نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ص. ۹۵-۸۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 1, Spring 2014, P. 87-95
ISSN: 2008 - 4730

تاثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بر کالوس‌زائی ارقام مختلف توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch.)

محمد گردکانه[۱]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۹/۲۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۸/۷

چکیده

پژوهش حاضر به منظور مطالعه اثرات اکسین و سیتوکنین بر القاء کالوس انجام شد. برای این منظور ریزنمونه اندام‌های رویشی پهنک برگ، دمبرگ و گره و اندام های زایشی جوانه گل، پرچم و نهنج ارقام توت‌فرنگی کردستان، پاروس و کامارسا در سه آزمایش جداگانه بر روی محیط‌کشت MS حاوی تو، فور–دی (2,4-D) در پنج غلظت مختلف ۲، ۳، ۴، ۵ و۶ میلی‌گرم در لیتر، نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) در پنج غلظت مختلف ۲، ۳، ۴، ۵ و۶ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل‌آدنین (BA) در چهار غلظت ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، کشت شدند. نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه و رقم قویا بر القاء و تشکیل کالوس، شکل و بافت آن موثر می‌باشند. انواع ریزنمونه‌ها به استثنای ریزنمونه نهنج در همه تیمارهای هورمونی کالوس تولید نمودند. در ریزنمونه‌های هر سه رقم بیشترین درصد القاء کالوس در محیط‌کشت حاوی ۴ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم BA بدست آمد. در این ترکیب، بیشترین درصد القاء کالوس (۹۸/۵۰) در ریزنمونه گره رقم کردستان تشکیل شد.

واژه‌های کلیدی: توت فرنگی، القاء کالوس، ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد

مقدمه

کشت کالوس در جنین‌زایی غیرمستقیم (القایی)، در بهبود خصوصیات ژنتیکی گونه‌های گیاهی، مطالعه رویدادهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان عالی و ریزازدیادی گیاهان پتانسیل بسیار بالایی داشته و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۸، ۹، ۱۰، ۱۴ و ۱۹). باززایی گیاه توت‌فرنگی از طریق کالوس یکی از روش‌های کشت بافت است که گیاهان باززایی شده تعداد گل، طوقه، استولون و قدرت رشد بیشتری نسبت به گیاه مادری، دارند (۲۵). تنوع سوماکلونالی تحریک شده در کشت کالوس در تسریع فرآیند اصلاح توت‌فرنگی، ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند مقاومت گیاهان به بیماری‌های قارچی (۱۱ و ۲۶) دمای پایین (۲۱) و مقاومت به تنش‌های شوری (۷) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

القاء کالوس، به شدت تحت تاثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (۲). واریته‌های توت‌فرنگی تفاوت‌های زیادی در پتانسیل القاء کالوس دارند که به نظر می‌رسد مربوط به فاکتورهای ژنتیکی باشد (۶، ۱۸ و ۲۴). مقایسه خصوصیات ژنتیکی کولتیوارهای توت‌فرنگی نشان می‌دهد که تفاوت ژنتیکی در بین کولتیوارهای مختلف تعیین‌کننده قابلیت باززایی آنها می‌باشد (۱۸). سینگ و پاندی (۲۴) نیز گزارش دادند که درصد تشکیل کالوس در توت‌فرنگی از ژنوتیپی به ژنوتیپ دیگر متفاوت است. این اختلاف ناشی از حساسیت ارقام به محیط‌کشت کالوس‌زایی می‌باشد (۱۷).

ظرفیت کالوس‌زائی در ریزنمونه‌های مختلف ناشی از ذخایر ترکیبات درونی و ساختار آناتومیک آنها بوده بنابراین نوع ریزنمونه یکی از فاکتورهای بسیار مهم جهت کالوس‌زائی موفق می‌باشد. این اختلاف ممکن است به تفاوت وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه نسبت داده شود (۲۳). زارع و همکاران (۲۸) نیز تفاوت شروع تشکیل کالوس در بین ریزنمونه اندام‌های مختلف را گزارش نموده‌اند.

تولید کالوس به نوع تنظیم‌کننده رشد گیاهی بستگی دارد. اکسین برای تشکیل کالوس ضروری است و حضور اکسین حتی در غلظت کم در محیط‌های کشت، بدون تولید ریشه و شاخساره در ریزنمونه، موجب تولید پینه می‌شود (۳). و استفاده از سیتوکنین این فرآیند را تسریع می‌کند (۲۲). غلظت و نوع تنظیم‌کننده های رشد نیز در شروع القاء کالوس موثر می‌باشد. اکسین قابلیت بهبود القاء و رشد کالوس را دارد اما غلظت‌های بالای آن بازدارنده کالوس‌دهی است و سرعت تشکیل کالوس را کاهش می‌دهند و موجب سیاه شدن آنها می‌شود

۱- محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، کرمانشاه
Email: mgerdakaneh@gmail.com

(۵).

رنگ و بافت در کالوس‌های تشکیل‌شده توت فرنگی با توجه به نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه متفاوت می‌باشند به نحوی که تیمار NAA موجب تشکیل کالوس‌های گره‌دار و فشرده در حالیکه کالوس‌های تشکیل‌شده در محیط 2,4-D کالوس نرم و آبکی تولید می‌کنند (۲، ۵ و ۲۷). قهوه‌ای شدن کالوس ممکن است ناشی از فعالیت سنتز متابولیت‌های ثانویه باشد (۱۵و ۱۶).

پژوهش حاضر با هدف مطالعه فاکتورهای مختلفی نظیر کولتیوار، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، نوع ریزنمونه بر القاء تشکیل کالوس انجام شد و نتایج این تحقیق در جنین‌زایی غیرمستقیم، مطالعه رویدادهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی، تنوع سوماکلونالی جهت ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی کاربرد دارد.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه اندام‌های رویشی پهنک‌برگ، دمبرگ و گره از شاخساره‌های فرعی با برگ‌های کاملا باز شده، حاصل از ریزنمونه‌های نوک استولون که در شرایط این‌ویترو تولید شده بودند، به عنوان ریزنمونه استفاده گردید.

برای تهیه ریزنمونه اندام‌های زایشی (جوانه‌گل، پرچم و نهنج)، جوانه‌های گل کاملا بسته در ابعاد ۴×۵ میلی متر مربع گیاهان مادری ارقام کردستان، پارس و کامارسا پرورش یافته در گلخانه، جمع‌آوری شده و به منظور حذف آلودگی‌های سطحی به مدت ۳۰ دقیقه در زیر جریان آب شهری شسته شدند. سپس در هود لامینار به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۶ درصد قرار داده شدند و سپس توسط هیپو-کلریت سدیم ۰/۵ درصد کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی نموده و بعد ۴ بار با آب دو بار تقطیر استریل به مدت ۱۰ دقیقه شسته شدند. سپس در هود لامینار و در شرایط استریل ریزنمونه‌های پرچم، نهنج و جوانه‌های گل ارقام توت‌فرنگی جهت کالوس‌زایی تهیه گردیدند.

به منظور مطالعه اثرات اکسین و سیتوکنین بر القاء کالوس، ریزنمونه اندام‌های رویشی پهنک‌برگ، دمبرگ و گره و اندام‌های زایشی جوانه‌گل، پرچم و نهنج ارقام توت‌فرنگی کردستان، پاروس و کامارسا در سه آزمایش جداگانه بر روی محیط‌کشت MS حاوی تو،فور–دی (2,4-D) در پنج غلظت مختلف ۲، ۳، ۴، ۵ و۶ میلی‌گرم در لیتر، نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) در پنج غلظت مختلف ۲، ۳، ۴، ۵ و۶ میلی‌گرم در لیتر و بنزیل‌آدنین (BA) در چهار غلظت ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA، کشت شدند. محیط‌کشت پایه MS حاوی ۳درصد ساکارز، ۰/۸درصد آگار و pH = ۵/۸ بود. پس از استریل نمودن محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۱ اتمسفر به مدت ۲۵ دقیقه در هود لامینار و در تحت شرایط استریل به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر در هر پتری-دیش با قطر ۱۰ سانتی متر توزیع شد. سپس ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت منتقل شدند به‌طوری‌که ریزنمونه جوانه‌گل به صورت طولی برش داده تا اندام‌های گل به‌طور یکسان در هر ریزنمونه وجود داشته باشند سپس این ریزنمونه‌ها از محل برش بر روی محیط‌کشت قرارداده شدند. ریزنمونه برگ را به ابعاد ۵×۵ میلی‌متر مربع تهیه نموده و آنها به صورت معکوس (سطح برگ بر روی محیط کشت قرار گرفت) کشت شدند. ریزنمونه‌های پرچم، دمبرگ و گره نیز به طول ۵ تا ۶ میلی‌متر تهیه و بر روی محیط‌کشت منتقل شدند. به منظور کالوس‌زایی، کشت‌ها به مدت ۶ هفته در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵درصد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. در طی مراحل کالوس‌زایی، خصوصیات مورفولوژیکی کالوس‌ها از نظر شکل و رنگ، سرعت کالوس‌زایی و درصد تشکیل کالوس در ریزنمونه اندام‌های مختلف ثبت شد.

در این تحقیق داده‌های حاصل از یادداشت برداری صفات مختلف پس از تبدیل بر اساس روش آماری فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل گردید. برای انجام تجزیه‌های آماری از نرم افزار SAS استفاده گردید و مقایسات میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

برای القای کالوس در ریزنمونه اندام‌های مختلف سه رقم توت-فرنگی، محیط‌کشت MS همراه با تیمارهای مختلف هورمونی مورد آزمایش قرار گرفت. در محیط‌های کشت مذکور، کالوس در ریزنمونه نهنج تولید نشد لذا برای تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به ریزنمونه‌های نهنج به دلیل نداشتن کالوس، صرف‌نظر شد. زیرا ریزنمونه‌های نهنج در محیط‌های کشت حاوی NAA و 2,4-D به شدت توسعه یافته و تشکیل میوه نمودند و حتی رنگ جزئی نیز در آنها ایجاد شد (شکل۱– ث). گزارش سایر محققین نیز ثابت نموده که اکسین در توسعه و رشد میوه توت‌فرنگی نقش داشته، و این گروه از تنظیم کننده‌های رشد مسئول بزرگ شدن و توسعه نهنج توت‌فرنگی می‌باشند. ایندول‌استیک‌اسید (IAA) که به طور طبیعی در آکن‌های میوه سنتز می‌شود موجب تشکیل و نمو میوه می‌گردد و استفاده مصنوعی از NAA یا سایر اکسین ها می‌تواند جایگزین IAA در میوه‌های بدون آکن شود (۲۰).

در جداول ۱ و۳ نتایج حاصل از تجزیه واریانس درصد تشکیل کالوس را نشان می‌دهد که سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بر روی صفت مورد بررسی سبب بروز اثرات بسیار معنی‌داری (P <۰/۰۱) گردیده است. همچنین ارقام، نوع ریزنمونه و اثر متقابل بین آنها در صفت مورد مطالعه اختلاف‌های بسیار معنی‌داری

(P <۰/۰۱) با یکدیگر داشتند که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی در بین آنهاست. مقایسه خصوصیات ژنتیکی کولتیوارهای توت‌فرنگی نشان می‌دهد که تفاوت ژنتیکی در بین کولتیوارهای مختلف تعیین‌کننده قابلیت باززایی آنها می‌باشد (۱۸). سینگ و پاندی (۲۴) نیز گزارش‌دادند که درصد تشکیل کالوس در توت‌فرنگی از ژنوتیپی به ژنوتیپ دیگر متفاوت است. این اختلاف ناشی از حساسیت ارقام به محیط کشت کالوس زایی می باشد (۱۷). همچنین جداول ۱ و ۳ نشان می‌دهد که اثر متقابل بین ریزنمونه‌ها، ارقام و ترکیبات هورمون‌های مورد مطالعه بر درصد تشکیل کالوس در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. بنابراین نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که درصد تشکیل کالوس به نوع محیط کشت، ریزنمونه و کولتیوار بستگی دارد.

مرفولوژی کالوس

اندازه و شکل ریزنمونه‌ها ۳ تا ۵ روز بعد از انتقال بر روی محیط‌های کشت، شروع به تغییر نمود و حاشیه ریزنمونه ها به طرف بالا حلقه شد. ریزنمونه‌ها خصوصاً برگ‌ها بعد از ۵ تا ۷ روز پس از کشت شروع به متورم شدن نمودند و بدون تشکیل کالوس اندازه آنها تا ۱/۵ برابر بزرگتر شد. که احتمالا دلیل بزرگ شدن سریع سلول‌ها ناشی از حضور هورمون‌های اکسین در محیط‌کشت باشد. این نتایج با گزارش یانگهوا و همکاران (۲۷) همسو می‌باشد.

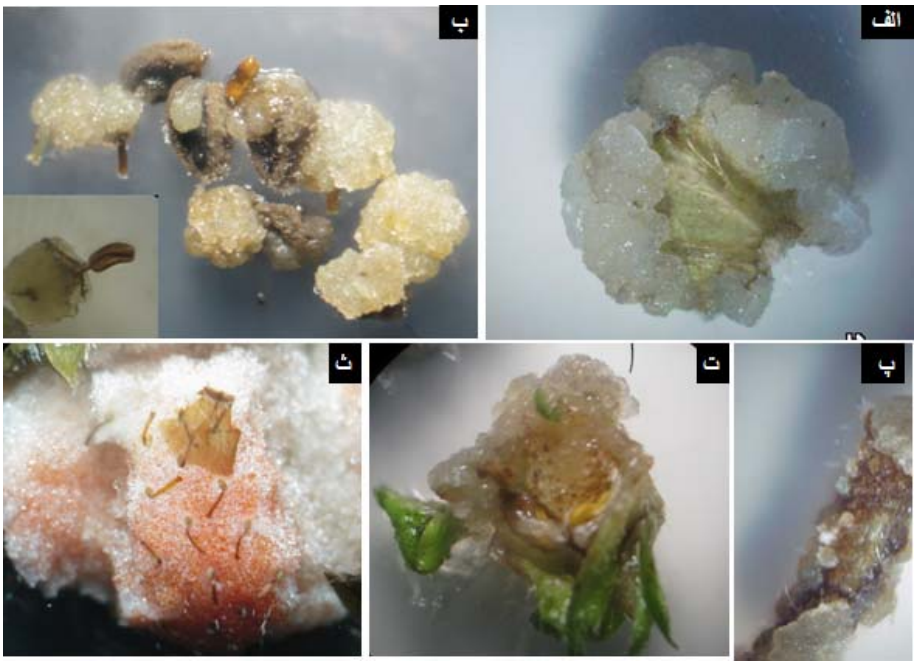
کالوس در همه ریزنمونه‌ها در محل زخم القاء شد. بعد از ۸ تا ۱۴ روز در ناحیه برش ریزنمونه ها، کالوس شروع به تشکیل شدن نمودند. آغاز تشکیل کالوس با توجه به نوع ریزنمونه و ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد متفاوت بود. اما اختلاف محسوسی در بین ارقام مشاهده نشد. در بین اندام‌های مختلف، در ریزنمونه پهنک برگ در محل رگبرگ اصلی نزدیک به دمبرگ سریعتر از سایر اندام‌ها کالوس تشکیل شد. که احتمالا به دلیل جذب بیشتر ترکیبات محیط‌کشت باشد که منجر به تقسیم سلولی سریع و تشکیل کالوس می شود. در مقابل تشکیل کالوس در ریزنمونه پرچم دیرتر از سایر ریزنمونه‌ها آغاز گردید. اولین علایم رشد کالوس در ریزنمونه برگ بین ۸ تا ۱۰ روز پس از کشت مشاهده شد در حالیکه تشکیل کالوس در ریزنمونه پرچم بعد از ۱۴ روز آغاز گردید. زارع و همکاران (۲۸) نیز تفاوت شروع تشکیل کالوس در بین ریزنمونه اندام‌های مختلف را گزارش نموده اند.

غلظت و نوع تنظیم‌کننده های رشد نیز در شروع القای کالوس موثر بود. اگر چه اکسین قابلیت بهبود القا و رشد کالوس را دارد اما غلظت‌های بالای آن بازدارنده کالوس‌دهی است و سرعت تشکیل کالوس را کاهش می‌دهند. دونولی و همکاران (۵) نیز گزارش نمودند که غلظت بالای هورمون 2,4-D سرعت تشکیل کالوس را کاهش داده و موجب سیاه شدن آنها می‌شود. سرعت تشکیل کالوس در محیط‌کشت حاوی اکسین و BA بیشتر اکسین به تنهائی بیشتر بود. به‌نحوی‌که در این ترکیب القاء کالوس در ریزنمونه برگ بعد از ۷ روز اتفاق افتاد و آغاز کالوس‌دهی در ریزنمونه‌ها در محیط‌کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA یا 2,4-D غلظت‌های بالاتر و کمتر این تنظیم‌کننده‌های رشد سریعتر بود. این نتایج با گزارش بیسواس و همکاران (۲) مطابقت داشت.

رنگ و بافت در کالوس‌های تشکیل شده با توجه به نوع و غلظت تنظیم‌کننده رشد و نوع ریزنمونه متفاوت بود. هان و همکاران (۱۲) نیز گزارش نمودند که در غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد بافت و رنگ کالوس‌های تولید شده متفاوت می‌باشند. در اکثر ریزنمونه‌ها، تیمار NAA باعث تولید کالوس‌های گره‌دار و فشرده به رنگ سفید مایل به زرد شد (شکل ۱)، که با نتایج گزارش شده توسط دونولی و همکاران (۵) و بیسواس و همکاران (۲) مطابقت داشت. کالوس‌های تشکیل‌شده در محیط‌کشت حاوی 2,4-D کالوس نرم و آبکی به رنگ سفید مایل به خاکستری یا قهوه‌ای تولید نمودند. کالوس های تشکیل شده در غلظت های پایین این تنظیم کننده های رشد نیز ساختار پفکی سفید داشتند. یانگهوا و همکاران (۲۷) نیز گزارش نمودند که 2,4-D مناسب کاشت توت فرنگی نیست چون کالوس‌های نرم تولید می‌کند.

کالوس‌هایی که در محیط‌کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA از ریزنمونه گره و پهنک برگ به دست آمدند فشرده و شکننده بودند و هنگامی که سیتوکنین به این محیط‌کشت اضافه شد تولید کالوس‌های کرمی فشرده نمودند. کالوس‌ها در محیط‌کشت ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA به تنهایی یا در ترکیب با BA بعد از ۶ هفته قهوه‌ای شدند (۱۵ و ۱۶). در بعضی از ریزنمونه‌ها که در غلظت‌های پایین اکسین کشت شده بودند ریشه ها ظاهر گردید.

در ریزنمونه‌های مختلف نیز شکل و رنگ کالوس‌های تشکیل شده متفاوت بودند. با توجه به نوع ریزنمونه بعضی از آنها تولید کالوس فشرده، ترد و شکننده و سفید مایل به کرمی روشن کردند در حالیکه برخی از ریزنمونه‌ها کالوس نرم و آبکی به رنگ سفید مایل به خاکستری تولید نمودند. کالوس‌های حاصل از ریزنمونه دمبرگ سفید مایل به خاکستری و آبکی و سطح نرم داشتند و پس از مدتی متمایل به قهوه‌ای شدند در حالیکه کالوس‌های حاصل از گره و پهنک برگ نرم یا شکننده، چسبنده و زرد مایل به سفید و فشرده بودند. ریزنمونه پرچم و جوانه‌گل تولید کالوس‌های نرم سفیدی با سطح صاف نمود (شکل۱).



شکل ۱- کالوس‌زائی ریزنمونه اندام‌های مختلف در محیط‌کشت دارای ٤ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA الف- ریزنمونه اندام پهنک‌برگ. ب- ریزنمونه پرچم و نحوه تشکیل کالوس در آن. پ- ریزنمونه دمبرگ. ت- ریزنمونه جوانه‌گل. ث- ریزنمونه نهنج.

نقش تنظیم‌کننده های رشد بر القای کالوس

نقش NAA بر القای کالوس: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف غلظت‌های NAA از نظر درصد تشکیل کالوس اختلاف بسیار معنی داری ($P <۰/۰۱$) وجود داشت. نتایج به دست آمده نشان داد که همه تیمارهای تنظیم-کننده رشد در انواع ریزنمونه‌ها به استثنای ریزنمونه نهنج کالوس تولید نمودند. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن نشان داد که از نظر درصد تشکیل کالوس اختلاف معنی داری ($P <۰/۰۵$) در بین تیمارهای مختلف NAA مشاهده می‌شود (جدول ۲).

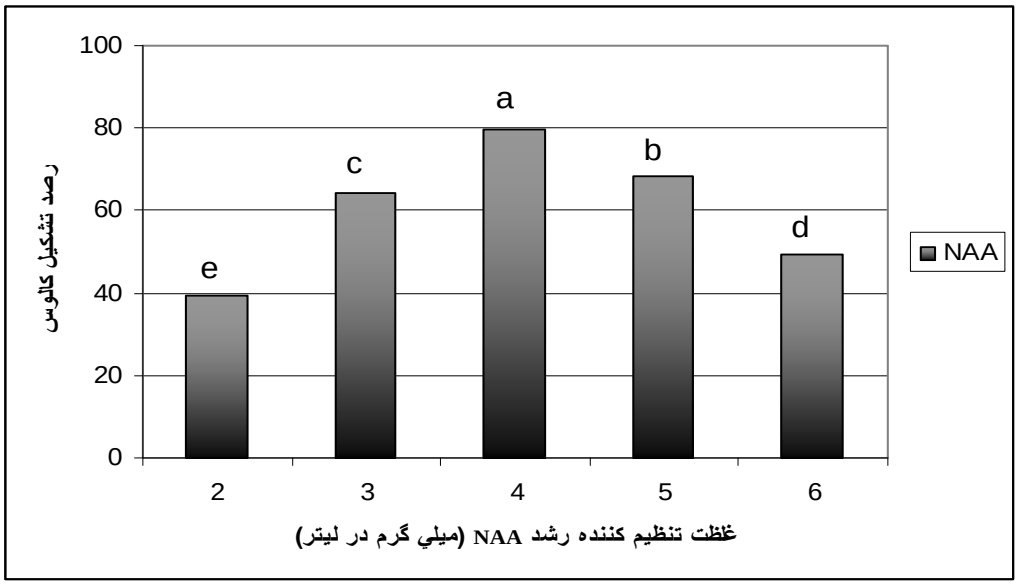
مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲) نشان می‌دهد با افزایش غلظت NAA از ۲ میلی‌گرم در لیتر تا ۴ میلی‌گرم در لیتر درصد تشکیل کالوس نیز افزایش پیدا می‌کند.

جدول۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف NAA بر درصد تشکیل کالوس ریزنمونه اندام‌های مختلف ارقام توت‌فرنگی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		درصد تشکیل کالوس
رقم	۲	۱۷۲۵/۳۷**
ریزنمونه	۴	۳۶۲۱/۳۴**
NAA	۴	۲۲۶۸۸/۶۸**
رقم× ریزنمونه	۸	۴۴۰/۹۵**
رقم×NAA	۸	۸۵۸/۳۶**
ریزنمونه ×NAA	۱۶	۲۶۷/۱۳**
رقم× ریزنمونه ×NAA	۳۲	۲۹۸/۰۶**
خطای آزمایش	۳۷۵	۳/۴۷
CV	–	۷/۳۱

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

افزایش غلظت NAA سبب افزایش درصد کالوس‌زایی در همه ریزنمونه‌ها و ارقام شد به‌نحوی که حداکثر کالوس‌زایی در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر این تنظیم‌کننده رشد حاصل گردید. این نتایج با گزارش بیسواس و همکاران (۲) مطابقت داشت. با افزایش غلظت این تنظیم‌کننده رشد بیش از ۴ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش کالوس‌زایی شد.



شکل۲- اثر غلظت های مختلف NAA بر درصد تشکیل کالوس ریزنمونه های مختلف ارقام توت فرنگی

جدول۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف NAA بر درصد تشکیل کالوس ریزنمونه‌های مختلف ارقام توت‌فرنگی

NAA (میلی‌گرم در لیتر)	ریزنمونه				
	پهنک‌برگ	گره	دمبرگ	جوانه‌گل	پرچم
رقم کردستان					
۲	۷۰/۵۰de	۵۴/۳۳e	۴۳/۳۳g	۴۴/۰۰gh	۲۹/۶۶f
۳	۸۵/۶۰b	۷۲/۰۰c	۷۱/۶۶bc	۷۰/۱۶b	۴۹/۶۶e
۴	۹۳/۰۸a	۹۱/۱۶a	۸۶/۳۳a	۷۵/۵۰a	۷۰/۰۰a
۵	۶۷/۵۰e	۷۰/۰۰cd	۶۷/۱۰de	۶۳/۷۴cd	۶۰/۰۹cd
۶	۵۲/۶۶g	۵۸/۸۳de	۳۹/۰۰g	۳۹/۵۰h	۴۸/۲۰e
رقم پارس					
۲	۳۸/۰۰h	۲۴/۱۶f	۴۵/۳۳g	۱۷/۶۶i	۱۸/۰۰g
۳	۵۴/۶۶g	۵۶/۱۶e	۵۹/۳۳ef	۵۳/۳۳ef	۶۰/۵۰bc
۴	۸۳/۱۶c	۸۵/۰۰ab	۶۷/۸۳de	۶۵/۶۶c	۷۴/۱۶a
۵	۸۴/۲۰bc	۷۲/۵۰c	۶۱/۱۱def	۶۵/۷۴c	۶۷/۶۹ab
۶	۶۲/۱۶f	۴۹/۶۶e	۴۴/۵۰g	۴۸/۳۳fg	۵۱/۶۶de
رقم کامارسا					
۲	۵۱/۳۳g	۵۲/۵۰e	۳۰/۳۳h	۴۲/۳۳gh	۳۰/۳۳f
۳	۷۳/۲۴d	۷۶/۳۳bc	۶۵/۱۶e	۵۹/۸۶de	۵۳/۵۰d
۴	۹۱/۶۶ab	۹۰/۰۸a	۷۹/۶۶ab	۷۲/۰۰ab	۷۰/۰۰a
۵	۶۵/۱۶ef	۷۵/۸۳bc	۷۰/۳۳cd	۶۹/۱۶bc	۶۶/۷۲ab
۶	۴۰/۵۰h	۵۹/۱۶de	۵۵/۲۲f	۴۵/۵۰gh	۴۵/۳۳e
میانگین	۶۷/۵۶A	۶۵/۸۵B	۵۹/۱۲C	۵۵/۵۰D	۵۳/۰۱E

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

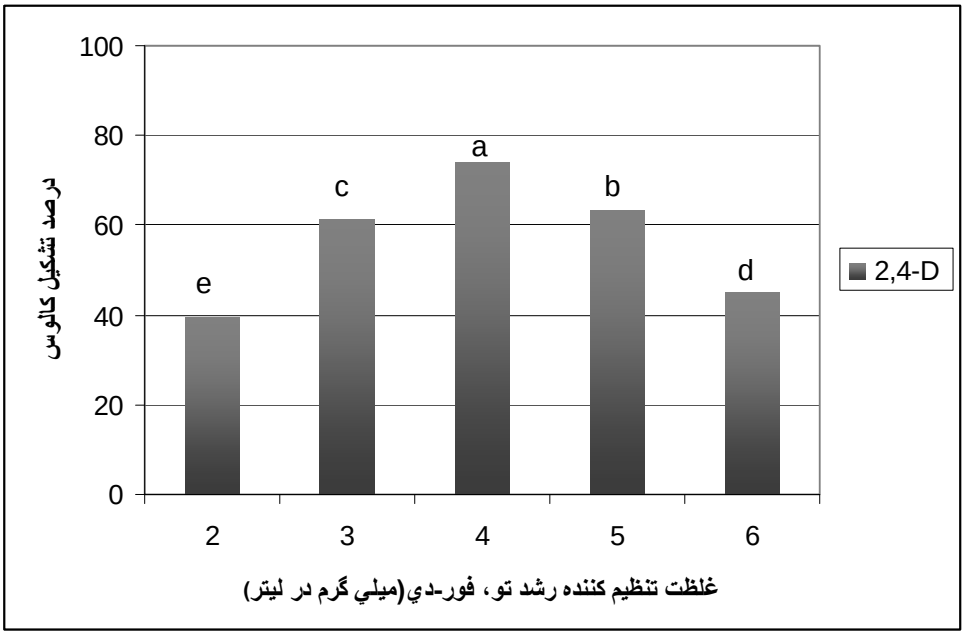
در غلظت ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA درصد تشکیل کالوس کاهش پیدا نمود و کالوس‌های ایجاد شده نیز متمایل به قهوه‌ای و بعد از ۸ تا ۱۰ هفته از بین رفتند. سایر محققین نیز گزارش نموده‌اند که علت کاهش درصد تشکیل کالوس در غلظت بالای تنظیم‌کننده-های رشد گروه اکسین به دلیل سمیت در غلظت بالا و داشتن خاصیت علف کشی این ترکیبات می‌باشد. علاوه براین غلظت بالای تنظیم‌کننده های رشد گروه اکسین بیوسنتز اتیلن را افزایش می‌دهند و اتیلن باعث پیری اندام‌های گیاهی می‌شود (۱۳).

نقش 2,4-D بر القای کالوس: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان می‌دهد که از نظر درصد تشکیل کالوس بین سطوح مختلف غلظت‌های 2,4-D اختلاف بسیار معنی‌داری (P <۰/۰۱) وجود دارد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از این نظر، اختلاف معنی-داری (P <۰/۰۵) بین غلظت‌های مختلف 2,4-D مشاهده می‌شود به‌طوری که با افزایش غلظت تنظیم‌کننده رشد 2,4-D تا سطح ۴ میلی‌گرم در لیتر تشکیل کالوس نیز افزایش یافت و در ادامه تا ۶ میلی‌گرم در لیتر این درصد کاهش یافت. اگر چه 2,4-D قادر به بهبود القاء و رشد کالوس شد اما غلظت‌های بالای آن بازدارنده کالوس‌دهی است. با افزیش غلظت این تنظیم‌کننده رشد به بیش از ۴ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش کالوس‌زایی شد (شکل۳).

جدول۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد تشکیل کالوس ریزنمونه اندام‌های مختلف ارقام توت‌فرنگی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		درصد تشکیل کالوس
رقم	۲	۱۳۷۲/۳۶**
ریزنمونه	۴	۲۶۰۱/۵۵**
2,4-D	۴	۱۹۲۳۷/۸۱**
رقم× ریزنمونه	۸	۵۳۱/۷۸**
رقم × 2,4-D	۸	۲۰۹۶/۲۴**
ریزنمونه ×2,4-D	۱۶	۱۸۸/۸۲**
رقم × ریزنمونه × 2,4-D	۳۲	۱۷۱/۰۱**
خطای آزمایش	۳۷۵	۴/۵۵
CV	-	۷/۵۶

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



شکل۳- اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد تشکیل کالوس ریزنمونه اندام‌های مختلف ارقام توت‌فرنگی

جدول٤- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر درصد تشکیل کالوس ریزنمونه اندام‌های مختلف ارقام توت‌فرنگی

2,4-D (mg/l)	ریزنمونه				
	پهنک‌برگ	گره	دمبرگ	جوانه‌گل	پرچم
رقم کردستان					
۲	۶۰/۰۰de	۵۹/۶۶de	۴۶/۶۶gh	۴۳/۵۰d	۳۲/۰۰fg
۳	۷۵/۵۰b	۷۹/۵۰ab	۶۸/۳۳bc	۶۳/۰۰bc	۵۰/۶۶d
۴	۸۷/۶۶a	۸۷/۵۸a	۸۱/۳۳a	۶۹/۵۰ab	۶۲/۱۶b
۵	۶۳/۱۶cd	۶۶/۱۶cd	۶۳/۱۶cde	۵۷/۵۸c	۵۵/۷۰cd
۶	۴۶/۱۶g	۴۹/۵۰e	۳۳/۸۳ij	۳۳/۸۳d	۴۲/۱۶ef
رقم پارس					
۲	۲۶/۸۳h	۲۱/۶۶f	۲۵/۱۶j	۱۷/۱۶e	۱۸/۳۳h
۳	۵۰/۶۶fg	۴۸/۸۳e	۵۲/۸۳fg	۵۷/۳۳c	۵۶/۵۰cd
۴	۷۵/۸۳b	۷۰/۰۰bd	۷۲/۶۶ab	۶۷/۳۳b	۶۵/۸۳a
۵	۷۴/۶۶b	۷۱/۳۳bc	۶۷/۰۰bc	۶۲/۵۸bc	۶۳/۷۲ab
۶	۶۳/۱۶cd	۴۹/۵۳e	۵۷/۸۳de	۴۳/۵۰d	۴۵/۰۰de
رقم کامارسا					
۲	۵۲/۵۰f	۵۴/۵۰e	۴۳/۰۰h	۳۹/۸۲d	۲۹/۵۰g
۳	۷۱/۱۶bc	۷۱/۳۳bc	۵۴/۸۳ef	۶۷/۱۷b	۵۳/۱۶ cde
۴	۸۴/۰۰a	۸۳/۵۸a	۶۴/۳۳cd	۷۴/۱۶a	۶۶/۵۰a
۵	۵۵/۶۶ef	۷۱/۱۱bc	۵۵/۶۶ef	۶۲/۶۰bc	۶۰/۲۲bc
۶	۳۳/۱۶h	۴۹/۵۰e	۳۹/۵۰hi	۳۸/۳۳d	۴۷/۶۶de
میانگین	۶۱/۳۴B	۶۲/۵۰A	۵۵/۰۷C	۵۳/۱۶D	۴۹/۹۴E

*- میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

این موضوع ممکن است ناشی از اثر علف‌کشی آن باشد. آکی یوشی و همکاران (۱) گزارش‌دادند که غلظت بالای 2,4-D ممکن است به دلیل افزایش اکسین درونی بیش از میزان آستانه حیاتی، از تقسیم سلول جلوگیری کند. نتایج ما نشان داد غلظت بالای هورمون 2,4-D ضمن کاهش تشکیل کالوس، کالوس‌های اندک تشکیل شده نیز بعد از ۶ تا ۸ هفته سیاه شده و از بین رفتند (۱۵ و ۱۶).

نقش BA بر القای کالوس: همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده، ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین میزان کالوس‌زایی را در همه ریزنمونه القا نمود، و به دلیل اینکه ریزنمونه‌های برگ و گره در مقایسه با سایر ریزنمونه‌ها بیشترین درصد کالوس‌زایی را ایجاد نمودند، بنابراین برای مطالعات بیشتر اثر ترکیبی اکسین و سیتوکنین (BA) در این ریزنمونه‌ها در یک آزمایش جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های جدول ۵ نشان داد که غلظت‌های مختلف BA در ترکیب با ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA اثر معنی‌داری بر روی درصد تشکیل کالوس در ریزنمونه‌ها داشت. بیشترین درصد القا کالوس در ریزنمونه‌های مختلف در محیط کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد بطوری که در ریزنمونه برگ ۹۵/۰۸، ۹۱/۸۳ و ۹۷/۰۰ درصد و ریزنمونه گره ۹۸/۵۰، ۹۵/۵۰ و ۹۵/۸۳ درصد به ترتیب در رقم کردستان، پارس و کامارسا کالوس تشکیل شد (جدول۵). در بررسی اثر هورمون سیتوکنین BA می توان اظهار کرد که استفاده از این تنظیم‌کننده رشد اثر مثبتی بر کالوس-زایی ریزنمونه‌های ارقام مورد مطالعه داشت. لیم و همکاران (۱۳)، گزارش نمودند که سیتوکنین خصوصاً در غلظت پایین، سنتز RNA و پروتئین را در گیاهان افزایش می‌دهد و از طریق افزایش تقسیم سلولی و یا حرکت مواد غذایی به محل تیمار شده، از پیری ریزنمونه‌ها جلوگیری می‌کند. افزایش کالوس‌دهی نیز احتمالا در اثر دلایل ذکر شده باشد. اما درصد تشکیل کالوس در محیط‌کشت حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و BA در غلظت بالا (۲ میلی‌گرم در لیتر) کمتر از محیط کشت دارای ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA به تنهائی بود. این کاهش تشکیل کالوس ممکن است ناشی از آنتاگونیسم بین اکسین و سایتوکنین باشد زیرا سایتوکنین خصوصاً در غلظت بالا، آنزیم ایندول استیک اسید اکسیداز را فعال می کند. غلظت‌های بیش از حد سیتوکنین سنتز RNA و پروتئین را مهار می‌کند. یکی دیگر از دلایلی که تیمار ترکیبی اکسین و سیتوکنین ممکن است منجر به کاهش میزان تشکیل کالوس در ریزنمونه ها شود این است که غلظت بالای اکسین بیرونی می‌تواند موجب تحریک تولید سیتوکنین درون زا گردد. با این حال، با در نظر گرفتن مکمل سیتوکنین بیرونی، نسبت کلی بین اکسین و سیتوکنین مناسب جهت تمایزیابی مجدد سلول کالوس از بین رفته و بافت ریزنمونه تمایل به تشکیل سلول‌های ریشه می‌نماید (۱۳).

جدول ۵- اثر غلظت‌های مختلف BA در ترکیب با ٤ میلی‌گرم در لیتر NAA بر درصد تشکیل کالوس ریزنمونه گره و پهنک برگ ارقام توت‌فرنگی

BA (mg/l)	ریزنمونه گره			ریزنمونه پهنک برگ		
	کردستان	پارس	کامارسا	کردستان	پارس	کامارسا
۰	۹۱/۱۶b	۸۵/۰۰cd	۹۰/۰۸c	۹۳/۰۸b	۸۳/۱۶d	۹۱/۶۶bc
۰/۵	۹۲/۳۳b	۹۰/۶۶bc	۹۱/۵۰b	۸۸/۵۳c	۸۵/۶۶cd	۹۳/۶۶b
۱	۹۸/۵۰a	۹۵/۵۰ab	۹۵/۸۳ab	۹۵/۰۸ab	۹۱/۸۳bc	۹۷/۰۰a
۲	۸۰/۸۳d	۸۹/۸۳c	۸۶/۵۰cd	۸۵/۲۸cd	۸۱/۸۳e	۸۰/۹۱e

*- میانگین‌های دارای حرف مشترک در ستون های مربوط به هر ریزنمونه، بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

اثر رقم بر تولید کالوس

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول‌های ۱و ۳) داده ها نشان می‌دهد که در محیط های کشت درصد تشکیل کالوس در ارقام مورد مطالعه از نظرآماری بسیار معنی‌دار (P <۰/۰۱) شده است. میشل و همکاران (۱۷) نیز گزارش نمودند که بسیاری از فاکتورها نظیر ژنوتیپ، ترکیب عناصر غذایی محیط کشت و تنظیم کننده های رشد بر القاء کالوس بسیار موثر می باشند. نتایج (جدول های ۲و۴) نشان داد که پاسخ به کالوس زایی به شدت وابسته به رقم می باشد و مقایسه میانگین داده ها نشان می دهد که القاء کالوس در ارقام مورد مطالعه دارای اختلاف معنی داری (P <۰/۰۵) می باشند. به نحوی که رقم کردستان نسبت به ارقام کامارسا و پاروس کالوس‌دهی بیشتری داشت. دابکاوسن و همکاران (۴) دونگ و همکاران (۶) گزارش کردند که ژنوتیپ بر روی القای کالوس مؤثر می‌باشد. مقایسه خصوصیات ژنتیکی کولتیوارهای توت‌فرنگی نیز نشان می‌دهد که تفاوت ژنتیکی در بین کولتیوارهای مختلف تعیین‌کننده قابلیت باززایی آنها می‌باشد (۱۸). سینگ و پاندی (۲۴) نیز گزارش دادند که درصد تشکیل کالوس در توت‌فرنگی از ژنوتیپی به ژنوتیپ دیگر متفاوت است. این اختلاف ناشی از حساسیت ارقام به محیط‌کشت کالوس‌زایی می‌باشد (۱۷).

اثر ریزنمونه بر کالوس‌زائی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول‌های ۱و۳) نشان می‌دهد که درصد تشکیل کالوس در ریزنمونه اندام‌های مورد مطالعه از نظرآماری بسیار معنی‌دار (P <۰/۰۱) بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد در بین ریزنمونه‌های مختلف، قطعات پهنک برگ حداکثر میزان کالوس‌دهی را در هر سه رقم داشتند و بعد از آن قطعات گره کالوس بیشتری تولید کردند. ریزنمونه‌های دمبرگ و جوانه گل کالوس‌دهی متوسطی را نشان دادند. در حالیکه ریزنمونه‌های پرچم کمترین میزان تشکیل کالوس را ایجاد نمودند و در ریزنمونه نهنج هیچگونه کالوسی تشکیل نشد. سای و همکاران (۲۳) گزارش نمودند که ظرفیت کالوس‌زائی در ریزنمونه‌های مختلف ناشی از ذخایر ترکیبات درونی و ساختار آناتومیک آنها بوده بنابراین نوع ریزنمونه یکی از فاکتورهای بسیار مهم جهت کالوس‌زایی موفق می‌باشد. آنها اظهار نظر می‌کنند که این اختلاف ممکن است به تفاوت وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه نسبت داده شود.

نتیجه‌گیری

القای تشکیل کالوس در گیاه توت‌فرنگی به فاکتورهای مختلفی نظیر کولتیوار، نوع و غلظت تنظیم‌کننده های رشد، نوع ریزنمونه بستگی دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود جهت بهبود وضعیت کالوس زائی ریزنمونه و نوع و غلظت تنظیم کننده رشد مناسب انتخاب شود. همچنین از نتایج این تحقیق می توان برای کاربردهای دیگری از قبیل کشت کالوس در جنین زایی غیرمستقیم، مطالعه رویدادهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان، تنوع سوماکلونالی جهت ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی استفاده نمود.

منابع

1- Akiyoshi D.E., Morris R.O., Hinz R., Mischke B.S. and Nester E.W. 1983. Cytokinin/ auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 407-411.

2- 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.

3- Biswas M.K., Islam R. and Hossain M. 2008. Micro propagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. Journal of Agricultural Technology 4(1): 167-182.

4- Dabekaussen M.A.A., Pierik R.L.M., van der Laken J.D. and Hoek S.J. 2003. Affecting areole activation in vitro in the cactus Sulcorebutia alba Rausch, Horticulture scientica, 46,3-4: 283-294.
5- Donnoli R., Sunseri F., Martelli G. and Greco I. 2001. Somatic embryogenesis, plant regeneration and genetic transformation in Fragaria spp. Acta Hortic 560:235–240.
6- Duong T., Truong T., Nguyen T., Nguyen T., Nguyen T., Nguyen Q.T. and Nguyen Hong V.U. 2006. Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of Gerbera jamesonii by receptacle transverse thin cell layer culture, Horticulture science. 2, 111:146-151.
7- Dziadczyk P., Bolibok H., Tyrka M. and Hortyski J.A. 2003. In vitro selection of strawberry (Fragaria × ananassa Duch.) clones tolerant to salt stress. Euphytica 132:49–55.
8- 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 (1): 76-80.
9- Gerdakaneh M., Mozafari A.A., Khalighi A. and Siosemarda A. 2010. The effects of exogenous proline and osmotic stress on morpho-biochemical parameters of strawberry callus African Journal of BiotechnologyVol. 9(25), pp. 3775-3779.
10- 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) DOI 10.1007/s11738-011-0725-9.
11- Hammerschlag F., Garcés S., Koch-Dean M., Ray S., Lewers K., Maas J. and Smith B. 2006. In vitro response of strawberry cultivars and regenerants to Colletotrichum acutatum. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84, 255-261
12- Han G.Y., Wang X.F., Zhang G.Y. and Ma Z.Y. 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration of recalcitrant cottons (*Gossypium hirsutum*) African Journal of Biotechnology Vol. 8 (3), pp. 432-437.
13- 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(2): 55-61.
14- Liu T.H., Nada K., Handa C., Kitashiba H. and Moriguchi T. 2006. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of arginine decarboxylase pathway in stress response. J. Exp. Bot. 57: 2589-2599.
15- Makunga N.P., Jager A.K. and Staden J.V. 2005. An improved system for the in vitro regeneration of Thapsia garganica via direct organogenesis – influence of auxins and cytokinins. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 82: 271–280.
16- Martin K.P. 2004. Plant regeneration through somatic embryogenesis in medicinally important Centella asiatica L. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant, 40: 586–591.
17- 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 Science2(1): 1-9.
18- 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.
19- 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 86:285–301DOI 10.1007/s11240-006-9139-6.
20- Roussos P.A., Denaxa N.K. and Damvakaris T. 2008. Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds Scientia Horticulturae 3033; No of Pages 9.
21- Rugienius R. and Stanys V. 2001. In vitro screening of strawberry plants for cold resistance. Euphytica 122, 269-277.
22- Safdari Y. and Kazemitabar S.K. 2010. Direct shoot regeneration, callus induction and plant regeneration from callus tissue in Mose Rose (*Portulaca grandiflora* L.) POJ 3(2):47-51.
23- Sié R.S., Charles G., Sakhanokho H.F., Toueix Y., Djè Y., Sangaré A. and Branchard M. 2010. Protocols for callus and somatic embryo initiation for Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae): Influence of explant type, sugar, and plant growth regulators. Aust J Crop Sci 4(2):98-106.
24- Singh A.K. and Pandey S.N. 2004. Genotypic variation among strawberry cultivars for shoot organogenesis. Acta Horticulturae 662, 277-280.
25- Singh A.K., Dubey A.K. and Dhawan V. 2004. Phenotipic stability of in vitro regenerated plants of strawberry(Fragaria x ananassa. Duch.). Progressive Horticulture. Vol.36 (1): 5-7.
26- Sowik I., Bielenin A. and Michalczuk L. 2001. In vitro testing of strawberry resistance to Verticillium dahliae and Phytophthora cactorum. Scientia Horticulturae 88, 31-40.
27- Yonghua Q., Shanglong Z., Asghar S., Lingxiao Z., Qiaoping Q., Kunsong C. and Changjie X. 2005. Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films. Plant Sci. 168: 1409-1424.
28- Zare A.R., Solouki M., Omidi M. and Irvani N. 2010. callua induction and Plant regeneration IN FERULA ASSA FOETIDA L. Trakia Journal of Sciences, Vol. 8, No. 1, pp 11-18,