرتر بود که نشان دهنده تأثیرات متفاوت اکسین ها بر ریزنمونه می باشد (شکل ۳).

### طول شاخصاره بازیابی شده

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثرات ساده اکسین و سایتوکینین و همچنین اثرات متقابل آنها بر طول شاخصاره های بازیابی شده در سطح یک درصد، معنی دار شده است. نتایج مقایسه میانگین BA و اکسین نشان می دهد که ترکیبات تیماری مختلف اثرات متفاوتی بر طول شاخصاره های بازیابی شده داشتند (شکل ۴).<sup>۳</sup> هفته پس از کشت، بیشترین طول شاخصاره  $40\text{ mm}$  در غلظت  $0/5$  میلی گرم بر لیتر BA و  $0/5$  میلی گرم بر لیتر IBA بدست آمد. با این حال، ترکیب تیماری  $2/0$  میلی گرم بر لیتر BA در ترکیب با  $1/0$  میلی گرم بر لیتر IBA با میانگین  $33/47$  میلی متر،



شکل ۳- اثر متقابل غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد بر طول شاخصاره بازیابی شده میانگین هایی که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای اختلاف معنی دار نمی باشند.

برای مدت ۴ هفته، منتقل شدند. نمونه های شاهد در محیط MS  $1/2$  فاقد تنظیم کننده های رشد قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس نشان می دهد که اثر ساده اکسین ها (NAA ، IBA) بر تعداد و طول ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی دار شده است (جدول ۲).

### مرحله ریشه زایی

گیاهان بدست آمده از مرحله بازیابی، به منظور ریشه زایی به محیط MS  $1/2$  با  $3$  سطح متفاوت از ایندول بوتیریک اسید ( $0/2$ ،  $0/5$  و  $1$  میلی گرم در لیتر) و نفتالین استیک اسید ( $0/2$ ،  $0/5$  و  $1$  میلی گرم در لیتر)

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد ریشه	طول ریشه	میانگین مربعات
IBA, NAA	۶	۱۲/۹۷	$477/83^{\circ}$	$477/83^{\circ}$
خطای آزمایشی	۱۴	۰/۶۶	۵/۹۲	۵/۹۲
ضریب تغییرات		۹/۶	۹/۸	۹/۸

\*\*: معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد.

میلی گرم در لیتر IBA با میانگین  $6$  عدد ریشه در هر نمونه، کمترین ریشه زایی را داشت. طویل ترین ریشه از گیاهان کشت شده در محیط کشت MS  $1/2$  فاقد هورمون (شاهد) با میانگین  $39/90$  میلی متر بدست آمد (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین مؤید آن است که غلظت و نوع اکسین، اثرات متفاوتی روی تعداد و طول ریشه تولید شده دارند. بیشترین ریشه زایی در محیط کشت MS  $1/2$  شامل  $0/2$  میلی گرم در لیتر NAA با میانگین  $12/4$  عدد ریشه مشاهده شد و محیط کشت MS  $1/2$  حاوی  $1$

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

تنظیم‌کننده‌های رشد	تعداد ریشه	طول ریشه	
.	۹/۵۶۷ <sup>b</sup>	۳۹/۹۰ <sup>a</sup>	IBA (mg/l)
۰/۲	۷/۱۶۷ <sup>c</sup>	۳۵/۸۷ <sup>a</sup>	
۰/۵	۸/۶۶۷ <sup>b</sup>	۲۷/۸۷ <sup>b</sup>	
۱	۶۰ <sup>c</sup>	۲۲/۴۰ <sup>c</sup>	NAA (mg/l)
۰/۲	۱۲/۴۰ <sup>a</sup>	۳۱/۲۳ <sup>b</sup>	
۰/۵	۹/۲۵۰ <sup>b</sup>	۹/۶۷ <sup>a</sup>	
۱	۶/۷۶۷ <sup>c</sup>	۶/۷۷ <sup>d</sup>	

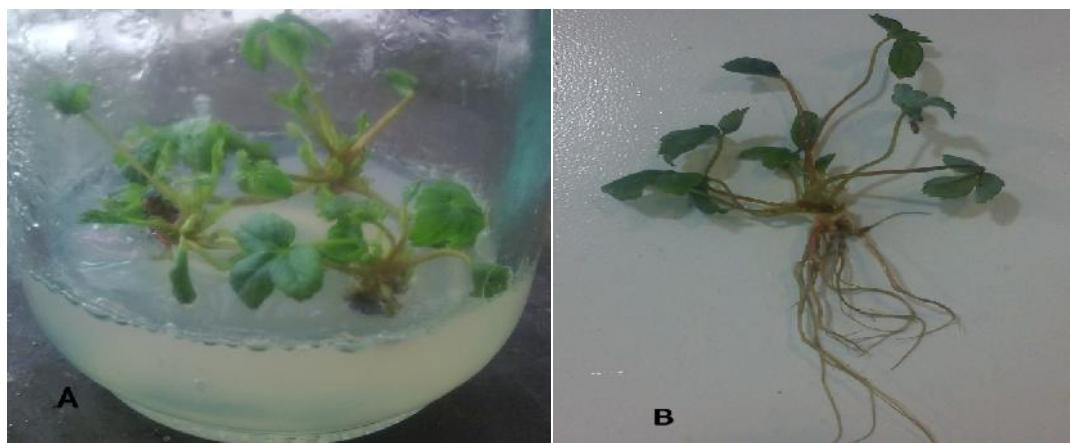
میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

بازیابی شده است. واکنش متفاوت برخی از ارقام توت فرنگی به هورمون‌های رشد مورد استفاده در محیط کشت، ممکن است به تفاوت ژنتیک‌ها و وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه‌ها نسبت داده شود. بازیابی 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 سایتوکینین‌بازیابی شاخصاره‌های بازیابی شده نشان داد که بیشترین طول شاخصاره در تیمار ترکیبی BA و IBA (۰/۵ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) و کمترین طول شاخصاره در تیمارهای ترکیبی BA و NAA (۰/۵ + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد. با افزایش غلظت BA از ۰/۵ به ۲ میلی‌گرم در لیتر، طول شاخصاره‌ها کاهش یافت. بر اساس یافته‌های چین ینگ و همکاران (۵)، غلظت پایین BA طول شاخصاره را افزایش داده، اما موجب کاهش تشکیل تعداد شاخصاره می‌گردد، و با افزایش غلظت BA در محیط کشت، علی‌رغم کاهش ارتفاع، تعداد شاخصاره افزایش می‌یابد. مرادی و همکاران (۱۷) گزارش کردند زمانی که BA همراه با IBA در محیط بکار رفت، میزان تکثیر شاخصاره‌ها در هر ریزنمونه کاهش یافت اما شاخصاره‌ها طویل‌تر شدند. بنابراین می‌توان گفت در تیمارهایی که تعداد شاخه‌های بازیابی شده بیشتر است بدلیل استفاده آنها از هورمون‌ها و مواد غذایی موجود در محیط کشت، شاخه‌های بازیابی شده در این محیط‌ها، رشد کمتری دارند. مقایسه اثر اکسین‌ها بر صفات 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 ۱/۲ MS 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.

نتایج این بررسی نشان داد که کاربرد هورمون BA به تنها‌یابی در مقایسه با تیمار ترکیبی BA و اکسین، موجب بازیابی بیشتری در ریزنمونه‌ها می‌شود. به عبارت دیگر، در محیط‌های کشت فاقد اکسین که حاوی غلظت‌های مختلفی از BA (۰/۲، ۰/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بودند، بیشترین شاخصاره 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 شاخصاره‌ها، سبب افزایش تعداد شاخصاره می‌شود. در گزارش ایمارا (۸) آمده است که BA در رشد توت فرنگی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به Kin و TDZ مؤثرتر است. سایتوکینین‌ها در گیاهان باعث اندامزایی و تسريع در تقسیم سلولی می‌شوند. در مقایسه سطوح مختلف BA مشخص شد که بیشترین تعداد شاخصاره در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر با تولید متوسط ۴/۸۴ عدد شاخصاره در هر ریزنمونه بدست آمد و در غلظت‌های کمتر و بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر تعداد شاخصاره‌ها کاهش یافت (شکل A-۴). بر اساس گزارش اوریورداین (۱۹)، استفاده بیش از اندازه BA در محیط کشت، برای رشد شاخصاره‌ها مضر بوده و شرایط کشت را نامناسب می‌کند. برخی از محققین نیز غلظت بالای سایتوکینین را موجب کاهش تعداد شاخصاره‌های بازیابی شده دانستند (۱۰،۱۱،۲۲). در رقم مورد بررسی، حضور اکسین در محیط کشت بازیابی اثر منفی داشته و برخلاف بسیاری از تحقیقات صورت گرفته در ارقام دیگر توت فرنگی، نیازی به افزودن اکسین در مرحله بازیابی نیست. حضور اکسین‌ها بطورکلی برای رشد و بازیابی 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 تحت تأثیر قرار می‌دهد. این احتمال وجود دارد که میزان اکسین داخلی رقم دیامانت بالا بوده، بنابراین، افزودن اکسین به محیط درون شیشه‌ای موجب کاهش میزان

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. سریوستاو 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 ۱/۲ MS فاقد هورمون از نظر تولید تعداد و طول ریشه نسبت به تیمارهای هورمونی NAA و IBA، مطلوب تر است که با بررسی‌های دیبات (۶) که نشان داد محیط MS بدون هورمون ریشه‌های مناسبی برای سازگاری گیاه توت فرنگی تولید می‌کند مطابقت دارد (شکل ۴).

افزایش غلظت IBA و NAA از ۰/۰ به ۱ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش تشکیل ریشه و افزایش القای کاللوس 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 کاللوس در حضور IBA و NAA ممکن است باعث جلوگیری از طویل شدن ریشه شود زیرا کاللوس 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



شکل ۴- اثرات تنظیم کننده‌های رشد روی بازیابی شاخساره و القای ریشه در توت فرنگی رقم دیامانت. (A) گیاهان بازیابی شده از رقم دیامانت ۴ هفته پس از کشت در محیط MS محتوى 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.

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 ۱/۲ MS حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالین 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 بازیابی 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.

در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف BA (۰/۰۲)، ۰/۰۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، IBA (صفرا، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (صفرا، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) در ترکیب با یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین غلظت‌های IBA (۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر) برای بررسی ریشه‌زایی بکار گرفته شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان بازیابی 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 بازیابی اثر منفی داشته و برخلاف بسیاری از تحقیقات صورت گرفته در ارقام دیگر توت فرنگی، نیازی به افودن اکسین در مرحله بازیابی نیست. بیشترین طول شاخساره (۳۵/۷۷ mm) در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA بدست

## منابع

- 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.
- Bagheri, A. and M. Saffari. 1997. In vitro culture of Higher Plants. Ferdowsi University of Mashhad press, 406 pp. (In Persian)
- Bhatt, I.D. and U. Dhar. 2000. Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 60: 83-88.
- 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.
- 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.
- Debnath, S.C. 2005. Strawberry sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. *In Vitro Cell*, 41: 671-676.
- Driscoll, S. 2004. <http://www.driscolls.com/strawberries/nutrition.html>
- Emarah. 2008. Factors affecting propagation of strawberry (*Fragaria spp.*) through tissue cultures. International Journal of Product Development, 13(1): 191-212.
- 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)
- 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.
- 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.
- Elmania, H.E.M., A.A. El Hassan and M.M.A. Elballa. 2003. In vitro propagation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) Using Shoot Tip Explants. University of Khartoum Journal of Agricultural Sciences (Sudan). 11(3): 349-359.
- 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.
- Jalili Marandi, R., L. Naseri1, M. Mohseniazer1, R. Hajitaglioo1 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)
- Karhu, S. and K. Hakala. 2007. Micropagated Strawberries on the field. Acta Horticulturae, 567: 321-324.
- Karhu, S. and K. Hakala. 2002. Micropagated strawberries on the field. Acta Horticulturae, 2: 182 pp.
- Moradi, K., M. Otrosy and M.R. Azimi. 2011. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures. Journal of Agricultural Technology, 7(6): 1755-1763. (In Persian)
- 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)
- O'Riordan, 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.
- 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.
- Singh, A.K., A.K. Dubey and D. Vibha. 2004. Phenotypic stability of *in vitro* regenerated plants of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Progressive Horticulture, 36(1): 5-7.
- 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.
- 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<sup>1</sup>, Ghafar Kiani<sup>2</sup>, Ghorbanali Nematzadeh<sup>3</sup> and Yousef Ghasemi<sup>4</sup>**

---

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

---

### **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