

### بهینه سازی برخی از عوامل مؤثر در کشت بافت توت فرنگی رقم پاروس (*Fragaria ananasa cv. paros*)

رحمان یوسفی (۱)، موسی موسوی (۲)، نورالله معلمی (۲)

۱- کارشناس ارشد علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهیدچمران اهواز ۲- استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

این آزمایش به منظور بررسی چند روش جهت گندزدایی ریزنمونه نوک طوقه با هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه، اثر ذغال فعال (۰، ۱، ۲ و ۳ گرم بر لیتر) بر کاهش قهوه ای شدن و افزایش رشد ریزنمونه در شرایط کنترل شده و همچنین مقایسه محیط های کشت MS، B<sub>5</sub> و WPM بر کالوس زایی ریزنمونه برگی در توت فرنگی رقم پاروس انجام شد. هر کدام از این آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار انجام گردید. نتایج نشان دادند که بیشترین میزان آلودگی به مقدار ۹۵٪ در روش گندزدایی با هیپوکلریت سدیم ۰/۰۵٪ و کمترین میزان آلودگی به مقدار ۱۷٪ در روش گندزدایی با کلرید جیوه ۰/۱٪ (۹ دقیقه) بود. بیشترین درصد ریزنمونه های قهوه ای شده ۷۲/۵٪ در محیط شاهد بدون ذغال فعال (صفر گرم در لیتر) و کمترین میزان قهوه ای شدن ۱۱/۴٪ در محیط محتوی ۳ گرم در لیتر ذغال فعال به دست آمد. کاربرد ذغال فعال به میزان ۳ گرم در لیتر نیز باعث دستیابی به بیشترین میانگین طول دمبرگ به مقدار ۲۲/۶ میلی متر گردید. در بین محیط های پایه تست شده، محیط MS حاوی ۲ میلی گرم در لیتر NAA نسبت به محیط های WPM و B<sub>5</sub> با همان ترکیب هورمونی نتایج بهتری برای تحریک کالوس نشان داد.

**کلمات کلیدی:** توت فرنگی، روش گندزدایی، قهوه ای شدن، کالوس زایی

**مقدمه:**

توت فرنگی با نام علمی *Fragaria ananasa* Duch. متعلق به تیره Rosaceae می باشد (۱). توت فرنگی آناناسی یک هیبریدی بین توت فرنگی ویرجینیایی (*Fragaria virginiana* Duch.) و توت فرنگی شیلیایی (*Fragaria chiloensis* Duch) می باشد و به عنوان میوه تازه خوری و همچنین تهیه مربا، ژله و سایر محصولات فرآوری شده استفاده می شود (۶). برطبق گزارش FAO میانگین تولید جهانی توت فرنگی نزدیک به ۳/۸ میلیون تن بوده که از تقریباً ۲۵۶ هزار هکتار برداشت می شود (۴). گونه های جنس *Fragaria* توسط بذرها و رانرها ازدیاد می شوند. ازدیاد توسط بذر در سطح تجاری معمول نیست و بیشتر توسط رانرها تکثیر می شوند (۲). به هر حال ازدیاد با استفاده از رانر محدود به فصل خاصی است، چون تولید رانرهای توت فرنگی فقط در طی فاز رویشی صورت می گیرد. لذا میتوان از نوک طوقه به عنوان ریزنمونه جهت ریزازدیادی توت فرنگی استفاده کرد که در این صورت یکی از مشکلات استفاده از نوک طوقه مشکل گندزدایی کردن آن است. علاوه بر این قهوه ای شدن در مرحله اول استقرار درون شیشه ای موجب مرگ ریزنمونه می شود (۵). از اینرو هدف این تحقیق دستیابی به یک روش گندزدایی مؤثر و کاهش قهوه ای شدن ریزنمونه نوک طوقه و به دنبال آن مقایسه محیط های کشت پایه مختلف بر روی کالوس زایی ریزنمونه برگی توت فرنگی می باشد.

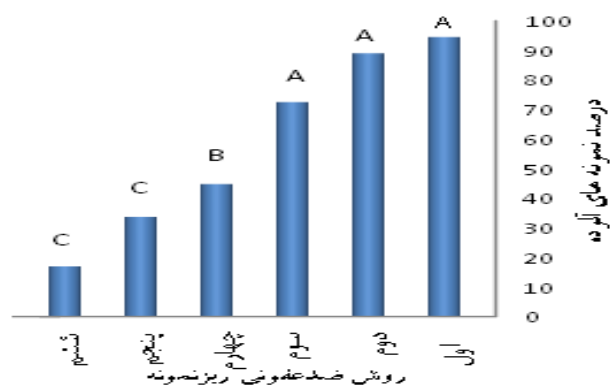
**مواد و روش ها:**

در اوایل زمستان سال ۱۳۸۹ از گیاهان توت فرنگی رقم پاروس در گلخانه برای گرفتن ریزنمونه استفاده شد. بعد از جدا کردن برگ ها، نوک های طوقه گیاه (۱/۵-۱ سانتیمتر) جدا گردیدند. در آزمایش اول به منظور دستیابی به روش گندزدایی بهینه شش روش به کار برده شدند: روش اول: شستشو در زیر شیر آب به مدت ۱۰ دقیقه و سپس غوطه وری در اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن فرو بردن در هیپوکلریت سدیم ۰/۰۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه همراه با چند قطره توین ۲۰ و سپس ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل می باشد. روش دوم: مانند روش اول با تفاوت کاربرد هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه بود. روش سوم: مانند روش اول با تفاوت کاربرد هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه است. روش چهارم: مانند

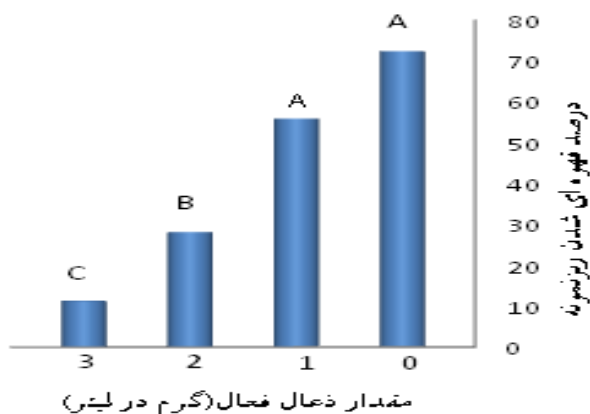
روش اول با این تفاوت که کاربرد کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۷ دقیقه بود. روش پنجم: مانند روش چهارم با این تفاوت که کاربرد کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۸ دقیقه به اتمام رسید و روش ششم: مانند روش چهارم بوده با این تفاوت که کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۹ دقیقه استفاده گردید. ریزنمونه ها پس از ضدعفونی بر روی محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی گرم در لیتر IBA، ۰/۱ میلی گرم در لیتر GA<sub>3</sub>، ۰/۳٪ ساکارز و ۰/۷٪ آگار که PH آن روی ۵/۷ تنظیم شده بود کشت شده و در فیتوترون با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه داری شدند. در آزمایش دوم ذغال فعال در ۴ غلظت ۰، ۱، ۲ و ۳ گرم بر لیتر در محیط کشت گفته شده در بالا برای کاهش قهوه ای شدن ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش سوم به منظور تعیین بهترین محیط کشت پایه مناسب کالوس زایی در توت فرنگی سه نوع محیط پایه MS، B<sub>5</sub> و WPM به همراه ویتامین های مربوطه مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمایش ریزنمونه های قطعات برگگی به ابعاد ۰/۵ سانتیمتر مربع از گیاهان رشد یافته در شرایط کنترل شده گرفته شدند. به هرکدام از محیط ها ۲ میلی گرم بر لیتر NAA نیز اضافه شد کرده و پس از کشت در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار انجام شده و داده ها با نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه قرار گرفتند و همچنین مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن انجام گردید.

#### نتایج و بحث:

نتایج آزمایش اول نشان داد که در سطح ۱٪ بین روش های متفاوت گندزدایی ریزنمونه نوک طوقه توت فرنگی اختلاف معنی دار وجود دارد. بیشترین میزان آلودگی با کاربرد هیپوکلریت سدیم ۰/۰۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه مشاهده گردید و مقدار آن ۹۵٪ بود. به ترتیب با افزایش غلظت هیپوکلریت سدیم از ۰/۰۵٪ به ۱٪ میزان آلودگی کمتر شده به ترتیب به ۸۹٪ و ۷۲/۵٪ رسید. به دنبال آن با جایگزینی کلرید جیوه ۰/۱٪ به جای هیپوکلریت سدیم از میزان آلودگی ریزنمونه ها کاسته شد، به طوریکه با کاربرد کلرید جیوه ۰/۱٪ به مدت ۹ دقیقه حداقل میزان آلودگی ریزنمونه (۱۷٪) مشاهده شد (نمودار شماره ۱). ریزنمونه های غیرآلوده همگی رشد کرده و تولید گیاهچه کردند. نتایج آزمایش دوم نشان داد که در سطح ۱٪ بین غلظت های متفاوت ذغال فعال در کاهش قهوه ای شدن ریزنمونه اختلاف معنی دار وجود داشت. زمانی که ذغال فعال در محیط کشت به کار گرفته نشد (محیط شاهد)، بیشترین قهوه ای شدن و مرگ ریزنمونه نوک طوقه به میزان ۷۲/۵٪ مشاهده گردید. با افزایش غلظت ذغال فعال در محیط کشت، قهوه ای شدن ریزنمونه کاهش یافت به طوریکه با ۱ و ۲ گرم در لیتر ذغال فعال در محیط میزان قهوه ای شدن به ترتیب از ۶۶٪ به ۲۸/۲٪ رسید. کمترین میزان قهوه ای شدن ریزنمونه با کاربرد ۳ گرم در لیتر ذغال فعال به میزان ۱۱/۴٪ مشاهده شد (نمودار شماره ۲). با افزایش غلظت ذغال فعال علاوه بر کاهش میزان قهوه ای شدن، طول دمبرگ در ریزنمونه های رشد کرده نیز افزایش یافت به طوریکه کمترین میانگین طول دمبرگ در شاهد بدون ذغال فعال و بیشترین میانگین طول دمبرگ در غلظت ۳ گرم بر لیتر ذغال فعال به ترتیب به مقدار ۷/۳۷ و ۲۲/۶۰ میلی متر مشاهده شد. زمانی که ریزنمونه در محیط کشت مستقر می شود، ترکیبات فنولی آزاد شده از ریزنمونه به محیط کشت پس از اکسید شدن موجب قهوه ای شدن و مرگ تدریجی ریزنمونه خواهند شد. ذغال فعال با جذب مواد فنلی آزاد شده، باعث ممانعت از قهوه ای شدن گشته و موجب افزایش رشد ریزنمونه خواهد شد. طی عمل ریزازدیادی درخت خرما، ذغال فعال شده از طریق کاهش قهوه ای شدن بافت ها باعث تحریک رشد گردید (۷). در این تحقیق استفاده از کلرید جیوه برای گندزدایی سطحی ریزنمونه نسبت به هیپوکلریت سدیم مؤثرتر بود که به خاصیت گندزدایی کنندگی قوی تر آن نسبت به هیپوکلریت سدیم برمی گردد. محیط پایه MS نیز برای کالوس زایی تأثیر بهتری نسبت به دیگر محیط های پایه داشت. در مطالعات دیگری نیز گزارش شده که محیط MS به عنوان محیط پایه جهت کالوس زایی توت فرنگی نتایج مثبتی داشته است (۳ و ۴).



نمودار ۱- مقایسه روش های مختلف گندزدایی سطحی ریزنمونه های توت فرنگی در شرایط کنترل شده



نمودار ۲- اثر ذغال فعال بر روی کاهش میزان قهوه ای شدن ریزنمونه های توت فرنگی در شرایط درون شیشه‌ای

منابع:

۱. مرندی، ج. ۱۳۸۶. چاپ دوم. میوه های ریز. انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه. ۲۹۷ صفحه
2. Bhatt ID, Dhar U (2000) Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60, 83-88
3. Gerdakaneh M, Mozafarim A A, Khalighi A, and Sioseh-mardah A (2009) The effects of carbohydrate source and concentration on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria X ananasa* Duch). American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci., 6(1):76-80.
4. Komar R, Rafiu I, Monzur H (2010) Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three strawberry (*Fragaria sp.*) clones. Turk J Biol 34 :75-80
5. Pirtilla AM, Podolich O, Koskimaki JJ, Hohtola E, Hohtola A (2008) Role of origin and endophyt infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Plant Cell, Tissue Org. Cult. 95:47-55.
6. Samir C, Debnath and Jaime A. Teixeira da Silva (2007) Strawberry culture *in vitro*: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology ©Global Science Books.
- 7- Tisserat B (1979) Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. J. EXP. Bot :1275-1283.

**Abstract**

This paper investigated various methods of crown tip explant disinfection, effect of active charcoal on explant browning and comparison between different basal medium types on callogenesis of leaf explant in strawberry (*fragaria ananasa* cv.paros). Minimum contamination (%17) was observed with using %0.1 Hgcl<sub>2</sub> (9 minute) while maximum contamination (%95) was observed in case of using %0.05 sodium hypochlorite as disinfection agent. The browning was decreased by increasing of active charcoal concentrations. The highest amount of explant browning ( %72.5) obtained in control (without active charcoal) and lowest amount (%11.4) appeared when 3 g/l active charcoal was used. Active charcoal caused to achieve highest petiole length average (22.6 mm). Among the different basal mediums tested, MS medium containing 2 mg/l NAA compared to WPM and B<sub>5</sub> mediums was found for giving optimum callus induction