مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۹، شماره ۱، سال ۱۳۹۲

«مقاله کوتاه علمی»

اثر رقم، نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی آن بر کشت بساک توت‌فرنگی (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)

Effect of Cultivar, Medium and Plant Growth Regulators Composition on Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Anther Culture

روح‌اله شاه‌ولی کوه‌شور[۱]، احمد معینی[۲] و امین باقی‌زاده[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس، تهران (نگارنده مسئول)
۳- استادیار مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان، کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱۰

شاه‌ولی کوه‌شور، ر.، معینی، ا. و باقی‌زاده، ا. ۱۳۹۲. اثر رقم، نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی آن بر کشت بساک توت‌فرنگی (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). **مجله به‌زراعی نهال و بذر** ۲-۲۹ (۱): ۱۴۲-۱۳۷.

توت‌فرنگی یکی از گیاهان مهم اقتصادی در میان میوه‌های دانه ریز است که بازارپسندی بالایی دارد (Gruchala *et al.*, 2004; Bhatt and Dhar, 2000). فرآیند اصلاح توت‌فرنگی تجاری که اکتاپلوییـد می‌باشد به کندی صورت می‌گیرد زیرا این گیاه دارای هتروزیگوسیتی بالایی می‌باشد و تثبیت خصوصیات مفید آن به وسیله خویش‌آمیزی به دلیل پس‌روی ناشی از خویش‌آمیزی مشکل می‌باشد. بنابراین تولید درون‌شیشه‌ای گیاهان هاپلوییـد و دوبرابر کردن کروموزم‌های آن‌ها روشی سریع و مفید برای اصلاح توت‌فرنگی محسوب می‌شود (Sayegh and Hennerty, 1989). هدف از پژوهش حاضر، بررسی پاسخ به کشت بساک توت‌فرنگی می‌باشد و برای این منظور اثر رقم، نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی آن بر کشت بساک توت‌فرنگی بررسی شد.

مواد گیاهی این تحقیق را دو رقم تجاری توت‌فرنگی به نام‌های سلوا و پاروس تشکیل می‌دادند. از طول کاسبرگ به عنوان مارکر مورفولوژیکی برای تشخیص مرحله نموی

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: moieni_a@modares.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

میکروسپور و برداشت غنچه‌ها و کشت بساک‌ها استفاده شد. غنچه‌ها در زمانی که بساک‌های آنها در مراحل تک هسته‌ای میانی تا تک هسته‌ای انتهایی بودند برداشت و نسبت به کشت آنها اقدام شد (Maleki Chore, 2009). تمام محیط‌های کشت به صورت مایع تهیه شدند و پس از اتوکلاو، در پتری‌دیش‌های یک بار مصرف استریل (به قطر ۵/۵ سانتی‌متر) و از قرار ۷ میلی‌لیتر در هر پتری‌دیش توزیع شدند.

غنچه‌های حاوی میکروسپورهای تک‌هسته‌ای که طول کاسبرگ آنها ۵-۴ میلیمتر بود برداشت و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (W/V) ٪۲/۵ و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ٪۷۰ قرار داده شدند. غنچه‌ها پس از طی این مرحله سه مرتبه با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند. بساک‌های کشت شده به منظور القاء جنین و کالوس، به مدت ۳۰ روز در تاریکی و دمای ۲۵ $^{\circ}C$ نگهداری و سپس به منظور باززایی گیاه به اتاق رشد با دمای ۲۵ $^{\circ}C$ و فتوپریود ۱۶/۸ (شب/روز) منتقل شدند.

یادداشت‌برداری صفات مورد مطالعه هنگام انتقال جنین‌ها و کالوس‌ها به محیط باززایی انجام شد. در این پژوهش، درصد بساک‌های آندروژنیک (۱۰۰ × تعداد کل بساک‌های کشت شده/تعداد بساک‌های آندروژنیک)، درصد کالوس‌زایی بساک‌ها (۱۰۰ × تعداد کل بساک‌های کشت شده/تعداد کالوس‌های تولید شده) و درصد جنین‌زایی بساک‌ها (۱۰۰ × تعداد کل بساک‌های کشت شده/تعداد جنین‌های تولید شده) بررسی شدند.

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در هر تیمار سه تکرار کشت شد و هر تکرار از یک پتری‌دیش حاوی ۱۰ عدد بساک تشکیل می‌شد. عامل اول، رقم (سلوا و پاروس)، عامل دوم، نوع محیط کشت در سه سطح (MS, H1, N6) و عامل سوم، ترکیب هورمونی محیط کشت در شش سطح شامل (T1: 1 mgl^{-1} IAA + 1 mgl^{-1} BAP; T2: 1 mgl^{-1} IAA + 2 mgl^{-1} BAP; T3: 2 mgl^{-1} IAA + 1 mgl^{-1} BAP; T4: 2 mgl^{-1} IAA + 2 mgl^{-1} BAP; T5: 3 mgl^{-1} IAA + 1 mgl^{-1} BAP; T6: 3 mgl^{-1} IAA + 2 mgl^{-1} BAP) بود. برای تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار MSTAT-C استفاده شد و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند.

نتایج تعیین مارکر مورفولوژیکی نشان داد که غنچه‌های حاوی کاسبرگ‌هایی با طول ۵-۴ میلی‌متر و میکروسپورهایی در مرحله تک هسته‌ای میانی تا مرحله تک هسته‌ای انتهایی، برای برداشت و کشت بساک مناسب بودند. پس از کشت بساک‌ها به تدریج ساختارهای کالوسی و جنینی بر روی آن‌ها ظاهر می‌شدند.

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر رقم، نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی محیط کشت بر روی سه صفت مورد مطالعه معنی‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

شد. کلیه اثرهای متقابل، بجز اثر متقابل رقم × نوع محیط کشت، بر درصد کالوس‌زایی بساک‌ها معنی‌دار شد. بنابراین مقایسه میانگین‌ها برای اثرات ساده انجام نگرفت و با توجه به اینکه آثار متقابل سه جانبه معنی‌دار شد، برای هر رقم مقایسه میانگین‌های اثر متقابل نوع محیط کشت و ترکیب هورمونی به طور جداگانه انجام گرفت.

مقایسه میانگین برای درصد بساک‌های آندروژنیک در رقم سلوا نشان داد که بیشترین درصد بساک‌های آندروژنیک (۶۷/۸ درصد) مربوط به محیط کشت H1 با تیمار هورمونی T3 (2 mgl^{-1} IAA + 1 mgl^{-1} BAP) بود (جدول ۱). اما این تیمار به همراه تیمار هورمونی T2 (1 mgl^{-1} IAA+ 2 mgl^{-1} BAP) و T1 (1 mgl^{-1} IAA+ 1 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت H1 که به ترتیب درصد بساک‌های آندروژنیک در آن‌ها ۵۹/۶ و ۵۴/۳ بود و اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.

در مورد کالوس‌زایی بساک‌ها در رقم سلوا چهار تیمار مشابه بودند. تیمار T2 (1 mgl^{-1} IAA+ 2 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت H1 با ۳۳/۵ درصد، تیمار T1 (1 mgl^{-1} IAA+ 1 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت MS با ۳۱/۷ درصد،تیمار T3 (2 mgl^{-1} IAA+ 1 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت H1 با ۳۰/۴ درصد و تیمار T1 (1 mgl^{-1} IAA+ 1 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت H1 با ۲۸/۸ درصد به ترتیب بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشتند. محیط کشت H1 با تیمار هورمونی T3 (2 mgl^{-1} IAA + 1 mgl^{-1} BAP) با ۳۷/۴ درصد، بیشترین درصد جنین‌زایی بساک‌ها را در رقم سلوا نشان داد.

در رقم پاروس تیمار هورمونی T5 (3 mgl^{-1} IAA+ 2 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت H1 به همراه تیمار هورمونی T3 (2 mgl^{-1} IAA + 1 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت H1 به ترتیب با ۷۰/۵ و ۶۷/۷ درصد، بیشترین درصد بساک‌های آندروژنیک را نشان دادند. در مورد کالوس‌زایی بساک‌ها در رقم پاروس تیمار هورمونی T5 (3 mgl^{-1} IAA+ 2 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت H1 با ۴۶/۲ درصد بیشترین میزان کالوس‌زایی زا داشت و بیشترین درصد جنین‌زایی بساک‌ها در این رقم (۴۲/۸ درصد) در تیمار هورمونی T3 (2 mgl^{-1} IAA + 1 mgl^{-1} BAP) در محیط کشت H1 بدست آمد.

نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین درصد بساک‌های آندروژنیک، کالوس‌زایی و جنین‌زایی در محیط کشت H1 بدست آمد که با گزارش‌های گذشته (Owen and Miller, 1996) مطابقت داشت. محیط کشت H1، یک نوع محیط کشت MS تغییر یافته است و مهمترین تفاوت آن با محیط کشت MS، بالا بودن نسبت نیترات پتاسیم به نیترات آمونیوم در آن می‌باشد به طوری که در

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مقایسه میانگین برای درصد بساک‌های آندروژنیک، کالوس‌زایی و جنین‌زایی بساک‌ها در توت‌فرنگی

Table 1. Mean comparison for androgenic anthers, callogenesis and embryogenesis in strawberry

محیط کشت	تیمار هورمونی	سلوا (Selva)			پاروس (Paros)		
		بساک‌های آندروژنیک (٪)	کالوس‌زایی بساک‌ها (٪)	جنین‌زایی بساک‌ها (٪)	بساک‌های آندروژنیک (٪)	کالوس‌زایی بساک‌ها (٪)	جنین‌زایی بساک‌ها (٪)
Medium	Hormone treatment	Androgenic anthers (%)	Callogenesis (%)	Embryogenesis (%)	Androgenic anthers (%)	Callogenesis (%)	Embryogenesis (%)
MS	T1	38.4cde	31.7ab	6.7ef	32.1cde	26.7cde	5.5def
	T2	16.9fgh	15.4efg	1.6gh	36.9cd	19.6efg	17.3bc
	T3	33.3de	16.7ef	16.7cd	56.7abc	35.3b	21.3bc
	T4	40.4cd	22.4cde	18.0bcd	14.3def	9.5gh	4.8ef
	T5	27.4def	15.6ef	11.8de	34.8cd	14.6fgh	20.2bc
	T6	28.1def	27.4abcd	0.7hi	38.3cd	32.3bcd	6.1def
H1	T1	54.3abc	28.8abcd	25.5bc	50.2bc	32.4bc	17.8bc
	T2	59.6ab	33.5a	26.2b	53.9bc	31.7bcd	25.6b
	T3	67.8a	30.4abc	37.4a	67.7ab	24.9def	42.8a
	T4	32.7de	21.1de	11.6de	6.1f	6.1h	0.0g
	T5	49.1bcd	22.9bcde	26.3b	70.5a	46.2a	24.3b
	T6	18.3efg	15.6efg	2.4fg	14.9def	12.2gh	2.8f
N6	T1	6.3gh	6.3fg	0.0i	12.4def	0.0i	12.4cd
	T2	0.0i	0.0h	0.0i	6.7f	6.7gh	0.0g
	T3	10.0fgh	3.3g	6.7ef	13.3def	6.7gh	6.7de
	T4	3.3h	0.0h	3.3fg	10.0ef	6.7gh	3.3ef
	T5	3.3h	3.3g	0.0i	6.7f	6.7gh	0.0g
	T6	0.0i	0.0h	0.0i	12.5def	0.0i	12.5cd

میانگین‌هایی، در هر ستون، که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different at the %5 probability level- using Duncan's Multiple Range Test.

این محیط کشت، نیترات پتاسیم ۵/۰۵۵ برابر نیترات آمونیوم می‌باشد و نسبت به محیط کشت MS نیترات آمونیوم کمتری دارد. شاید به دلیل اثر سمی که یون آمونیوم در غلظتهای بالا دارد، میزان کمتر یون آمونیوم در محیط کشت مناسب‌تر باشد به طوری که در محیط‌های کشت اختصاصی برای کشت میکروسپور گندم (محیط کشت CHB)، نسبت نیترات به آمونیوم بسیار بالا می‌باشد، یا حتی در برخی از محیط‌های کشت میکروسپور، مانند محیط کشت میکروسپور کلزا (محیط کشت NLN) آمونیوم وجود ندارد با این حال بعضی دیگر از تحقیقات نشان می‌دهند که وجود آمونیوم هرچند به مقدار کم برای محیط کشت الزامی می‌باشد که می‌تواند به دلیل نقش تنظیم کننده آن در رشد و نمو باشد زیرا فرم آمونیوم است که وارد چرخه تولید اسیدهای آمینه می‌شود و نیترات می‌بایست ابتدا به آمونیوم تبدیل شود سپس وارد چرخه تولید اسیدهای آمینه می‌شود (Nelson and Cox, 2005).

دلیل دیگر آن می‌تواند نقش آمونیوم در تنظیم pH به همراه نیترات باشد. اما مقدار زیاد

Archive of SID

www.SID.ir

آمونیوم به دلیل رها کردن پروتون‌ها و اسیدی کردن محیط کشت سمی می‌باشد و به همین دلیل است که محیط کشت‌هایی که نسبت کمتری آمونیوم داشته باشند، می‌توانند موفق‌تر باشند. از طرف دیگر، در این تحقیق، محیط کشت N6 کمترین درصد بساک‌های آندروژنیک، کالوس‌زایی و جنین‌زایی را داشت. محیط کشت N6، دارای نسبت بالایی از نیترات پتاسیم بوده و فاقد نیترات آمونیوم می‌باشد و آمونیوم آن از طریق سولفات آمونیوم تامین می‌گردد. عدم وجود نیترات آمونیوم در محیط کشت می‌تواند نقش تنظیم‌کننده pH را داشته باشد و احتمالاً دلیل کم شدن پاسخ‌دهی بساک‌ها در این محیط کشت باشد. همچنین این محیط کشت فاقد چندین عنصر ریزمغذی مانند مس، مولیبدن وکبالت است و ضمناً فاقد میواینوزیتول است که فقدان این مواد در محیط کشت می‌تواند دلیل پایین آمدن پاسخ‌دهی بساک‌ها در این محیط کشت باشد.

در رقم سلوا تیمارهای هورمونی T3 و T2 و T1 به ترتیب بیشترین درصد بساک‌های آندروژنیک را داشتند اما بیشترین جنین‌زایی در محیط کشت حاوی تیمار هورمونی T3 به دست آمد. در حقیقت تیمار هورمونی T3 با افزایش درصد جنین‌زایی، سبب افزایش درصد بساک‌های آندروژنیک شد و چون در کشت بساک، هدف به دست آوردن بیشترین میزان جنین می‌باشد، بنابراین در این رقم محیط کشت H1 حاوی $2\ mgl^{-1}$ IAA + $1\ mgl^{-1}$ BAP (T3) به عنوان تیمار برتر تعیین شد. در رقم پاروس تیمارهای هورمونی T5 و T3 بیشترین درصد بساک‌های آندروژنیک را داشتند، هرچند که تیمار هورمونی T5 درصد بساک‌های آندروژنیک بیشتری نسبت به تیمار هورمونی T3 داشت اما به دلیل اینکه اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نبود و از طرف دیگر تیمار هورمونی T3 درصد جنین‌زایی بسیار بیشتری نسبت به تیمار هورمونی T5 داشت. بنابراین در این رقم نیز محیط کشت H1 حاوی $2\ mgl^{-1}$ IAA + $1\ mgl^{-1}$ BAP (T3) را به عنوان تیمار برتر برای مطالعات آینده در نظر گرفت.

به منظور استفاده از روش هاپلوئیدی در اصلاح گیاه توت‌فرنگی، بالا بردن میزان تولید جنین و کالوس از کشت بساک بسیار حائز اهمیت می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که به منظور افزایش پاسخ‌دهی بساک‌ها و بهبود جنین‌زایی و کالوس‌زایی انتخاب ترکیب محیط کشت و ترکیب هورمونی مناسب بسیار حائز اهمیت می‌باشد اگر چه لازم است این نتایج برای سایر ارقام نیز بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی: توت‌فرنگی، کشت بساک، محیط کشت، جنین‌زایی و کالوس‌زایی.

Archive of SID

www.SID.ir

References

Bhatt, I. D., and Dhar, U. 2000. Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 83-88.

Gruchala, A., Korbin, M., and Zurawicz, E. 2004. Conditions of transformation and regeneration of Induka and Elista strawberry plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 79: 153-160.

Maleki Chore, J. 2009. Study on anther culture in some cultivars of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), M. Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. Tehran, Iran. 77 pp. (In Persian).

Nelson and Cox, 2005. Lehninger principles of biochemistry, 5th Edition. W. H. Freeman. 1119 pp.

Owen, H. R., and Miller, A. R. 1996. Haploid plant regeneration from anther culture of three American cultivars of strawberry (*Fragaria* × ananassa Duch.). Plant Cell Reports 15: 905-909.

Sayegh, A. J., and Hennerty, M. J. 1989. Androgenesis and embryo rescue for strawberry haploid production. Acta Horticulturae 265: 129-135.

Archive of SID

www.SID.ir