نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱ ، ص. ۴۲۴-۴۱۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 26, No. 4, Winter 2013, P. 417-424
ISSN: 2008 - 4730

اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA بر جنین زائی رویشی توت فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch.)

محمد گردکانه[۱]- علی اکبر مظفری[۲*]- ابوالمحسن حاجی امیری[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۹/۲۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۶/۷

چکیده

پژوهش حاضر به منظور مطالعه اثر غلظت‌های مختلف تو، فور-دی (2,4-D) و بنزیل آدنین (BA) بر القاء، توسعه و بلوغ جنین انجام شد. برای این منظور ریز نمونه اندام‌های رویشی پهنک برگ، دمبرگ و گره و اندام‌های زایشی جوانه گل و پرچم ارقام کردستان، پاروس و کامارسا بر روی محیط کشت MS حاوی 2,4-D در چهار غلظت مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر به تنهائی یا همراه با BA در سه غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر به همراه شاهد بدون BA، کشت شدند. نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه و رقم قویا بر روی القاء، توسعه و بلوغ جنین موثر می باشند. همه ریزنمونه ها به استثنای ریزنمونه‌های دمبرگ و پرچم در همه تیمارهای هورمونی کالوس جنین زا تولید نمودند. بیشترین تعداد جنین‌های کروی در محیط حاوی ۱ میلی گرم 2,4-D و ۰/۲۵ میلی گرم BA حاصل شد. بالاترین درصد توسعه جنین‌های کروی به جنین‌های لپه ای در محیط حاوی ۰/۵ میلی گرم 2,4-D و ۰/۲۵ میلی گرم BA ثبت شد. در بین انواع ریزنمونه ها و ارقام، بیشترین تعداد جنین‌های کروی و بیشترین درصد توسعه جنین‌های کروی به جنین‌های لپه ای در ریزنمونه پهنک برگ و رقم پاروس تعلق داشت.

واژه‌های کلیدی: توت فرنگی، جنین زایی رویشی، ریزنمونه، تنظیم کننده‌های رشد

مقدمه

جنین زایی رویشی که از طریق کشت این ویترو بدست می آید، نسبت به اندام زایی معمولی، دارای چندین مزیت است (۳۱). جنین‌های رویشی با توجه به وجود آغازین‌های توسعه یافته ریشه و شاخه، بدون یک مرحله اضافی ریشه زایی، شروع به جوانه زنی می کنند و به راحتی گیاهچه تولید می نمایند (۱۶). جنین‌های رویشی از جنبه‌های مختلفی، شبیه جنین‌های زیگوتی می باشند (۴) و می توان با استفاده از آنها جنبه‌های گوناگون مرتبط با فرآیند جنین زایی زیگوتی را مورد مطالعه قرار داد. همچنین جنین زایی رویشی نقش مهمی در تکثیر رویشی ایفا می کند، و هنگامی که با برنامه‌های اصلاح نبات کلاسیک و مولکولی تلفیق شود یک ابزار با ارزشی را برای بهبود خصوصیات ژنتیکی گونه‌های گیاهی تجاری فراهم می نماید (۲۸).

در میان سیگنال هایی که به طور مستقیم در تنظیم مراحل مختلف جنین زائی شرکت می کنند، هورمون‌های گیاهی مهمترین نقش را دارند. در جنین زایی رویشی اغلب از اکسین مصنوعی 2,4-D استفاده می شود. این تنظیم کننده رشد، نقش کلیدی در القاء جنین زایی رویشی دارد. زیرا 2,4-D موجب بیان ژن‌های مربوط به تنش می شود و سایر محرک‌های جنین زایی را نیز تحریک می کند (۹، ۱۳ و ۲۶). 2,4-D می تواند از طریق فعالیت اکسینی قوی اش با نفوذ و تاثیر گذاری در متابولیسم درونی سایر فیتوهورمون ها، جنین زایی رویشی را به طور مستقیم یا غیرمستقیم تنظیم کند (۴).

در بیشتر مواردی که سیتوکنین ها در القاء جنین زایی رویشی نقش داشته اند، همراه با اکسین به محیط کشت افزوده شده اند (۵). در این مرحله، بازدارنده‌های سیتوکنین، به شدت مانع جنین زایی رویشی سلول‌های اپیدرمی در هویج می شود (۲۹). سیتوکنین ها در مراحل بسیار اولیه جنین زایی رویشی، نظیر تشکیل توده سلول جنینی نقش دارند، بنابراین نقش آنها در تقسیم سلولی بیشتر از تمایز یابی جنین است (۲).

در توت فرنگی جنین زائی بسیار مشکل است و تا کنون مطالعات کمی در خصوص جنین زایی رویشی توت فرنگی صورت گرفته است

۱و۳- محقق و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه
۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان
(*- نویسنده مسئول: Email: amozafari@uok.ac.ir)

(۳) و بعضی از مشکلات تکنیکی آن هنوز مرتفع نشده است (۱۸) و پژوهش ها در خصوص جنین زائی رویشی توت فرنگی هنوز در مرحله اولیه است و تلاش‌های بیشتری به منظور توسعه این فن آوری مورد نیاز خواهد بود (۱ و ۸). این مطالعه می تواند زمینه تولید گیاهان تراریخت، گزینش در شرایط این ویترو، تولید بذرهای مصنوعی و حفظ ژرم پلاسم را فراهم کند. بنابراین این تحقیق به منظور تعیین مناسب ترین غلظت، نوع تنظیم کننده‌های رشد و ریزنمونه اندام‌های مختلف جهت بهبود کارائی جنین زائی رویشی توت فرنگی اجرا شد.

مواد و روش ها

این تحقیق به منظور بررسی جنین زایی رویشی توت فرنگی در سال ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه کردستان اجرا شد. براین اساس ریزنمونه‌های پهنک برگ، گره، دمبرگ، پرچم و جوانه گل ارقام کردستان، پاروس و کامارسا، جهت تولید کالوس بر روی محیط کشت MS همراه با ۴ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA) کشت شدند. پس از ۲۸ روز کالوس حاصل از این ریزنمونه ها به محیط کشت MS حاوی ۰/۸٪ آگار و pH = ۵/۸، ۳ درصد ساکارز و ترکیبات هورمونی 2,4-D در چهار غلظت مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱و ۲ میلی گرم در لیتر همراه با BA در سه غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر به همراه شاهد بدون BA، منتقل شدند. برای این منظور در هود لامینار و در شرایط استریل محیط کشت ها به مقدار ۲۵ میلی لیتر در هر پتری دیش با قطر ۱۰ سانتی متر توزیع شدند. پس از سرد و ژله ای شدن محیطهای کشت درون پتری دیش، کالوس اولیه اندام‌های مختلف با وزن حدود ۵۰ میلی گرم بر روی محیط کشت منتقل گردیدند. در هر پتری دیش ۵ تا ۶ کالوس کشت گردید.

به منظور جنین زایی، کشت ها در اتاقک رشد و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. هر ۴ هفته کالوس ها در محیط کشت‌های با ترکیب هورمونی قبلی واکشت شدند. در طی این مرحله از جنین زایی، تغییرات مورفولوژیکی کالوس ها، درصد کالوس‌های که تولید جنین نموده و تعداد جنین‌های مرحله کروی یادداشت برداری و ثبت گردید. سپس کالوس‌های دارای جنین کروی در محیط کشت‌های با ترکیب هورمونی قبلی واکشت شدند و تعداد جنین ها در مرحله قلبی، نیزه ای و مرحله لپه ای در هر کالوس شمارش و ثبت شد. در طی مرحله جنین زایی، تعداد جنین‌های رویشی تولید شده در مراحل کروی، قلبی، اژدری شکل و کوتیلدونی، با استفاده از دستگاه استرئومیکروسکوپ، شمارش و عکس‌برداری شدند.

جوانه زنی جنین‌های رویشی

برای جوانه زنی جنین‌های رویشی، جنین‌های رویشی مرحله لپه ای به محیط کشت پایه MS حاوی ۳**درصد** ساکارز و ۱ میلی گرم در لیتر GA_3 انتقال داده شدند و در اتاقک رشد در شرایط نور ۱۶ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

سازگار کردن گیاهچه ها

گیاهچه‌های ریشه دار شده ارقام کردستان، پاروس و کامارسا را به دقت از محیط کشت جدا سازی نموده و به تدریج با آب یک بار تقطیر ملایم جهت حذف بقایای محیط کشت چسبیده به ریشه ها شسته شدند و در محلول ۱ درصد قارچ کش به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قبل از انتقال، ضدعفونی شده و به سینی‌های کشت با ترکیب پرلایت و پیت به نسبت ۲به۱ انتقال داده شدند و این گیاهان به مدت ۲ هفته در اتاقک رشد در دمای ۱ ± ۲۰ درجه سانتی گراد، با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی، با رطوبت نسبی ۹۰ درصد نگهداری گردیدند. سپس آنها را به گلدان‌های پلی اتیلن سیاه رنگ حاوی خاک زراعی، پیت و ماسه استریل به نسبت ۱:۱:۱ منتقل نموده و در گلخانه با رطوبت نسبی ۷۵ تا ۸۰ درصد نگهداری شدند. برای جلوگیری از دست دادن سریع رطوبت، گیاهان کشت شده در گلدان با کیسه‌های پلی اتیلن شفاف پوشانده شدند. بعد از ۲ هفته گوشه بالایی کیسه پلی اتیلن بریده شد و رطوبت نسبی گلخانه تا ۶۰ درصد کاهش یافت تا گیاهان به تدریج در معرض شرایط محیطی بیرون قرار بگیرند.

در این تحقیق داده‌های حاصل از یادداشت برداری صفات مختلف بر اساس روش آماری فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار تجزیه گردید. مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. برای تجزیه‌های آماری از نرم افزارهای SAS استفاده گردید.

نتایج و بحث

پس از واکشت کالوس‌های ریزنمونه پهنک برگ، گره، دمبرگ، پرچم و جوانه گل حاصل از محیط کشت MS حاوی ۴ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA)، به محیط کشت‌های مورد استفاده (جداول ۲و۴) القاء کالوس جنین زا بعد از ۸ هفته مشاهده شد. تشکیل کالوس‌های جنین زا با توجه به نوع ریزنمونه متفاوت بود. در بین اندام‌های مختلف، کالوس ریزنمونه پهنک برگ، گره و جوانه گل، کالوس جنین‌زای بیشتری تولید نمودند. در مقابل کالوس‌های جنین زا در ریزنمونه پرچم و دمبرگ در تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌های

رشد مورد مطالعه تشکیل نشد بنابراین از تجزیه آماری آنها صرف نظر گردید.

جنین‌های کروی ۱۴ تا ۲۱ روز پس از انتقال کالوس‌های جنین‌زا به محیط کشت بر روی آنها تشکیل شد ولی تمام قسمت‌های کالوس‌های جنین زا قابلیت تولید جنین کروی نداشتند. جنین‌های لپه ای، ۲۱ تا ۲۸ روز پس از واکشت کالوس‌های دارای جنین کروی، توسعه یافتند. بر روی برخی جنین‌های اولیه جنین‌های ثانویه تشکیل شد و مراحل مختلف جنین زایی رویشی به طور همزمان بر روی یک کالوس مشاهده نشد این امر نشان می دهد که جنین زایی رویشی در توت فرنگی یک پدیده غیر همزمان است (شکل۱- پ). گزارش شده که اگر چه همه سلول ها بطور مساوی قابلیت جنین زائی دارند ولی تعداد جنین‌های تشکیل شده در مقایسه با تعداد سلول‌های توده سلولی، بسیار ناچیز است و بخش محدودی از سلول ها، تشکیل جنین‌های رویشی می دهند. یک همبستگی بین نوع سلول و قابلیت جنین زایی وجود دارد و مناطق خاصی از توده سلولی، قابلیت جنین زایی رویشی را دارند (۱۴، ۲۶ و ۳۰).

نقش تنظیم کننده‌های رشد بر جنین زائی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان می دهد که بین سطوح مختلف غلظت‌های 2,4-D از نظر درصد تشکیل کالوس جنین زا، تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه و درصد تشکیل جنین‌های لپه ای اختلاف بسیار معنی داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. نتایج نشان داد که همه تیمارهای تنظیم کننده رشد در انواع ریزنمونه ها به استثنای ریزنمونه پرچم و دمبرگ، کالوس‌های جنین زا و جنین‌های مرحله کروی شکل تولید نمودند.

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۲) نشان می دهد که بین سطوح مختلف غلظت‌های 2,4-D اختلاف معنی داری ($P<۰/۰۵$) از نظر درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه وجود داشت. بر اساس نتایج به دست آمده، 2,4-D در القاء کالوس جنین زا و تشکیل جنین‌های کروی ریزنمونه ها مناسب بود. 2,4-D با فعالیت اکسینی قوی خود می تواند با نفوذ و تاثیر گذاری در متابولیسم درونی سایر فیتوهورمون ها، جنین زایی رویشی را به طور مستقیم یا غیرمستقیم تنظیم کند (۴). با افزایش غلظت این تنظیم کننده رشد تا ۱ میلی گرم در لیتر، درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه نیز افزایش یافت به نحوی که حداکثر درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر این تنظیم کننده رشد حاصل شد. در رابطه با همین موضوع مشاهده شده که القاء و تکامل جنین‌های رویشی گیاهان فقط در محدوده مشخصی از غلظت2,4-D انجام می‌گیرد (۱).

اگر چه 2,4-D قادر به القای کالوس جنین زا و جنین‌های مرحله کروی است اما غلظت بالای آن بازدارنده این صفات بود. با افزیش غلظت این تنظیم کننده رشد بیش از ۱ میلی گرم موجب کاهش درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه شد (جدول۲). به نظر می رسد ایجاد یک شیب اکسین برای ایجاد تقارن دو طرفه طی مراحل اولیه جنین زایی لازم باشد (۲۷).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر جنین زائی رویشی ریزنمونه‌های مختلف ارقام توت فرنگی (کردستان، پاروس و کامارسا)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)		
		درصد تشکیل کالوس‌های جنین زا	تعداد جنین‌های کروی در هر ریزنمونه	درصد تشکیل جنین های لپه ای
رقم	۲	۳۰۸/۸۱**	۳/۵۶**	۵۰/۴۱*
ریزنمونه	۲	۱۷۰۶/۹۴**	۱۱/۴۹**	۹۱۳/۵۸**
2,4-D	۳	۵۶۰۷/۹۵**	۴۲/۰۰**	۱۷۵۰/۷۶**
ریزنمونه× رقم	۴	۴۱/۸۷**	۰/۶۵**	۲۰/۳۹**
2,4-D × رقم	۶	۱۴۹/۸۰**	۰/۶۷**	۲۸/۱۷**
2,4-D × ریزنمونه	۶	۳۵۷/۵۳**	۳/۵۲**	۹۴/۵۹**
2,4-D × ریزنمونه× رقم	۱۲	۳۲/۳۸**	۰/۲۰**	۳۱/۵۲**
خطای آزمایش	۱۰۸	۲/۲۶	۰/۰۲	۱/۵۱
CV	–	۴/۹۷	۶/۴۴	۳/۹۲

*و **: بترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ ، ns = عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری

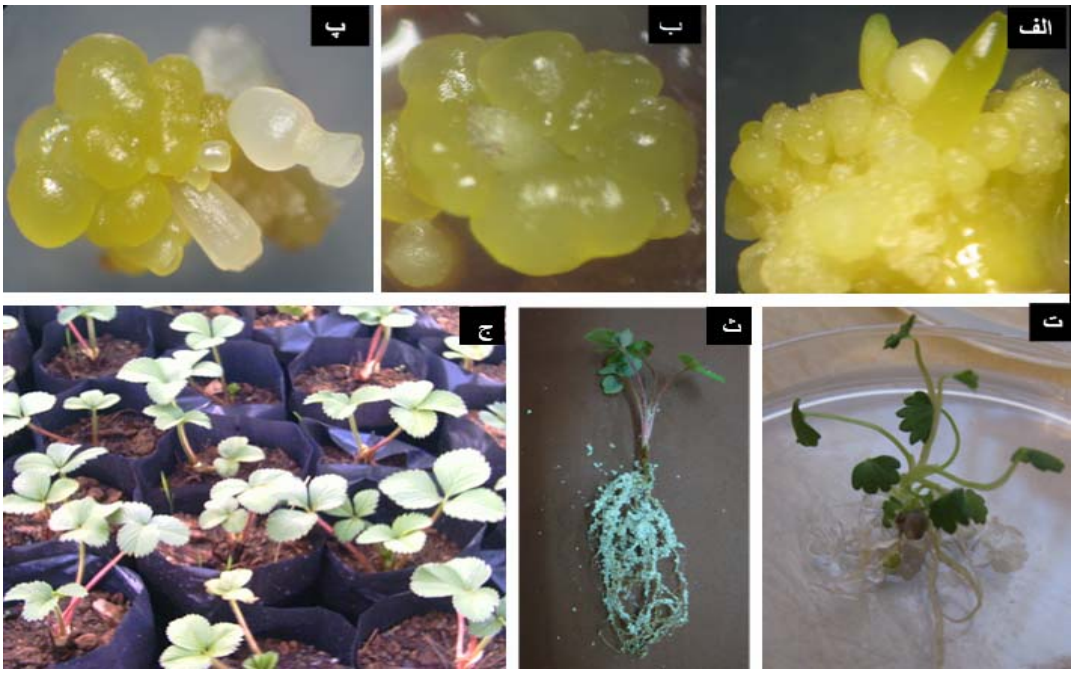
جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر جنین زائی رویشی ریزنمونه‌های مختلف ارقام توت فرنگی (کردستان، پاروس و کامارسا)

2,4-D (mg/l)	درصد تشکیل کالوس‌های جنین زا			تعدادجنین کروی در هر ریزنمونه			درصد تشکیل جنین‌های لپه ای		
	کردستان	پاروس	کامارسا	کردستان	پاروس	کامارسا	کردستان	پاروس	کامارسا
ریزنمونه برگ									
۰/۲۵	۲۲/۰۰qrs	۱۸/۵۰t	۱۹/۵۰st	۰/۵۷t	۱/۲۰q	۱/۴۲p	۳۸/۰۲e	۴۲/۹۲c	۳۹/۷۲de
۰/۵	۳۱/۷۵l	۳۷/۸۲gh	۳۰/۰۰m	۱/۶۵o	۳/۴۰e	۲/۸۵g	۴۲/۸۰c	۴۹/۰۰a	۴۴/۷۰b
۱	۵۶/۵۰c	۶۷/۰۰a	۶۲/۵۰b	۴/۲۰c	۴/۸۷b	۵/۱۵a	۳۴/۳۲fg	۳۵/۱۰f	۳۱/۹۷hi
۲	۳۷/۰۰hi	۲۸/۲۵mn	۳۳/۰۰kl	۲/۲۰jk	۲/۰۵klm	۲/۴۰hi	۲۹/۸۵j	۲۶/۹۵lmn	۲۰/۵۷st
ریزنمونه گره									
۰/۲۵	۱۳/۷۵uv	۲۱/۵۰rst	۱۲/۰۰v	۰/۸۵rs	۱/۱۵q	۰/۷۰st	۳۲/۱۵hi	۲۸/۷۵jkl	۲۷/۷۰klm
۰/۵	۲۴/۷۵op	۳۸/۵۰fg	۳۲/۷۵kl	۱/۹۵mn	۲/۸۷g	۲/۵۷h	۳۹/۶۲de	۴۰/۲۲d	۴۲/۱۵c
۱	۴۲/۵۰e	۴۸/۰۰d	۳۸/۵۰fg	۳/۲۰f	۴/۲۷c	۳/۷۲d	۲۸/۹۰jk	۲۹/۱۲jk	۲۵/۶۷no
۲	۲۴/۲۵pq	۲۰/۹۵st	۲۲/۸۰qr	۱/۸۵no	۲/۰۷klm	۲/۲۰gk	۲۰/۰۰t	۲۲/۱۲qrs	۱۷/۸۷u
ریزنمونه جوانه گل									
۰/۲۵	۱۲/۵۰uv	۱۹/۵۰st	۱۵/۰۰u	۰/۸۷rs	۰/۹۵r	۰/۸۵rs	۲۶/۶۷mno	۳۱/۹۲hi	۲۸/۹۲jk
۰/۵	۲۱/۵۰rst	۳۴/۲۵jk	۲۸/۷۵mn	۱/۳۲pq	۱/۶۷o	۱/۸۵no	۳۲/۸۷gh	۳۵/۹۵f	۳۰/۵۰ij
۱	۳۰/۷۵m	۴۱/۰۰ef	۳۵/۲۵hi	۲/۰۵klm	۲/۵۷h	۲/۲۵ij	۳۰/۰۲j	۲۲/۶۰qr	۲۹/۲۷jk
۲	۲۶/۰۰no	۲۳/۲۵pqr	۱۸/۷۵t	۲/۱۵kl	۱/۹۷lmn	۱/۸۰no	۲۴/۹۷op	۲۱/۳۲rst	۲۳/۳۲pq
میانگین	۲۸/۶۰	۳۳/۲۱	۲۹/۰۶	۱/۹۰	۲/۴۲	۲/۳۱	۳۱/۶۸	۳۲/۱۶	۳۰/۲۰

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر صفت ارزیابی شده، بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

هنگامی که جنین‌های مرحله کروی در محیط‌های کشت قبلی زیر کشت شدند پس از ۲۱ تا ۲۸ روز به مرحله لپه ای توسعه و نمو پیدا کردند. درصد جنین‌های مرحله کروی که در غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد به مرحله لپه ای نمو یافته اند درجداول ۲ و ۴ نشان داده شده است. در طی واکشت، جنین‌های کروی به جنین‌های لپه ای توسعه یافتند و در همان محیط کشت بلوغ جنین محقق شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که محیط کشت‌های مختلف اثرات متنوعی بر نمو و بلوغ جنین‌های رویشی و رسیدن آنها به مرحله لپه‌ای دارند. تنظیم کننده‌های رشد به عنوان القاء کننده‌های جنین‌زایی رویشی عمل می کنند و برای حصول جنین زائی مطلوب، ترکیب تنظیم کننده‌های رشد مهمترین نقش را ایفا می کنند (۱و۲۳). غلظت‌های مختلف 2,4-D اثرات معنی داری بر تعداد جنین‌های رویشی بالغ داشتند. برای بلوغ جنین رویشی محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم 2,4-D موثرترین غلظت بود. به نحوی که بیشترین تعداد جنین مرحله لپه ای در این محیط کشت تشکیل شد (جدول ۲ و شکل۱ ج). 2,4-D می تواند به عنوان یک عامل تنش زای قوی منجر به جنین زایی رویشی شود (۴). در مقابل غلظت‌های بالا این تنظیم کننده رشد (۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) توسعه جنین را به شدت کاهش داد (جدول ۲). برخی گزارش ها نشان می دهد که غلظت بالای 2,4-D ممکن است به دلیل اثرات بازدارنده بر رشد و یا اثرات زیان آور در متابولیسم سلولی، برای گیاهان مضر باشد (۲۰).

مطالعات اولیه نشان داد که ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D بالاترین میزان درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه القاء نمود و برای بلوغ جنین رویشی محیط کشت حاوی ۰/۵ میلی گرم 2,4-D موثرترین غلظت بود. بنابراین، برای مطالعات بیشتر اثر ترکیبی اکسین (2,4-D) و سیتوکنین (BA) در این ریزنمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان می دهد که بین سطوح مختلف غلظت‌های BA از نظر درصد تشکیل کالوس جنین زا، تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه و درصد تشکیل جنین‌های لپه ای اختلاف بسیار معنی داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه میان این فاکتور ها بر صفات مورد بررسی نیز در سطح ۱ درصد معنی دار شد و تنظیم کننده رشد، نوع ریزنمونه و رقم به طور معنی داری در کارآرایی جنین زائی رویشی موثر بودند. این نتایج نشان داد که سیتوکنین نقش مهمی در القای جنین رویشی توت فرنگی بازی می کند. در کشت بافت گیاهی، سایتوکنین ها عمدتا در تقسیمات سلولی و تمایزیابی شاخه‌های نابجا از کالوس و بافت‌های گیاهی شرکت می کنند (۱۵).



شکل ۱- مراحل جنین زائی رویشی توت فرنگی. الف-کالوس جنین زای ریزنمونه برگ، ب- مراحل اولیه جنین‌های کروی، پ- توسعه جنین، ت- جوانه زنی جنین‌های لپه ای، ث- سازگاری گیاهچه‌های در اتاقک رشد، ج- سازگاری گیاهچه‌های در گلخانه

داده‌های مقایسه میانگین‌های جدول ۴ نشان می دهد که غلظت‌های مختلف سیتوکنین (BA) در ترکیب با اکسین (2,4-D) اثر معنی داری (P<۰/۰۵) بر روی درصد تشکیل کالوس جنین زا، تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه و درصد تشکیل جنین‌های لپه ای داشت. در بیشتر مواردی که سیتوکنین ها جنین زایی رویشی را القاء می کند، همراه با اکسین به محیط کشت افزوده می شوند (۵). به نظر می رسد سیتوکنین ها نقش مهمی در تقسیم سلولی بازی می کنند، که این نقش بیشتر از تمایز یابی جنین است (۲).

در غلظت‌های مختلف BA در ترکیب با ۱ میلی گرم 2,4-D درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه متفاوت بود. بیشترین درصد القاء کالوس در ریزنمونه‌های هر سه رقم در محیط حاوی ۱ میلی گرم 2,4-D و ۰/۲۵ میلی گرم BA بدست آمد و استفاده از این تنظیم کننده رشد اثر مثبتی بر تشکیل کالوس جنین زا و جنین‌های کروی ریز نمونه‌های ارقام مورد مطالعه داشت. در همین راستا گزارش هایی مبنی بر اثر مثبت سیتوکنین در القای جنین رویشی در گیاهان مختلف وجود دارد. به طور مثال در القای جنین‌زایی رویشی پسته استفاده از سیتوکنین‌ها مفید تشخیص داده شده است (۲۲). ولی با افزایش غلظت BA تا ۱ میلی گرم به دلیل ایجاد اندام زائی هیچ گونه کالوس جنین زائی تشکیل نشد (جدول ۴). این کاهش تشکیل کالوس جنین زا و جنین کروی ممکن است ناشی از آنتاگونیسم بین اکسین و سیتوکنین باشد زیرا سیتوکنین خصوصا در غلظت بالا، آنزیم ایندول استیک اسید اکسیداز را فعال می کند و یکی دیگر از دلایل که تیمار ترکیبی ممکن است منجر به کاهش پدیده میزان تشکیل کالوس جنین زا و جنین کروی در ریزنمونه ها شود این است که با در نظر گرفتن مکمل سیتوکنین بیرونی، نسبت کلی بین اکسین و سیتوکنین مناسب جهت تمایز یابی مجدد سلول کالوس از بین رفته و بافت کالوس تمایل به تشکیل شاخساره می نماید (۱۷).

اثر تنظیم کننده رشد BA همراه با 2,4-D بر توسعه جنین توت فرنگی نیز مثبت بود. اضافه نمودن ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر BA همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D به محیط در مقایسه با شاهد تعداد جنین‌های رویشی مرحله لپه ای را به طور معنی داری (P<۰/۰۵) افزایش داد. سیتوکنین خصوصا در غلظت پایین سنتز RNA و پروتئین را در گیاهان افزایش می دهد و از طریق افزایش تقسیم سلولی و یا حرکت مواد غذایی به محل تیمار شده، در جنین زائی مفید می باشد (۱۷). در مقابل محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BA در مقایسه با سایر غلظت ها، توسعه جنین‌های رویشی را به طور معنی داری کاهش داد (جدول ۴).

جدول۳ - تجزیه واریانس اثر 2,4-D همراه با غلظت‌های مختلف BA بر جنین زائی رویشی ریزنمونه‌های مختلف ارقام توت فرنگی(کردستان، پاروس و کامارسا)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات(MS)		
		درصد تشکیل کالوس‌های جنین زا	تعدادجنین کروی در هر ریزنمونه	درصد تشکیل جنین‌های لپه ای
رقم	۲	۵۰۱/۷۸**	۲/۵۸**	۲۹/۳۵**
ریزنمونه	۲	۵۶۱۳/۶۷**	۳۵/۳۸**	۲۲۸۷/۲۳**
BA	۳	۱۹۷۱۶/۴۳**	۲۰۳/۳۴**	۶۹۲۰/۰۳**
ریزنمونه× رقم	۴	۵۷/۹۴**	۰/۱۰**	۵۹/۰۲**
BA × رقم	۶	۱۲۶/۱۷**	۰/۴۳**	۲۶/۲۱**
BA × ریزنمونه	۶	۳۳۲/۷۲**	۴/۴۷**	۲۴۵/۳۸**
BA × ریزنمونه× رقم	۱۲	۸۵/۳۷**	۰/۳۳**	۲۷/۳۸**
خطای آزمایش	۱۰۸	۱/۸۱	۰/۰۱	۱/۰۳
CV	-	۳/۳۲	۳/۹۳	۲/۵۲

*و **: بترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر 2,4-D همراه با غلظت‌های مختلف BA بر جنین زائی رویشی ریزنمونه‌های مختلف ارقام توت فرنگی(کردستان، پاروس و کامارسا)

BA (mg/l)	درصد تشکیل کالوس‌های جنین زا			تعدادجنین کروی در هر ریزنمونه			درصد تشکیل جنین‌های لپه ای		
	کردستان	پاروس	کامارسا	کردستان	پاروس	کامارسا	کردستان	پاروس	کامارسا
ریزنمونه برگ									
۰/۰	۵۶/۵۰f	۶۷/۰۰d	۶۲/۵۰e	۴/۲۰ij	۴/۸۷f	۵/۱۵de	۴۲/۵۲l	۴۸/۱۰j	۴۵/۷۵k
۰/۲۵	۷۳/۲۵b	۸۴/۵۰a	۷۰/۵۰c	۶/۱۵b	۷/۰۰a	۷/۱۷a	۶۲/۵۵b	۶۵/۷۵a	۵۹/۵۰c
۰/۵	۶۱/۶۰e	۵۷/۲۵f	۵۰/۵۰h	۵/۸۰c	۵/۶۷c	۵/۰۰ef	۵۳/۵۷fg	۵۰/۰۰h	۵۵/۷۵de
۱	۱۲/۷۵q	۸/۲۵s	۱۰/۲۵r	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۲۴/۶۲t	۲۸/۶۵rs	۳۱/۸۰p
ریزنمونه گره									
۰/۰	۴۲/۵۰jk	۴۸/۰۰i	۳۸/۵۰m	۳/۵۰n	۴/۲۷hi	۳/۷۲m	۴۰/۶۰m	۴۱/۵۰lm	۴۲/۶۲l
۰/۲۵	۵۷/۰۰f	۶۷/۷۵d	۶۱/۵۰e	۴/۹۷ef	۵/۸۲c	۵/۲۰d	۵۴/۷۲ef	۵۸/۹۲c	۶۱/۲۰b
۰/۵	۴۲/۷۰jk	۵۰/۵۵h	۵۲/۷۵g	۴/۰۲jk	۴/۵۲g	۴/۲۷hi	۳۵/۶۷n	۳۰/۰۵qr	۳۳/۵۰o
۱	۱۷/۲۵p	۱۳/۵۰q	۰/۰۰t	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۲۸/۰۰s	۲۴/۷۵t	۲۲/۷۵u
ریزنمونه جوانه گل									
۰/۰	۳۰/۷۵o	۴۱/۰۰kl	۳۵/۲۵n	۲/۰۰r	۲/۵۷p	۲/۲۵q	۳۳/۵۵o	۳۵/۸۷n	۳۰/۵۰pq
۰/۲۵	۳۹/۵۰lm	۵۰/۹۲gh	۴۴/۲۵j	۳/۹۵kl	۴/۴۷gh	۴/۳۲hi	۵۲/۳۵gh	۵۷/۱۵d	۴۹/۷۷i
۰/۵	۳۱/۵۰o	۴۳/۵۰j	۳۸/۷۵m	۳/۰۷o	۴/۰۰k	۳/۷۷lm	۲۹/۰۰qrs	۳۱/۸۰p	۲۹/۱۷qrs
۱	۰/۰۰t	۰/۰۰t	۰/۰۰t	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۰/۰۰s	۲۱/۸۷u	۱۹/۷۵v	۱۴/۸۷w
میانگین	۳۸/۷۷	۴۴/۳۵	۳۸/۷۲	۳/۱۳	۳/۶۰	۳/۴۰	۳۹/۹۲	۴۱/۱۹	۳۹/۷۶

*: میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر صفت ارزیابی شده، بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

اثر رقم بر جنین زائی رویشی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جداول ۱ و ۳) نشان می‌دهد که در محیط‌های کشت حاوی تنظیم کننده‌های رشد مختلف، درصد تشکیل کالوس جنین زا، تعداد جنین کروی و درصد تشکیل جنین لپه‌ای در ارقام مورد مطالعه از نظر آماری بسیار معنی‌دار ($P<0/01$) است. بسیاری از عوامل نظیر ژنوتیپ، ترکیب عناصر غذایی محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد بر القاء کالوس جنین زا بسیار موثر می باشند (۱۹). نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که پاسخ به تشکیل کالوس جنین زا، جنین‌های مرحله کروی و درصد تشکیل جنین لپه

ای به شدت وابسته به رقم می باشد. به نحوی که رقم پاروس نسبت به رقم کامارسا و کردستان درصد تشکیل کالوس جنین‌زا، تعداد جنین‌های مرحله کروی و درصد تشکیل جنین لپه ای بیشتری داشت (جداول۲ و ۴). در بسیاری از گونه‌های گیاهی ژنوتیپ‌های درون یک گونه ظرفیت جنین زائی متنوعی دارند این گونه تفاوت ها ممکن است به میزان توانائی عناصر کلیدی در مسیر جنین زائی ارتباط داشته باشد (۱۱ و ۱۲). مقایسه خصوصیات ژنتیکی کولتیوارهای توت فرنگی نشان می دهد که تفاوت ژنتیکی در بین کولتیوارهای مختلف تعیین کننده قابلیت باززایی و جنین زائی آنها می‌باشد (۶، ۷ و ۲۳). این اختلاف ناشی از حساسیت ارقام به محیط کشت جنین زایی می باشد (۱۹).

اثر ریزنمونه بر جنین زائی رویشی

مقایسه میانگین داده ها نشان داد که از نظر درصد تشکیل کالوس جنین زا، تعداد جنین کروی و درصد تشکیل جنین لپه ای در بین ریزنمونه اندام‌های مختلف اختلاف معنی داری ($P < ۰/۰۵$) وجود دارد. و این صفات به طور قابل ملاحظه ای تحت تاثیر نوع ریزنمونه قرار گرفتند (جداول ۲ و ۴). از پنج نوع ریزنمونه، کالوس‌های اولیه ریزنمونه‌های پرچم و دمبرگ، کالوس جنین زا تولید نکردند. ریزنمونه برگ در بین ریزنمونه‌های مورد مطالعه در مقایسه میانگین به روش آزمون دانکن در رتبه اول قرار گرفت. ریزنمونه گره در رتبه دوم و ریزنمونه جوانه گل پایین‌ترین رتبه را به خود اختصاص داد. بنابراین نوع ریزنمونه در جنین‌زایی رویشی حیاتی می‌باشد. طبق نظریه نیومن (۲۱) تمام گیاهان جنین‌زا می‌باشند، بنابراین باید ریزنمونه و بافت مناسب جنین زایی در گیاه را پیدا نمود. کرمی و همکاران (۱۱) نیز گزارش نمودند که در بین اندام‌های مختلف میخک فقط ریزنمونه گلبرگ قابلیت جنین زائی دارد.

جوانه زنی جنین ها و سازگاری گیاهچه ها

پس از انتقال جنین رویشی مرحله لپه ای به محیط کشت پایه MS حاوی ۳ **درصد** ساکارز و ۱ میلی گرم در لیتر GA_3، میانگین میزان جوانه زنی جنین‌های رویشی در حدود ۶۵ تا ۶۷ درصد برای هر سه رقم حاصل شد.

به منظور سازگاری گیاهچه ها، گیاهان حاصل از جنین‌های رویشی (شکل۱ت) در سینی‌های کشت حاوی پیت و پرلیت در اتاقک رشد پس از ۴ هفته ۸۵ تا ۹۰ درصد گیاهچه ها زنده ماندند (شکل۱ث). سپس با انتقال آنها به گلخانه پس از ۴ هفته ۷۵ تا ۸۰ درصد گیاهچه ها زنده ماندند و به صورت طبیعی رشد نمودند (شکل ۱ ج). با وجود پتانسیل فوق العاده ریزازدیادی، این روش هنوز با مشکلات بسیاری روبرو می باشد. یکی از مهم ترین مشکلات میزان زنده ماندن گیاهچه در هنگام انتقال به شرایط برون شیشه، در مدت سازگار کردن به آب هوای جدید در گلخانه و یا مزرعه می باشد (۲۵). این مشکل به دلیل ظرفیت فتوسنتز پایین در شرایط این ویترو ناشی از حضور قند در محیط، نور کم و میزان CO_2 ناکافی، و رطوبت نسبی بالا در درون شیشه می باشد. این شرایط در نهایت بر عملکرد فتوسنتز گیاه موثراند (۱۰ و ۲۴).

منابع

1- Biswas M., Islam R., and Hossian M. 2007. Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria sp.*) Through callus culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90: 40–45.

2- Danin M., Upfold S.J., Levin N., Nadel B.L., Altman A., and Van Staden J. 1993. Polyamines and cytokinins in celery embryogenic cell cultures. Plant Growth Regul, 12: 245–254.

3- Donnoli R., Sunseri F., Martelli G., and Greco I. 2001. Somatic embryogenesis, plant regeneration and genetic transformation in Fragaria spp. Acta Horticulturae, 560: 236-240.

4- Fehe´r A., Pasternak T.P., and Dudits D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tissue Organ Cult, 74: 201–228.

5- Gaj M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul, 43: 27–47.

6- Gerdakaneh M., Mozafari A.A., Khalighi A., and Sioseh-mardah A. 2009.The Effects of Carbohydrate Source and Concentration on Somatic Embryogenesis of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 6: 76-80.

7- Gerdakaneh M., Mozafari A. A., Siosemarda A., and Sarabi B. 2011 Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) Acta Physiol Plant (Springer), 5: 1847-1852.

8- Graham J. 2005. Fragaria Strawberry. In: Litz R (Ed) Biotechnology of Fruit and Nut Crops. Biotechnology in Agriculture Series No. 29, CAB International, Wallingford, UK, 456-474 pp.

9- Grossmann K. 2000. Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. Trends Plant Sci, 5:506–508.

10- Hazarika B.N. 2006. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia Horticulturae, 2: 105-

120.
11- Karami O., Deljou A., Esna-Ashari M., and Ostad-Ahmadi P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Scientia Horticulturae, 110: 340–344.
12- Karimi Kurdestani G., and Karami O. 2008. Picloram-Induced Somatic Embryogenesis in Leaves of Strawberry (*Fragaria ananassa* L.). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanic, 50: 69–72.
13- Kitamiya E., Suzuki S., Sano T., and Nagata T. 2000. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. Plant Cell Rep, 19: 551–557.
14- Komamine A., Murata N., and Nomura K. 2005. Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures – morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. In vitro Cell Dev Biol Plant, 41: 6– 10.
15- Kumar S., Kashyap M., and Sharma D. R. 2005. In vitro regeneration and bulblet growth from lily bulb scale explants as affected by retardants, sucrose, and irradiance. Biologia Plantarum, 48: 629- 632.
16- Laux T., and Jugens G. 1997. Embryogenesis: new start in life. Plant Cell, 9: 989–1000.
17- Lim Z.X., Ling A.P.K., and Hussein S. 2009. Callus Induction of Ocimum sanctum and Estimation of Its Total Flavonoids Content Asian Journal of Agricultural Sciences, 1: 55-61.
18- Mezzetti N., Costantini E., Chionchetti F., Landi L., Pandolfiniand T., and Spena A. 2004. Genetic transformation in strawberry and raspberry for improvingplant productivity and fruit quality. Euroberry Symposium, Acta Hort, 649:107-110.
19- Michel Z., Hilaire K.T., Mongomaké K., Georges A.N., and Justin K.Y. 2008. Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Australian Journal of Crop Science, 2: 1-9.
20- Nanjo T., Fujita M., Seki M., Kato M., Tabata S., and Shinozaki K. 2003. Toxicity of free praline revealed in an Arabidopsis TDNA- tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. Plant Cell Physiol, 44: 541-548.
21- Newman P.G., Krishnaraj S., and Saxena P.K. 1996. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill): Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benzyladenine. International Journal of Plant Sciences, 157: 554-560.
22- Onay A., and Jeffree C.E. 2000. Somatic embryogenesis in Pistachio (*Pistacia vera* L.). In: Mohan Jain, S., Gupta, P. and R.J. Newton (eds) Somatic Embryogenesis in woody Plants, Kluwer Academic Publishers. Volume 6, Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. 361-390.
23- Passey A.J., Barrett K.J., and James D.J. 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) using a range of explant types. Plant Cell Reports, 21:397-401.
24- Popescu C. 2008. Physiological behaviour of strawberry in vitro culture in the multiplication phase Lucrări ştiinţifice U.Ş.A.M.V.B., Seria B, vol. LI
25- Pospíšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D., and Plzáková Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. Biol. Plant, 42: 481-497.
26- Quiroz-Figueroa F.R, Rojas-Herrera R., Galaz-Avalos R.M., and Loyola-Vargas V.M. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants Plant Cell Tiss Organ Cult, 86:285–301.
27- Sagare A.P., Lee Y.L., Lin T.C., Chen C.C., and Tsay H.S. 2000. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in Corydalis yanhusuo (Fumariaceae)—a medicinal plant. Plant Sci, 160:139–147.
28- Stasolla C., and Yeung E.C. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell Tissue Organ Cult, 74:15–35.
29- Tokuji Y., and Kuriyama K. 2003. Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). J Plant Physiol, 160:133–141.
30- Toonen M.A.J., Hendriks T., Schmidt E.D.L., Verhoeven H.A., Van Kammen A., and De Vries S.C. 1994. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. Planta, 194:565–572.
31- Wang Y.H., and Bhalla P.L. 2004. Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian fan flower, Scaevola aemula R. Br. Plant Cell Rep, 22:408–414.