



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 توت، 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 تنهایی 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 سیگنال‌هایی که به طور مستقیم در تنظیم مراحل مختلف جنین زایی 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 سیتوکینین ها در القاء جنین زایی رویشی نقش داشته اند، همراه با اکسین به محیط کشت افزوده شده اند (۵). در این مرحله، بازدارنده‌های سیتوکینین، به شدت مانع جنین زایی رویشی سلول‌های اپیدرمی در هویج می شود (۲۹). سیتوکینین 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 زایی بسیار مشکل است و تا کنون مطالعات کمی در خصوص جنین زایی رویشی توت فرنگی صورت گرفته است

۳۱- محقق و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان
(Email: amozafari@uok.ac.ir * - نویسنده مسئول)

جوانه زنی جنین‌های رویشی

برای جوانه زنی جنین‌های رویشی، جنین‌های رویشی مرحله لپه ای به محیط کشت پایه MS حاوی ۳ ساکارز و ۱ میلی گرم در لیتر GA_3 انتقال داده شدند و در اتاقک رشد در شرایط نور ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای 1 ± 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سازگار کردن گیاهچه‌ها

گیاهچه‌های ریشه دار شده ارقام کردستان، پارس 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 ریشه‌ها 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 پرلاپت و پیت به نسبت ۲ به ۱ انتقال داده شدند و این گیاهان به مدت ۲ هفته در اتاقک رشد در دمای 1 ± 20 درجه سانتی‌گراد، 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 کاملاً 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 (جدول ۲ و ۴) القاء کالوس جنین‌ها بعد از ۸ هفته مشاهده شد. تشکیل کالوس‌های جنین‌ها 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 جنین‌ها در ریزنمونه پرچم و دم‌برگ در تیمارهای مختلف تنظیم کننده‌های

(۳) و بعضی از مشکلات تکنیکی آن هنوز مرتفع نشده است (۱۸) و پژوهش‌ها در خصوص جنین‌زایی رویشی توت فرنگی هنوز در مرحله اولیه است و تلاش‌های بیشتری به منظور توسعه این فن‌آوری مورد نیاز خواهد بود (۱ و ۸). این مطالعه می‌تواند زمینه تولید گیاهان تراریخت، گزینش در شرایط این ویترو، تولید بذرهای مصنوعی و حفظ ژرم پلاسما را فراهم کند. بنابراین این تحقیق به منظور تعیین مناسب‌ترین غلظت، نوع تنظیم کننده‌های رشد و ریزنمونه اندام‌های مختلف جهت بهبود کارایی جنین‌زایی رویشی توت فرنگی اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به منظور بررسی جنین‌زایی 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، پارس 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 ریزنمونه‌ها به محیط کشت MS حاوی ۰/۸٪ آگار و $pH = 5/8$ ، ۳ درصد ساکارز و ترکیبات هورمونی 2,4-D در چهار غلظت مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و 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 کشت‌ها به مقدار ۲۵ میلی لیتر در هر پتری دیش با قطر ۱۰ سانتی‌متر 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 جنین‌زایی، کشت‌ها در اتاقک رشد و در دمای 1 ± 25 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. هر ۴ هفته کالوس‌ها در محیط کشت‌های با ترکیب هورمونی قبلی واکشت شدند. در طی این مرحله از جنین‌زایی، تغییرات مورفولوژیکی کالوس‌ها، 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 جنین‌ها در مرحله قلبی، نیزه ای و مرحله لپه ای در هر کالوس شمارش و ثبت شد. در طی مرحله جنین‌زایی، تعداد جنین‌های رویشی تولید شده در مراحل کروی، قلبی، اژدری شکل و کوتیلدونی، با استفاده از دستگاه استرئومیکروسکوپ، شمارش و عکس‌برداری شدند.

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

جنین‌های کروی ۱۴ تا ۲۱ روز پس از انتقال کالوس‌های جنین‌ها به محیط کشت بر روی آنها تشکیل شد ولی تمام قسمت‌های کالوس‌های جنین‌ها قابلیت تولید جنین کروی نداشتند. جنین‌های لپه ای، ۲۱ تا ۲۸ روز پس از واگشت کالوس‌های دارای جنین کروی، توسعه یافتند. بر روی برخی جنین‌های اولیه جنین‌های ثانویه تشکیل شد و مراحل مختلف جنین زائی رویشی به طور همزمان بر روی یک کالوس مشاهده نشد این امر نشان می‌دهد که جنین زائی رویشی در توت فرنگی یک پدیده غیر همزمان است (شکل ۱- پ). گزارش شده که اگر چه همه سلول‌ها 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 سلول‌ها، تشکیل جنین‌های رویشی می‌دهند. یک همبستگی بین نوع سلول و قابلیت جنین زائی وجود دارد و مناطق خاصی از توده سلولی، قابلیت جنین زائی رویشی را دارند (۱۴، ۲۶ و ۳۰).

نقش تنظیم کننده‌های رشد بر جنین زائی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف غلظت‌های 2,4-D از نظر درصد تشکیل کالوس جنین‌ها، 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 ریزنمونه‌ها به استثنای ریزنمونه پرچم و دم‌برگ، کالوس‌های

جنین‌ها و جنین‌های مرحله کروی شکل تولید نمودند. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۲) نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف غلظت‌های 2,4-D اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) از نظر درصد تشکیل کالوس جنین‌ها و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه وجود داشت. بر اساس نتایج به دست آمده، 2,4-D در القاء کالوس جنین‌ها و تشکیل جنین‌های کروی ریزنمونه‌ها مناسب بود. 2,4-D با فعالیت اکسینی قوی خود می‌تواند با نفوذ و تاثیر گذاری در متابولیسم درونی سایر فیتوهورمون‌ها، جنین زائی 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 جنین‌ها و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه نیز افزایش یافت به نحوی که حداکثر درصد تشکیل کالوس جنین‌ها 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 غلظت 2,4-D انجام می‌گیرد (۱).

اگر چه 2,4-D قادر به القای کالوس جنین‌ها و جنین‌های مرحله کروی است اما غلظت بالای آن بازدارنده این صفات بود. با افزایش غلظت این تنظیم کننده رشد بیش از ۱ میلی گرم موجب کاهش درصد تشکیل کالوس جنین‌ها و تعداد جنین‌های مرحله کروی در هر ریزنمونه شد (جدول ۲). به نظر می‌رسد ایجاد یک شیب اکسین برای ایجاد تقارن دو طرفه طی مراحل اولیه جنین زائی 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	درصد تشکیل کالوس‌های جنین‌ها	تعداد جنین‌های کروی در هر ریزنمونه	درصد تشکیل جنین‌های 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 ***: برتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪، ns = عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری

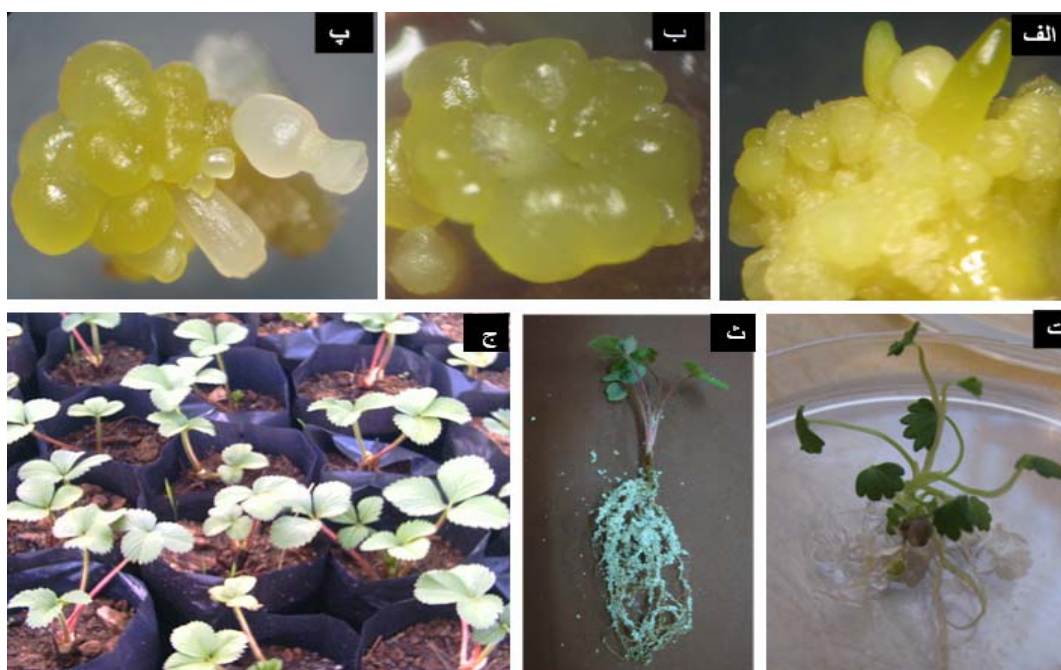
جدول ۲- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D بر جنین زائی رویشی ریزنمونه‌های مختلف ارقام توت فرنگی (کردستان، پاروس و کامارسا)

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

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 جنین‌ها 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 سیتوکینین (BA) در این ریزنمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف غلظت‌های BA از نظر درصد تشکیل کالوس جنین‌ها، 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 فاکتورها 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 سیتوکینین نقش مهمی در القای جنین رویشی توت فرنگی بازی می‌کند. در کشت بافت گیاهی، سایتوکینین‌ها عمدتاً در تقسیمات سلولی و تمایزبندی شاخه‌های نابجا از کالوس و بافت‌های گیاهی شرکت می‌کنند (۱۵).

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 در جدول ۲ و ۴ نشان داده شده است. در طی واکنش، 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 می‌کنند و برای حصول جنین زائی مطلوب، ترکیب تنظیم کننده‌های رشد مهمترین نقش را ایفا می‌کنند (۱ و ۲۳). 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 شکل ۱ ج). 2,4-D می‌تواند 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 گزارش‌ها نشان می‌دهد که غلظت بالای 2,4-D ممکن



شکل ۱- مراحل جنین زائی رویشی توت فرنگی. الف- کالوس جنین زائی 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

است ناشی از آنتاگونیسم بین اکسین و سیتوکینین باشد زیرا سیتوکینین خصوصاً در غلظت بالا، آنزیم ایندول استیک اسید اکسیداز را فعال می‌کند و یکی دیگر از دلایل که تیمار ترکیبی ممکن است منجر به کاهش پدیده میزان تشکیل کالوس جنین زا و جنین کروی در ریزنمونه‌ها شود این است که با در نظر گرفتن مکمل سیتوکینین بیرونی، نسبت کلی بین اکسین و سیتوکینین مناسب جهت تمایز یابی مجدد سلول کالوس از بین رفته و بافت کالوس تمایل به تشکیل شاخساره می‌نماید (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 ($P < 0/05$) افزایش داد. سیتوکینین 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، در جنین زائی مفید می‌باشد (۱۷). در مقابل محیط کشت حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BA در مقایسه با سایر غلظت‌ها، توسعه جنین‌های رویشی را به طور معنی داری کاهش داد (جدول ۴).

داده‌های مقایسه میانگین‌های جدول ۴ نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف سیتوکینین (BA) در ترکیب با اکسین (2,4-D) اثر معنی داری ($P < 0/05$) 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 سیتوکینین‌ها جنین زایی رویشی را القاء می‌کند، همراه با اکسین به محیط کشت افزوده می‌شوند (۵). به نظر می‌رسد سیتوکینین‌ها نقش مهمی در تقسیم سلولی بازی می‌کنند، 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 ریزنمونه‌های ارقام مورد مطالعه داشت. در همین راستا گزارش‌هایی مبنی بر اثر مثبت سیتوکینین در القای جنین رویشی در گیاهان مختلف وجود دارد. به طور مثال در القای جنین زایی رویشی پسته استفاده از سیتوکینین‌ها 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

جدول ۳ - 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	درصد تشکیل کالوس‌های جنین زا		تعداد جنین کروی در هر ریزنمونه	درصد تشکیل جنین‌های لپه ای
		کامارسا	پاروس		
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 ۴ - 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			تعداد جنین کروی در هر ریزنمونه			درصد تشکیل جنین‌های لپه ای		
	کامارسا	پاروس	کردستان	کامارسا	پاروس	کردستان	کامارسا	پاروس	کردستان
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	۲۵/۶۷n	۳۰/۰۰qqr	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	۰/۰۰s	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 (جدول 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 می‌باشند (۱۹). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که پاسخ به تشکیل کالوس جنین زا، جنین‌های مرحله کروی و درصد تشکیل جنین لپه

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 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 (شکل ۱) در سینی‌های کشت حاوی پیت و پرلیت در اتاقک رشد پس از ۴ هفته ۸۵ تا ۹۰ درصد گیاهچه ها زنده ماندند (شکل ۱). 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).

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 (جداول ۲ 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 زاء، تعداد جنین کروی و درصد تشکیل جنین لپه ای در بین ریزنمونه اندام‌های مختلف اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) 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 دمیرگ، کالوس جنین زاء 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

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- Feher 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 improving plant 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 proline 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 științifice U.Ș.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.