اثر NAA و ریزنمونه اندام‌های مختلف بر جنین‌زایی ثانویه توت فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch.)

محمد گردکانه* و عیسی ارجی

کرمانشاه، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۳

چکیده

پژوهش حاضر به‌منظور مطالعه اثرات غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد نفتالین استیک اسید (NAA) بر القاء، نمو و بلوغ جنین ارقام توت فرنگی کردستان، پاروس و کامارسا انجام شد. برای این منظور کالوس ریزنمونه اندام‌های رویشی پهنک برگ، دمبرگ، گره و اندام‌های زایشی جوانه گل و پرچم بر روی محیط کشت MS حاوی NAA در چهار غلظت مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. غلظت تنظیم‌کنندهٔ رشد، نوع ریزنمونه و رقم به شدت بر روی القاء، توسعه و بلوغ جنین مؤثر بودند. نتایج نشان داد که انواع ریزنمونه‌ها به استثنای ریزنمونه دمبرگ و پرچم در همه تیمارهای هورمونی کالوس جنین‌زا تولید کردند. بیشترین تعداد جنین‌های کروی در محیط حاوی ۱ میلی‌گرم NAA حاصل شد. بالاترین درصد نمو جنین‌های کروی به جنین‌های لپه‌ای در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم NAA تعلق داشت. در بین انواع ریزنمونه‌ها و ارقام، بیشترین تعداد جنین‌های کروی و بیشترین درصد نمو جنین‌های کروی به جنین‌های لپه‌ای در ریزنمونه برگ و رقم پاروس تشکیل شد.

واژه‌های کلیدی: توت فرنگی، جنین‌زایی رویشی، ریزنمونه، کالوس، NAA.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۳۵۸۱۲۸ – ۰۸۳۱ ،پست الکترونیکی: mgerdakaneh@gmail.com

مقدمه

توت فرنگی (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) یک گونه اکتاپلویید (۲n = ۸x = ۵۶) از جنس *Fragaria* و متعلق به تیره گلسرخیان می‌باشد(۱۴). میوه آن غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند الاجیک اسید و فلاونویید است که خطر عوارض قلبی– عروقی را کاهش می‌دهد و دارای اثرات ضد میکروبی، خواص ضد ویروسی و ضد سرطانی است (۱۵ و ۲۱).

جنین‌زایی رویشی بر خلاف جنین‌زایی تخمی که ترکیب گامت‌ها منجر به تشکیل جنین می‌شود، از سلولهای رویشی ایجاد می‌گردد و جنین‌های سوماتیکی بالغ بر خلاف جنین‌های تخمی فاقد دوره خواب بوده و بلافاصله پس از قرار دادن روی محیط کشت مناسب جوانه زده و تولید گیاه می‌کنند (۳ و ۲۹). اما از جنبه‌های مختلفی شبیه جنین‌های تخمی می‌باشند (۸) و ممکن است توسط آنها موضوعات گوناگون مرتبط با فرایند جنین‌زایی تخمی مورد مطالعه قرار گیرد.

جنین‌زایی رویشی هنگامی که با برنامه اصلاح نبات کلاسیک و مولکولی تلفیق شود یک ابزار با ارزشی را برای بهبود خصوصیات ژنتیکی گونه گیاهان تجاری فراهم می‌نماید (۳۳ و ۳۶) و مدلی برای مطالعه فرایندهای سلولی و تمایزیابی، رویدادهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان عالی فراهم می‌کند و برای استفاده در بیوتکنولوژی نظیر بذرهای مصنوعی و حفظ ژرم‌پلاسم، ریزازدیادی و گیاهان تراریخت پتانسیل بسیار بالایی دارد (۳ و ۲۹).

در میان سیگنال‌هایی که به طور مستقیم در تنظیم مراحل مختلف جنین‌زایی شرکت می‌کنند، هورمونهای گیاهی مهمترین نقش را دارند. در جنین‌زایی رویشی اغلب از اکسین‌های مصنوعی استفاده می‌شود. این تنظیم‌کننده‌های رشد، نقش کلیدی در القاء جنین‌زایی رویشی دارند و می‌توانند از طریق فعالیت اکسینی قوی‌شان با نفوذ و تأثیرگذاری در متابولیسم درونی سایر فیتوهورمون‌ها، جنین‌زایی رویشی را به طور مستقیم یا غیرمستقیم تنظیم کنند (۸ و ۲۹).

اگرچه باززایی گیاه توت فرنگی از طریق اندام‌زایی گزارش شده است، اما تنها چند مطالعه بر روی القاء جنین رویشی این گیاه انجام شده است و کارایی جنین‌زایی رویشی توت فرنگی نسبتا پایین است (۷، ۱۰ و ۱۱)؛ به‌طوری‌که بعضی از مشکلات تکنیکی آن هنوز مرتفع نشده است (۲۴) و پژوهش‌ها در خصوص جنین‌زایی رویشی توت فرنگی هنوز در مرحله اولیه است و تلاش‌های بیشتری به‌منظور توسعه این فناوری مورد نیاز خواهد بود (۴ و ۱۲). بنابراین این تحقیق به‌منظور تعیین مناسبترین غلظت NAA و ریزنمونه اندام‌های مختلف جهت بهبود کارایی جنین‌زایی رویشی توت فرنگی اجرا شده است.

مواد و روشها

این تحقیق به‌منظور بررسی جنین‌زایی رویشی توت فرنگی در سال ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه کردستان اجرا شد. ابتدا ریزنمونه‌های پهنک برگ، گره، دمبرگ، پرچم و جوانه گل ارقام توت فرنگی برای تشکیل کالوس در محیط ۴ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند. پس از ۴ هفته کالوس‌های این اندام‌ها را جهت القای جنین‌زایی رویشی بر روی محیط کشت MS حاوی ۰/۸٪ آگار و pH = ۵/۸، ۳ درصد ساکارز همراه با NAA در چهار غلظت مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر منتقل شدند. کالوس اندام‌های مختلف به وزن حدود ۵۰ میلی‌گرم بر روی محیط کشت منتقل گردیدند. در هر پتری‌دیش ۶ ریزنمونه کالوس کشت گردید.

به‌منظور جنین‌زایی، کشت‌ها در اتاقک رشد و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵٪ در شرایط تاریکی نگهداری شدند. هر ۴ هفته کالوس‌ها در محیط‌های با ترکیب هورمونی قبلی واکشت شدند. در طی این مرحله از جنین‌زایی، تغییرات مورفولوژیکی کالوس‌ها، درصد کالوس‌های جنین‌زا و تعداد جنین‌های مرحله کروی یادداشت‌برداری و ثبت گردید. سپس کالوس‌های دارای جنین کروی در محیط‌های کشت با ترکیب هورمونی قبلی واکشت شدند و تعداد جنین‌ها در مرحله قلبی، اژدری و مرحله لپه‌ای در هر ریزنمونه شمارش و ثبت شد. در طی مرحله جنین‌زایی، تعداد جنین‌های رویشی تولید شده در مراحل کروی، قلبی، اژدری‌شکل و لپه‌ای با استفاده از دستگاه استرئومیکروسکوپ شمارش و عکس‌برداری شدند.

جوانه‌زنی جنین‌های رویشی: برای جوانه‌زنی، جنین رویشی مرحله لپه‌ای را به محیط پایه MS حاوی ۳٪ ساکارز و ۱ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک (GA_3) انتقال داده شد و در اتاقک رشد در شرایط نور ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سازگار کردن گیاهچه: گیاهچه‌های ریشه‌دار شده ارقام کردستان، پاروس و کامارسا را به دقت از محیط کشت جداسازی کرده و بتدریج با آب ملایم برای حذف بقایای محیط کشت چسبیده به ریشه‌ها شسته شدند و در محلول ۱ درصد قارچ‌کش به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قبل از انتقال ضدعفونی شده و به سینی کاشت با ترکیب پرلایت و پیت به نسبت ۲ به ۱ انتقال داده شدند و این گیاهان به مدت ۲ هفته در اتاقک رشد در دمای ۱ ± ۲۰ درجه سانتی‌گراد، با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، با رطوبت ۹۰ درصد نگهداری گردیدند. سپس آنها را به

گلدانهای پلی‌اتیلن سیاه رنگ حاوی خاک باغچه، پیت و ماسه استریل به نسبت ۱:۱:۱ منتقل نموده و در گلخانه با رطوبت نسبی ۷۵ تا ۸۰ درصد نگهداری شدند و برای جلوگیری از دست دادن سریع رطوبت گیاهان کشت شده در گلدان با کیسه‌های پلی‌اتیلن شفاف پوشانده شدند؛ بعد از ۲ هفته گوشه بالایی کیسه پلی‌اتیلن بریده شد و رطوبت نسبی گلخانه تا ۶۰ درصد کاهش یافت تا گیاهان بتدریج در معرض شرایط محیطی بیرون قرار بگیرند.

در این تحقیق داده‌های حاصل از یادداشت‌برداری صفات مختلف بر اساس روش آماری فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل گردید. مقایسات میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمـــال ۵٪ انجام شد و برای انجام تجزیه‌های آماری از نرم‌افزارهای SAS استفاده گردید.

نتایج

القاء کالوس جنین زا در محیط های کشت مورد استفاده بعد از ۸ هفته مشاهده شد. تشکیل کالوس جنین زا با توجه به نوع ریزنمونه متفاوت بود. در بین اندام های مختلف، کالوس های ریزنمونه پهنک برگ، گره و جوانه گل تشکیل کالوس های جنین زای بیشتری نمودند. در مقابل کالوس جنین زا در ریزنمونه پرچم و دمبرگ در غلظت های مختلف NAA به ندرت تشکیل شد

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های **NAA** بر جنین‌زایی رویشی ریزنمونه‌های مختلف ارقام توت فرنگی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات(MS)		
		درصد تشکیل کالوس‌های جنین‌زا	تعداد جنین کروی در هر ریزنمونه	درصد تشکیل جنین‌های لپه‌ای
رقم (C)	۲	۳۳۲/۵۴**	۰/۷۰**	۱۸/۸۹**
ریزنمونه (O)	۲	۴۴۱/۲۴**	۳/۶۵**	۳۴۶/۷۵**
(N)NAA	۳	۵۶۱۷/۷۷**	۲۴/۸۶**	۸۵۶/۵۵**
C × O	۴	۷۲/۶۴**	۰/۲۴**	۷/۰۵**
C × N	۶	۵۵/۲۲**	۰/۲۸**	۱/۹۲ns
O × N	۶	۹۳/۰۵**	۰/۳۸**	۹/۸۸**
C × O × N	۱۲	۳۹/۶۰**	۰/۲۲**	۲۰/۰۳**
خطای آزمایش	۱۰۸	۱/۴۳	۰/۰۲	۱/۸۵
CV	-	۴/۴۶	۷/۶۹	۶/۲۰

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

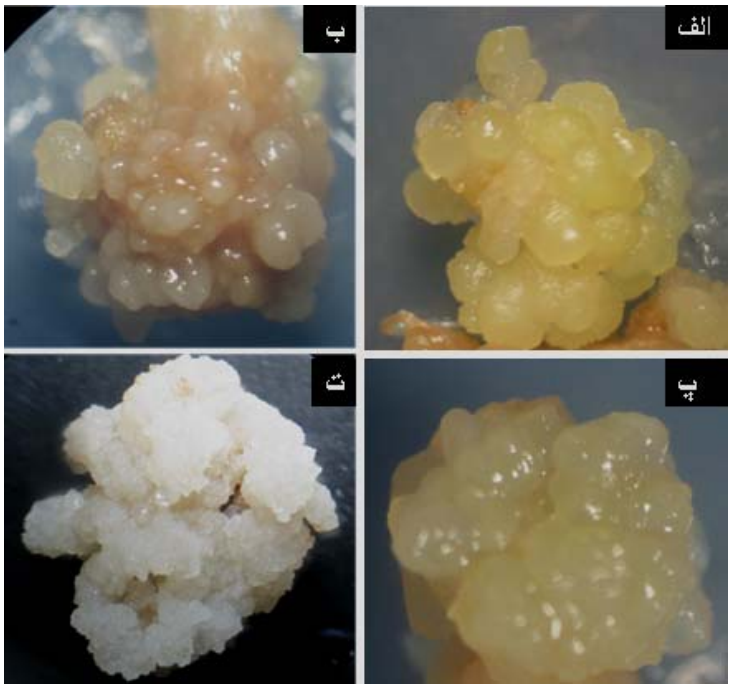
در محیط های کشت مختلف کالوس اندام های مختلف ارقام توت فرنگی از نظر شکل، بافت و رنگ با هم متفاوت بودند. در تیمار های مختلف دو نوع کالوس جنین زا و غیرجنین زا مشاهده شد. کالوس های گره دار و فشرده کالوس های جنین زا بودند. در مقابل کالوس های غیرجنین زا کلوخه ای و ترد و شکننده و اندازه آنها بسیار بزرگتر از کالوس های جنین زا بود. کالوس های جنین زا و غیرجنین زا از طریق رنگ شان نیز قابل تشخیص بودند. کالوس جنین زا رنگ قهوه ای ، یا سفید مایل به لیمویی داشتند ولی کالوس غیرجنین زا رنگ پریده و دارای رنگ سفید مایل به خاکستری بودند (شکل۱). ۲ تا ۳ هفته پس از انتقال کالوس های جنین زا، جنین های کروی بر روی آنها تشکیل شد. و ۳ تا ۴ هفته پس از واکشت کالوس های دارای جنین کروی، جنین های لپه ای نمو یافتند. بر روی برخی جنین های اولیه جنین های 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 غیرهمزمان

است(شکل۲ ب). با طولانی شدن زمان کشت، تعداد جنین های تشکیل شده افزایش یافت. ولی تمام قسمت های کالوس های جنین زا قابلیت تولید جنین کروی را نداشتند.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف **NAA** بر جنین‌زایی رویشی ریزنمونه‌های مختلف ارقام توت

NAA (mg/l)	درصد تشکیل کالوس‌های جنین‌زا			تعداد جنین کروی در هر ریزنمونه			درصد تشکیل جنین‌های لپه‌ای		
	کردستان	پاروس	کامارسا	کردستان	پاروس	کامارسا	کردستان	پاروس‌کامارسا	
ریزنمونه برگ									
۰/۲۵	۵/۲۵^{s}	۱۱/۲۵^{pq}	۱۲/۵۰^{p}	۰/۸۷^{m}	۱/۱۵^{l}	۱/۰۰^{lm}	۲۳/۳۷^{hi}	۲۶/۳۰^{ef}	۲۴/۳۲^{gh}
۰/۵	۲۵/۰۰^{klm}	۳۳/۷۵^{fg}	۲۷/۲۵^{ij}	۲/۰۰^{hi}	۲/۷۰^{de}	۲/۶۲^{de}	۲۹/۴۰^{bc}	۳۰/۶۷^{ab}	۳۱/۶۲^{a}
۱	۳۹/۸۵^{c}	۵۵/۰۰^{a}	۴۲/۲۵^{b}	۳/۰۵^{c}	۳/۳۵^{b}	۳/۸۷^{a}	۲۵/۴۵^{f}	۲۸/۳۲^{c}	۲۳/۲۷^{i}
۲	۳۶/۵۰^{de}	۴۲/۷۵^{b}	۳۲/۰۰^{gh}	۲/۳۲^{f}	۲/۳۲^{f}	۲/۵۷^{e}	۱۹/۳۷^{mno}	۲۰/۵۰^{klm}	۱۷/۵۰^{op}
ریزنمونه گره									
۰/۲۵	۹/۰۰^{r}	۱۰/۹۰^{pq}	۸/۶۷^{r}	۰/۹۰^{lm}	۱/۰۷^{lm}	۰/۸۵^{m}	۲۲/۴۷^{ij}	۱۹/۴۰^{mno}	۲۱/۴۲^{jkl}
۰/۵	۲۰/۷۵^{n}	۲۴/۲۵^{lm}	۲۵/۰۰^{klm}	۲/۰۵g^{hi}	۲/۳۰^{fg}	۲/۲۷^{fg}	۲۷/۴۲^{de}	۲۸/۲۷^{c}	۲۵/۳۷^{fg}
۱	۳۸/۰۰^{d}	۴۰/۱۵^{c}	۳۵/۲۵^{ef}	۲/۸۲cd	۳/۳۵^{b}	۲/۷۰^{de}	۱۷/۵۰^{op}	۱۹/۶۷^{lmn}	۲۰/۷۰^{klm}
۲	۳۱/۰۰^{h}	۲۸/۵۰^{i}	۳۳/۷۵^{fg}	۱/۹۲^{hij}	۲/۰۷^{ghi}	۲/۳۲^{f}	۱۳/۴۵^{r}	۱۸/۵۵^{no}	۱۵/۵۷^{p}
ریزنمونه جوانه گل									
۰/۲۵	۹/۸۰^{qr}	۹/۵۰^{qr}	۱۶/۰۰^{o}	۰/۹۷^{lm}	۰/۶۰^{n}	۱/۰۰^{lm}	۱۷/۴۰^{p}	۲۱/۶۰^{jk}	۱۸/۵۰^{no}
۰/۵	۲۳/۲۵^{m}	۲۶/۲۵^{jk}	۲۰/۰۷^{n}	۱/۵۷^{k}	۱/۷۲^{jk}	۲/۰۰^{hi}	۲۵/۵۰^{f}	۲۸/۳۷^{c}	۲۷/۳۲^{de}
۱	۳۱/۲۵^{h}	۴۰/۰۰^{c}	۳۴/۷۵^{ef}	۲/۳۰^{fg}	۲/۹۵^{c}	۲/۱۵^{fgh}	۲۰/۲۷^{lm}	۱۷/۵۵^{op}	۲۱/۶۷^{jk}
۲	۲۶/۰۰^{jkl}	۳۴/۵۰^{f}	۲۵/۰۰^{klm}	۲/۱۰^{ghi}	۱/۸۵^{ij}	۲/۰۰^{hi}	۱۵/۵۷^{p}	۱۲/۵۰^{r}	۱۳/۷۲^{q}
میانگین	۲۴/۶۳C	۲۹/ ۷۳A	۲۶/۰۴B	۱/۹۰C	۲/۱۲A	۲/۱۱B	۲۱/۴۳C	۲۲/۶۴A	۲۱/۷۵B

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



شکل ۱- الف: کالوس جنین‌زای ریزنمونه برگ؛ ب: کالوس جنین‌زای ریزنمونه گره؛ پ: کالوس جنین‌زای ریزنمونه جوانه گل؛ ت- کالوس غیرجنین‌زای ریزنمونه پرچم.

شکل ۲- اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد **NAA** بر مراحل جنین‌زایی رویشی. الف- (شکل ۱ الف). ب- مراحل اولیه جنین‌های کروی حاصل از محیط ۱ میلی‌گرم **NAA**. پ- نمو جنین در محیط ۰/۵ میلی‌گرم **NAA**. ت- جوانه‌زنی جنین‌های لپه‌ای در محیط ۱ میلی‌گرم در لیتر **GA_3**. ث- مقاوم‌سازی گیاهچه در اتاقک رشد. ج- مقاوم‌سازی گیاهچه‌ها در گلخانه.

اثر NAA بر جنین زائی رویشی: در جدول (۱) نتایج حاصل از تجزیه واریانس درصد تشکیل کالوس های جنین زا، تعداد جنین های کروی در هر ریزنمونه و درصد تشکیل جنین های لپه ای در ریزنمونه اندام های مختلف توت فرنگی ارقام کردستان، کامارسا و پاروس را نشان می‌دهد. سطوح مختلف تنظیم کننده رشد بر روی صفات مورد بررسی سبب بروز اثرات معنی‌داری (P<۰/۰۱) گردیده بود. همچنین ارقام و نوع ریزنمونه در صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۱) با یکدیگر داشتند. اثر متقابل دوگانه و سه گانه بین ریزنمونه ها، ارقام و ترکیبات تنظیم کننده رشد مورد مطالعه روی درصد تشکیل کالوس های جنین زا، تعداد جنین های کروی در هر ریزنمونه و درصد تشکیل جنین های لپه ای بسیار معنی‌دار (P<۰/۰۱) می باشد.

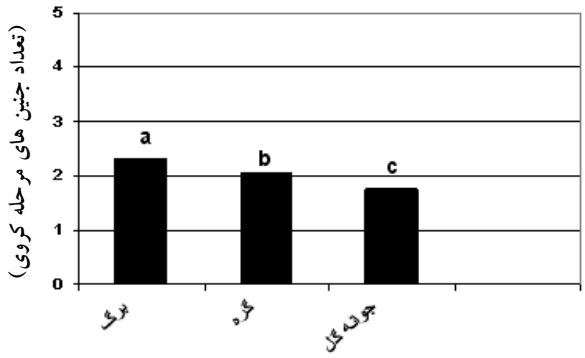
مقایسه میانگین ها به روش آزمون چند دامنه دانکن نشان داد که از نظر درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین های مرحله کروی در هر ریزنمونه اختلاف معنی داری در بین تیمار های NAA مشاهده می شود (جدول۲). نتایج نشان داد با افزایش غلظت NAA از ۰/۲۵ میلی گرم تا ۱ میلی گرم در لیتر، درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین های مرحله کروی در هر ریزنمونه نیز افزایش پیدا کرد. افزایش غلظت NAA سبب افزایش این صفات در همه ریزنمونه ها و در هر سه رقم شد به نحوی که حداکثر درصد تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین های مرحله کروی در هر ریزنمونه در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر این تنظیم کننده رشد حاصل شد. با افزیش غلظت NAA بیش از ۱ میلی گرم موجب کاهش این صفات شد. به نحوی که در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر NAA، درصد

تشکیل کالوس جنین زا و تعداد جنین های مرحله کروی در هر ریزنمونه کاهش پیدا نمود.

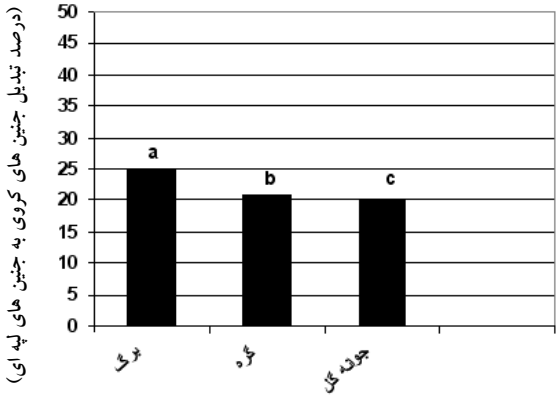
هنگامی که جنین های مرحله کروی در محیط های کشت قبلی زیر کشت شدند پس از ۳ تا ۴ هفته به مرحله لپه ای توسعه و نمو پیدا کردند. درصد جنین های مرحله کروی که در غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد به مرحله لپه ای نمو یافته اند درجدول (۲) نشان داد که محیط های کشت مختلف اثرات متنوعی بر نمو و بلوغ جنین های رویشی و رسیدن آنها به مرحله لپه ای دارند. به نحوی که در غلظت کم تنظیم کننده رشد (۰/۵ میلی گرم در لیتر) نمو جنین مرحله کروی به جنین مرحله لپه ای را به طور معنی داری افزایش یافت. در مقابل غلظت های بالا این تنظیم کننده رشد (۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) توسعه جنین را به شدت کاهش داد.

اثر رقم بر جنین زائی رویشی: نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که پاسخ به تشکیل کالوس جنین زا، جنین های 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 جنین زا، تعداد جنین های مرحله کروی و درصد تشکیل جنین لپه ای بیشتری داشت (جدول۲).

اثر ریزنمونه بر جنین زائی رویشی: مقایسه میانگین داده ها نشان داد که از نظر درصد تشکیل کالوس جنین زا، تعداد جنین کروی و نمو جنین در بین ریزنمونه اندام های مختلف اختلاف معنی داری ($P < ۰/۰۵$) وجود دارد. و این صفات به طور قابل ملاحظه ای تحت تاثیر نوع ریزنمونه قرار گرفتند (جدول ۲ و نمودار۱). به نحوی که از پنج نوع ریزنمونه، ریزنمونه های پرچم و دمبرگ، کالوس جنین زا تولید نکردند بنابراین از تجزیه آماری آنها صرف نظر شد. قطعات پهنک برگ حداکثر میزان جنین زائی در هر سه رقم داشتند. ریزنمونه های گره جنین زائی متوسطی داشته در حالیکه ریزنمونه های جوانه گل کمترین جنین زائی را ایجاد نمودند (نمودار۲).



نمودار ۱- اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد **NAA** و ریزنمونه بر القاء جنین‌های مرحله کروی



نمودار ۲- اثر غلظت تنظیم‌کننده رشد **NAA** و ریزنمونه بر توسعه جنین‌های مرحله کروی

جوانه زنی جنین های لپه ای: برای باززائی گیاهان کامل، جنین رویشی مرحله لپه ای را به محیط پایه MS حاوی ۳ ٪ 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 ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند، میانگین میزان جوانه زنی جنین های رویشی در حدود ۶۵ تا ۶۷ درصد برای هر سه رقم بود.

سازگار کردن گیاهچه: گیاهان حاصل از جنین های رویشی (شکل۱ت) به منظور سازگار کردن، در سینی های کشت حاوی پیت و پرلیت سترون به نسبت (۱:۲) در اتاقک رشد تحت نور ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت

تاریکی در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۹۰-۹۵ ٪ پس از ۴ هفته ۸۵ تا ۹۰ درصد گیاهچه ها زنده ماندند و به صورت طبیعی رشد نمودند (شکل ۱ث).

پس از ۲ هفته نگهداری در اتاقک رشد آنها را به گلدان های پلی اتیلن سیاه رنگ حاوی خاک باغچه، پیت و ماسه استریل به نسبت ۱:۱:۱ منتقل نموده و در گلخانه با رطوبت نسبی ۷۵ تا ۸۰ درصد نگهداری شدند و برای جلوگیری از دست دادن سریع رطوبت، گیاهان کشت شده در گلدان با کیسه های پلی اتیلن شفاف پوشانده شدند بعد از دو 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. پس از ۴ هفته ۷۵ تا ۸۰ درصد گیاهچه ها زنده ماندند و به صورت طبیعی رشد نمودند (شکل ۱ ج).

بحث

تشکیل کالوس جنین زا بستگی به نوع ریزنمونه دارد. طبق نظریه Newman و همکاران (۱۹۹۶) تمام گیاهان جنین‌زا می‌باشند. بنابراین باید ریزنمونه و بافت مناسب جنین زایی در گیاه را پیدا نمود. کرمی و همکاران (۲۰۰۶) نیز گزارش نمودند که در بین اندام های مختلف میخک فقط ریزنمونه گلبرگ قابلیت جنین زائی دارد. گزارش شده که در محیط های کشت مختلف کالوس اندام های گیاهی از نظر شکل، بافت و رنگ با هم متفاوت می باشند(۴). قابلیت جنین زایی در کالوس ها یکسان نیست. گزارش ها نشان می دهد که فقط کالوس های کروی و با سطح نرم قابلیت جنین زایی داشته و کالوس های زبر و خشن و شکننده و نیمه شفاف (مات)، قابلیت جنین زایی ندارند (۱۷ و ۳۰). گزارش شده که اگر چه خاصیت همه توانی یک صفت بسیار مهم در گیاهان محسوب می شود ولی سلول ها در شرایط خاص، قابلیت آن را دارند. حتی زمانی که تصور می شود همه سلول ها بطور مساوی قابلیت همه توانی دارند ولی تعداد جنین های تشکیل شده در مقایسه با تعداد سلول های توده سلولی، بسیار ناچیز است و بخش محدودی از سلول ها، تشکیل جنین های رویشی می دهند و مناطق خاصی از توده سلولی، قابلیت جنین زایی رویشی را دارند (۲۹ و ۳۴).

بنابراین نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می دهد که جنین زائی به نوع محیط کشت، ریزنمونه و رقم بستگی دارد. سایر محققان نیز گزارش نمودند که نوع و غلظت تنظیم کننده های رشد و وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه، مهمترین عواملی هستند که در جنین زایی و اندام زائی نقش دارند(۱ و ۳۱). در میان عواملی که به طور مستقیم در تنظیم مراحل مختلف جنین زائی شرکت می کنند، تنظیم کننده های رشد مهمترین نقش را دارند (۱۷). به نظر می رسد ایجاد یک شیب اکسین برای ایجاد تقارن دو طرفه طی مراحل اولیه جنین زایی لازم باشد (۳۲). Lim و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند که غلظت بالای هورمون های اکسین بیوسنتز اتیلن را افزایش می دهند و اتیلن باعث پیری اندام های گیاهی می شود. در بیشتر دستورالعمل هایی که اکسین به عنوان یک القاء کننده کارآمد جنین زایی رویشی عمل می کند، توسعه جنین رویشی از طریق کاهش و یا حذف اکسین از محیط کشت بدست می آید. بنابراین پیشنهاد شده که در طول جنین زایی رویشی از قرار دادن مستمر ریزنمونه ها در معرض سطوح بالای اکسین جلوگیری شود (۳۵).

در بسیاری از گونه های گیاهی ژنوتیپ های 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 (۱۸ و ۲۰). مقایسه خصوصیات ژنتیکی کولتیوارهای توت فرنگی نشان می دهد که تفاوت ژنتیکی در بین کولتیوارهای مختلف تعیین کننده قابلیت باززایی و جنین زائی آنها می باشد (۱۰، ۱۱ و ۲۷). این اختلاف ناشی از حساسیت ارقام به محیط کشت جنین زایی می باشد (۲۵) که در سایر گیاهان نظیر گندم نیز

مشاهده شده است (۲). Biswas و همکاران (۲۰۰۷) در محیط القاء جنین زائی اختلاف شدیدی در بین ریزنمونه اندام های مختلف توت فرنگی مشاهده نمودند آنها پیشنهاد کردند که این اختلاف ممکن است به تفاوت وضعیت فیزیولوژیکی ریزنمونه نسبت داده شود. اختلاف قابلیت جنین زائی دربین اندام ها در سایر گونه های گیاهی نظیر میخک (۱۸)، گونه ای کاکتوس (۱۹)، خیار (۱۸)، (۲۳) گزارش شده است.

در اواخر دوره توسعه جنین زایی رویشی، در برخی گونه ها به طور معمول دارای خواب می باشند، و اضافه نمودن GA_3، جوانه زنی و تبدیل جنین رویشی به گیاهان را ارتقاء می بخشد (۹).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 عادت کردن به آب هوای جدید در گلخانه و یا مزرعه می باشد (۲۸). این مشکل به دلیل ظرفیت فتوسنتز پایین در شرایط کشت در شیشه 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 (۱۶). Debnath (۲۰۰۵ و ۲۰۰۶) نیز گزارش نمود که جهت جلوگیری از بین رفتن ریز قلمه ها، هنگام انتقال از شرایط کشت این ویترو باید آنها را به تدریج به شرایط محیط وفق داد ولی نباید تغییر ناگهانی در رطوبت نسبی، درجه حرارت و یا تابش نور رخ دهد.

نتیجه‌گیری

القاء جنین رویشی در گیاه توت فرنگی به فاکتورهای مختلفی نظیر کولتیوار، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و نوع ریزنمونه بستگی دارد. نوع ریزنمونه در جنین‌زایی رویشی نقش بسزایی دارد و تشکیل کالوس جنین‌زا با توجه به نوع ریزنمونه متفاوت می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود جهت بهبود وضعیت جنین‌زایی رویشی ریزنمونه مناسبی انتخاب شود. همچنین از نظر جنین‌زایی رویشی ارقام اختلاف قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر دارند که حکایت از وجود تنوع ژنتیکی در بین آنها دارد.

منابع

۱- تشکری میانرودی، ح.، کریمی، ف.، تقی زاده.، (۱۳۹۰) ریزازدیادی گیاهچه های تاتوره تماشایی (*Datura innoxia*) با استفاده از IAA و BA و افزایش محتوای تروپان آلکالوئید گیاهچه ها تحت تأثیر تیمار با پوترسین. مجله زیست شناسی ایران. دوره ۲۴، شماره ۳: ۳۵۵- ۳۶۵.

۲- شیردل مغانلو، ح.، معینی، ا.، موسوی، ا.، (۱۳۹۰) بررسی اثرات رقم، پیش تیمار و محیط کشت القاء رویان زایی در کشت میکروسپورهای جدا شده گندم هگزاپلوئید. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۴، شماره۶: صفحه ۷۹۹-۷۸۹.

3- Benelli, C., Fabbri, A., Grassi, S., Lambardi, M. and Rugini, E. 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). J Hortic Sci Biotechnol 76:112–119.

4- 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.

5- Debnath, S.C. 2005. Strawberry sepal: another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant 41, 671-676.

6- Debnath S.C. 2006. Zeatin overcomes thidiazuron-induced inhibition of shoot elongation and promotes rooting in strawberry culture in vitro. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 81, 349-354.

7- 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.

8- 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.

9- 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.

10- 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.

11- 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 DOI 10.1007/s11738-011-0725-9.

12- 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, pp 456-474

13- 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.

14- Hancock, JF. 1999. Strawberries. CABI Publishing, New York, NY 237pp.

15- Hannum, S.M. 2004. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. Crit Rev Food Sci Nutr 44:1–17.

16- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia Horticulturae, Volume 108, 2, 10, 105-120.

17- Jimenez, V.M, Bangerth, F. 2001. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and nonembryogenic cultures of carrot. Physiol Plant 111:389– 395.

18- 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.

19- Karimi, N., Mofid, M. R., Ebrahimi, M. and Khayyam Nekouei, S. M. 2010. Effect of genotype, explant size and position on callus induction in (*Cereus peruvianus* MILL.) Trakia Journal of Sciences, Vol. 8, No. 1, pp 33-37.

20- Karimi, K. G. and Karami, O. 2008. Picloram-Induced Somatic Embryogenesis in Leaves of Strawberry (*Fragaria ananassa* L.). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanic. 50.1: 69–72.

21- Kirti, T. and Pitre, K.S. 2008. Polarographic (DCP & DPP) determination of ellagic acid in Strawberries. Pharmaceutical Formulations Journal of the Chinese Chemical Society, , 55, 143-146.

22- 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,

23- Mashayekhi, K., Sharifani, M., Shahsavand, M. and Kalati, H. 2008. Induction of somatic embryogenesis in absence of exogenous auxin in cucumber (Cucumis sativus L.) International Journal of Plant Production 2 (2), (Print), 1735-8043

24- 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. (ISHS) 649:107-110.

25- 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

26- 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. 157.5: 554-560.

27- 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

28- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., Plzáková, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. Biol. Plant. 42, 481-497.

29- 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.

30- Quiroz-Figueroa, F.R., Fuentes-Cerda, C.F.J., Rojas- Herrera, R. and Loyola-Vargas, V.M. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different

somatic embryogenesis systems of Coffea arabica. Plant Cell Rep. 20:1141-1149.

31- Rojas-Herrera, R., Quiroz-Figueroa, F.R., Monforte-Gonza ´ lez, M., Sa´nchez-Teyer, F. and Loyola-Vargas, V.M. 2002. Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L., revealed by RT-PCR differential display. Mol Biotechnol 21:43–50.

32- 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.

33- 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.

34- 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.

35- 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.

36- 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.

The effect of NAA and different explants on Secondary somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.)

Gerdakaneh M. and Arji I.

Agricultural and Natural Resource Research Center of Kermanshah, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

The present investigation was conducted to study the effects of different concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) on somatic embryogenesis induction, development and maturation of three strawberry (Kurdistan, Parose and Camarosa) cultivars. For this purpose, leaf blade, nodal, petiole, stamen and flower bud calli were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented NAA at 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/l. The concentration of growth regulator, cultivar and explant type were found critical to somatic embryogenesis induction, development and maturation. Results obtained from the studies revealed that all explants exception of petiole and stamen incubated on medium formed embryonic calli. MS medium supplemented 1 mg/l NAA yielded the highest percentage of embryonic calli and number of embryos globular stage and 0.5 mg/l NAA yielded the highest number of embryos cotyledonary stage in all types of explants. The leaf explant calli and Paros cultivar were the most responsive to produce to somatic embryogenesis induction, development and maturation.

Key words: Strawberry, somatic embryogenesis, explant, callus, NAA.