اثر غلظت تنظیم کننده های رشد ونوع ریزنمونه برکالوس زایی دو رقم توت فرنگی(*Fragaria × ananassa Duch.*)

محمد گردکانه (۱)، علی اکبر مظفری (۲) و عادل سی و سه مرده (۳)

۱- دانشجوی دکتری علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۲- مربی مجتمع آموزش علمی-کاربردی جهاد کشاورزی کردستان، ۳- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان

چکیده

در این تحقیق به منظور تشکیل کالوس در توت فرنگی، ریز نمونه های پهنک برگ و دمبرگ دو رقم توت فرنگی کردستان و پارز روی محیط کشت MS حاوی هورمون اکسین (2,4-D) در چهار غلظت مختلف ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی گرم در لیتر همراه با هورمون سیتوکنین، بنزیل آدنین (BA) در سه غلظت۰/۰، ۰/۲ و ۰/٤ میلی گرم در لیتر، کشت شدند. درصد تشکیل کالوس، رنگ و بافت کالوس به نوع محیط کشت، ریزنمونه و نوع کولتیوار بستگی داشت. بالاترین میزان تشکیل کالوس در ریزنمونه پهنک برگ مشاهده شد. در بین همه غلظت ها، ۳ میلی گرم در لیتر تو، فور- دی ، در ترکیب با ۰/۲ میلی گرم BA و ۵ میلی گرم در لیتر تو، فور- دی، در ترکیب با ۰/٤ میلی گرم BA به ترتیب مؤثرترین غلظت هورمونی برای القاء کالوس ریزنمونه پهنک برگ کولتیوار کردستان (۹۹/٦٦درصد) و پارز (۹۷/۳۳درصد) ثبت شد.

مقدمه

توت فرنگی *(Fragaria × ananassa Duch.)* یکی از معروف ترین میوه های مناطق معتدله است. طعم مطبوع و ظاهر جذاب، این میوه را در زمره محصولات ممتاز قرار داده است (۱). استان کردستان با تولید ۳۹ هزارتن درسال ۱۳۸۵قطب اصلی تولید توت فرنگی در کشور است. معمولاً توت فرنگی از طریق استولون تکثیر می‌شود که از این روش تعداد محدودی نشاء تولید می گردد، درحالیکه از طریق کشت بافت می توان در مدت کوتاهی، تعداد زیادی گیاه تولید نمود(۳). کالوس زایی در جنین زایی غیر مستقیم(القایی)،که در بهبود خصوصیات ژنتیکی گونه گیاهی، مطالعه رویدادهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان عالی، تولید بذور مصنوعی، ریز ازدیادی و گیاهان تراریخت، پتانسیل بسیاربالایی دارد، مورد استفاده قرار می‌گیرد. باززایی گیاه توت فرنگی حاصل از کالوس یکی از روشهای کشت بافت است که گیاهان باززایی شده تعداد گل، طوقه ، استولون و قدرت رشد بیشتری نسبت به گیاه مادری، دارند(۵). تنوع سوماکلونالی تحریک شده در کشت کالوس در تسریع فرآیند اصلاح نبات توت فرنگی، ایجاد مقاومت به تنشهای زیستی وغیر زیستی مانند مقاومت گیاهان به پاتوژن های قارچی، دمای پایین و مقاومت به تنش های شوری مورد استفاده قرار می گیرد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق ازاسفند ۱۳۸٦ تا آبان ۱۳۸۷ درآزمایشگاه کشت بافت علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان اجرا گردید. بر این اساس برگهای جوان نوک استولون کولتیوارهای توت فرنگی کردستان و پارزا پرورش یافته در گلخانه، جمع آوری شدند. و به مدت ۳۰ دقیقه در زیر جریان شیر آب شهری شسته شدند، سپس نمونه ها را در زیر لامینار به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ ٪ قرار داده به دنبال آن نمونه ها در محلول کلراکس۱ ٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی نموده سپس ۳ تا ۵

بار با آب دو بار تقطیر استریل شسته شدند. محیط کشت MS حاوی۰/۸ ٪ آگار و pH = ۵/۸ حاوی تو،فور-دی در چهار غلظت مختلف ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی گرم در لیتر همراه با (BA) در سه غلظت۰/۰، ۰/۲ و ۰/٤ میلی گرم در لیتر ، به مدت ۲۵ دقیقه اتوکلاو گردید. محیط کشت به مقدار ۲۵ میلی لیتر در پتری دیش‌ها در زیر لامینار توزیع شد. ریزنمونه (پهنک برگ) درابعاد ٦-٤ میلی متر و دمبرگ به طول ۵-٦ میلی متر بر روی محیط کشت قرار داده شدند. کشت ها به مدت ٦ هفته به منظور کالوس‌زایی در دمای ۲۵±۱°C و رطوبت نسبی ۷۵ ٪ در تاریکی در اتاقک رشد نگهداری شدند. در این تحقیق از روش آماری فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در شش تکرار استفاده شد. نتیجه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

پس از قرار دادن ریز نمونه ها(پهنک برگ و دمبرگ) روی محیط کشت، ۱۰ تا۲۰ روز بعد از کاشت در ریز نمونه ها کالوس زایی آغاز گردید. ریز نمونه‌های کشت شده در محیط حاوی اکسین با غلظت بالا، نسبت به محیط کشتهای دارای غلظت کمتر اکسین، کالوس دهی سریعتر ایجاد شد. ٦ هفته پس از کشت تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که میزان کالوس زایی در بین دو رقم در سطح ۱درصداختلاف معنی داری وجود داشت به طوری که میانگین کالوس زایی در رقم کردستان ۷۵/۸۹ و در رقم پارز٦٤/۷۰ در صد مشاهده گردید همچنین در بین اندام ها نیز اختلاف معنی داری دیده شد به نحوی که میانگین کالوس زایی در ریز نمونه برگ ۷۵/٦۱ و در ریز نمونه دمبرگ ٦٤/۹۸ درصد به دست آمد. که این با نتایج پاسی و همکاران (٤) مطابقت داشت. اثرغلظت تنظیم کننده‌های رشد در تشکیل کالوس در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود به طوری که در بین همه غلظت ها، ۳ میلی گرم در لیتر تو، فور- دی ، در ترکیب با۰/۲ میلی گرم BA و ۵ میلی گرم در لیتر تو، فور- دی ، در ترکیب با۰/٤ میلی گرم BA به ترتیب مؤثرترین غلظت هورمونی برای القاء کالوس ریز نمونه پهنک برگ کولتیوار کردستان (۹۹/٦٦درصد) و پارز (۹۷/۳۳درصد) مشاهده شد. در حالی که میزان تشکیل کالوس در ریز نمونه دمبرگ در مقایسه با پهنک برگ بسیار ضعیف تر بود به نحوی که در غلظت ۳ میلی گرم تو، فور- دی همراه با ۰/٤ میلی گرم BA میزان کالوس زایی در ریز نمونه دمبرگ رقم کردستان ۸٦/۵۰٪ و در غلظت ٤ میلی گرم تو، فور- دی همراه با ۰/۲ میلی گرم BA میزان کالوس زایی در ریز نمونه دمبرگ رقم پارز ۸۸/۸۳٪ مشاهده گردید. بنابراین درصد تشکیل کالوس به نوع محیط کشت، ریز نمونه و کولتیوار بستگی دارد. بر اساس نوع محیط کشت، ریز نمونه و رقم چندین تیپ کالوس بر اساس رنگ و بافت قابل تشخیص بودند. بعضی از ریز نمونه ها تولید کالوس ترد و شکننده و کرمی، کرمی روشن و قهوه‌ای روشن نمودند. در حالیکه بقیه ریز نمونه ها تولید کالوسهای نرم و آبکی به رنگ سفید و سفید مایل به خاکستری کردند. که این با نتایج کومار و همکاران (۲) مطابقت داشت.

منابع

۱- جلیلی مرندی، ر. ۱۳۸٤. میوه‌های ریز. انتشارات جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان غربی. ۲۷٦ ص.

2 Kumar, M., Biswas, R. Islam and M. Hossain. 2007. Somatic embryogenesis in strawberry (Fragaria sp.) through callus culture Plant Cell Tissue Organ Culture 90:49–54.

3 Mercado, J.A., F. Pliego-Alfaro and M.A. Quesada1. 2007. Strawberry Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 60 Transgenic Crops V (ed. by E.C. Pua and M.R. Davey).

4 Passey, A.J., K.J. Barrett and D.J. James. 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (Fragaria × ananassa Duch.) using a range of explant types. Plant Cell Rep 21:397–401.

5 Quiroz-Figueroa, F.R, R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos and V.M. Loyola-Vargas. 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.

Abstract:
This study was carried out for callus induction of strawberry. The leaf and petiole explants of two strawberry *(Fragaria × ananassa Duch.)* cultivars Kurdistan and parose were cultured onto MS media supplemented with Different types and concentrations of growth regulators were tested in order to obtain the best callus formation. 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D) at four concentrations(2, 3, 4 and 5 mgL-1) in combination with cytokinine, benzyl adenine (BA) at (0, 0.2 and 0.4 mgL^{-1}) were used in this study. The concentrations of growth regulators, cultivar and explant type were found critical to the callus induction, the increment of callus index and callus physical appearance. The leaf was the most responsive explant to produce callus. The highest 99.66% leaf explants of kurdistan and 97.33% leaf explants of parose induced to develop callus in medium containing 3 mgL^{-1} 2,4-D in combination with 0.2 mgl^{-1} of BA and 5 mgL^{-1} 2,4-D in combination with 0.4 mgl^{-1} of BA respectively.
Key words: strawberry, callus induction, explant, growth regulators