Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**
Vol. 4, No. 2 Autumn & Winter 2023, p. 167- 178 **جلد ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲، صفحه ۱۷۸-۱۶۷**
DOI: 10.22034/PLANT.2024.140066.1075
مقاله پژوهشی

بررسی اثرات نوع ریزنمونه و ترکیب هورمونی محیط کشت در ریزازدیادی ارقام پاجارو و پاروس توت فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch.)

مریم نقش[۱]، احمد معینی[۲]، قاسم کریم‌زاده[۳] ، مسعود شمس‌بخش[۴] ، تکتم سادات تقوی[۵]

۱.دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استاد، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٤. استاد، گروه بیماری شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵. عضو هیات علمی اسبق، گروه باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱

چکیده

ریزازدیادی، یکی از مهم ترین کاربردهای کشت بافت گیاهی است. استفاده از ریزازدیای برای تکثیر گیاه توت فرنگی، علاوه بر تولید بسیار زیاد نشاء، می تواند پاسخگوی نیاز رو به رشد نشاء های سالم و عاری از بیماری باشد. در این مطالعه، تکثیر درون شیشه ای دو رقم توت فرنگی (پاروس و پاجارو) با استفاده از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) بررسی شده است. در هر رقم، اثر فاکتورهای ترکیب هورمونی محیط کشت ($0.5\ mg\ l^{-1}$ NAA + $0.2\ mg\ l^{-1}$ BAP و $1\ mg\ l^{-1}$ BAP) و نوع ریزنمونه (شامل جوانه گره‌ای و جوانه انتهایی (در دو اندازه بزرگ و کوچک) حاصل از ساقه‌های رونده (رانر) بدست آمده از گیاهان توت فرنگی رشد یافته در شرایط گلخانه بررسی شدند. کشت‌ها سه مرتبه و با فاصله یک ماه زیرکشت شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر نوع ریزنمونه در هر سه صفت مطالعه شده (تعداد گیاهچه و متوسط ارتفاع آن ها در هر ریزنمونه و نیز تعداد ریشه در هر ریزنمونه) معنی دار بوده است. در کشت اولیه و نیز سه زیرکشت متوالی، بیشترین تعداد گیاهچه، متوسط ارتفاع گیاهچه ها، و نیز تعداد ریشه در هر ریزنمونه با استفاده از جوانه‌های گره‌ای بدست آمدند. همچنین، زیرکشت کردن‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای تعداد گیاهچه‌های باززایی شده را افزایش دادند بطوریکه در زیر کشت سوم، ۷ گیاهچه از هر ریزنمونه بدست آمد. بطور کلی، پژوهش حاضر کارایی بسیار خوب کشت درون شیشه ای جوانه گره ای رانرها را برای ریزازدیادی دو رقم توت فرنگی تجاری پاجارو و پاروس نشان داد.

کلیدواژگان: کشت جوانه انتهایی رانر، کشت جوانه گره‌ای رانر، محیط کشت MS، ۱-نفتالن استیک اسید، ۶- بنزیل آمینوپورین

*ایمیل نویسنده مسئول: moieni_a@modares.ac.ir

مقدمه

توت فرنگی (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) متعلق به خانواده رزاسه (Rosaceae) و یک گیاه دگرگرده افشان و تک پایه است (Manganaris *et al*., 2014). توت فرنگی رایج، هیبریدی از دو گونه وحشی توت فرنگی شامل *Fragaria virginiana* و *Fragaria chiloensis* است. گونه های والدینی از قاره آمریکا منشاء گرفته‌اند اما هیبرید رایج امروزی، در اروپا توسعه یافته است. توت فرنگی یک میوه با ارزش در رژیم غذایی است که مواد مغذی ضروری و همچنین سطوح بالایی از ویتامین C و B9 را فراهم می کند. توت فرنگی همچنین سرشار از ترکیبات زیست فعال مانند ترکیبات فنلی است که همراه با ویتامین C به عنوان آنتی اکسیدان در رژیم غذایی انسان نقش دارد (Giampieri *et al*., 2014, 2015). زیبایی میوه، عطر و طعم خاص آن از عوامل اصلی جذابیت میوه توت فرنگی می‌باشند. این گیاه منبع خوبی از آهن، کلسیم، منیزیم، و پتاسیم است (Sharma, 2002). خواص دارویی و درمانی زیادی برای اندام های مختلف توت فرنگی شناخته شده است. میوه توت فرنگی به خاطر وجود آنتی اکسیدانت‌های قوی در کاهش و درمان بعضی بیماری‌ها نقش دارد (Chung *et. al*., 2002 and Bickford *et. al*., 2000). یک تحقیق اخیر نشان داده است که محتوای آنتوسیانین کل، فنولیک کل و اسکوربیک اسید در میوه گیاهان توت فرنگی ریزازدیادی شده بیشتر از گیاهان غیر کشت بافتی بوده است (Irshad *et al*., 2023) تمام ارقام توت فرنگی اکتاپلوئید ($2n = 8x = 56$) هستند و به خوبی با طیف وسیعی از شرایط آب و هوایی سازگار هستند (Giampieri *et al*., 2012). ارزش تولید توت فرنگی در سراسر جهان در سال ۲۰۲۰ به ۱۴ میلیارد دلار رسیده است. چین بزرگترین تولید کننده توت فرنگی در سراسر جهان بوده است که ۵ میلیارد دلار را به خود اختصاص داده است که بیش از سه برابر ارزش دومین تولید کننده بزرگ جهان، ایالات متحده آمریکا، است (Hernández-Martínez *et al*., 2023).

تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان در مقایسه با تکثیر سنتی از مزایایی برخوردار است از جمله اینکه به مکان کوچکی نیاز دارد، مستقل از فصل و زمان است، تعداد بسیار زیادی گیاهچه در واحد زمان می‌توانند تولید شوند، هزینه تولید هر نشاء کمتر است، نشاءهای تولیدی عاری از آفات و بیماری‌ها هستند و گیاهچه‌های ریزازدیادی شده به راحتی می‌توانند به سایر کشورها صادر شوند و مشکلات قرنطینه نخواهند داشت.

با توجه به افزایش جمعیت دنیا و رشد روزافزون تقاضا، روش های تکثیر سنتی گیاهان، به تنهایی قادر به رفع نیاز بازار نیستند. در سال‌های اخیر، استفاده از کشت بافت جهت تسریع تکثیر گیاهان، اهمیت خاصی یافته است، بطوریکه همه ساله چندین میلیون گیاهچه توت فرنگی از بهترین ارقام آمریکایی و اروپایی از طریق کشت بافت تولید و تکثیر می‌شوند (Sharma, 2002). تکثیر درون شیشه‌ای موفقیت آمیز توت فرنگی برای اولین مرتبه در مرکز تحقیقات کشاورزی شهر ژامبلو بلژیک و با استفاده از کشت مریستم انجام شده است (Boxus, 1989). تکثیر از طریق کشت بافت علاوه بر تولید انبوه گیاهان، باعث تولید گیاهان سالم و عاری از بیماری خواهد شد. در مواردی، گیاهان توت فرنگی درون شیشه‌ای، تعداد گل آذین بیشتری داشته‌اند (Lopez-Aranda, *et al*., 1994). همچنین، گیاهان توت فرنگی ریزازدیادی شده معمولا تعداد رانر بیشتری تولید می کنند (Boxus, 1989). علاوه بر نوع ریزنمونه، سایر پارامترهای مورد استفاده در طی پروسه تولید درون شیشه ای گیاه مثل رقم، ترکیب نمک‌های محیط کشت، نوع و غلظت سیتوکینین و تعداد زیرکشت‌ها روی رفتار گیاهان ریزازدیادی شده اثر می‌گذارند(Faedi *et al*., 2002) . بطور کلی تحقیقات در خصوص بهینه سازی و بومی سازی پروتکل‌های ریزازدیادی توت فرنگی از طریق بررس عوامل مختلف همچنان ادامه دارد (Neri *et al*., 2022, Dhukate *et al*., 2021, Madumali *et al*., 2021, Naing *et al*., 2019, Karmaker *et al*., 2023, Kononenko *et al*., 2023, Pang *et al*., 2023)

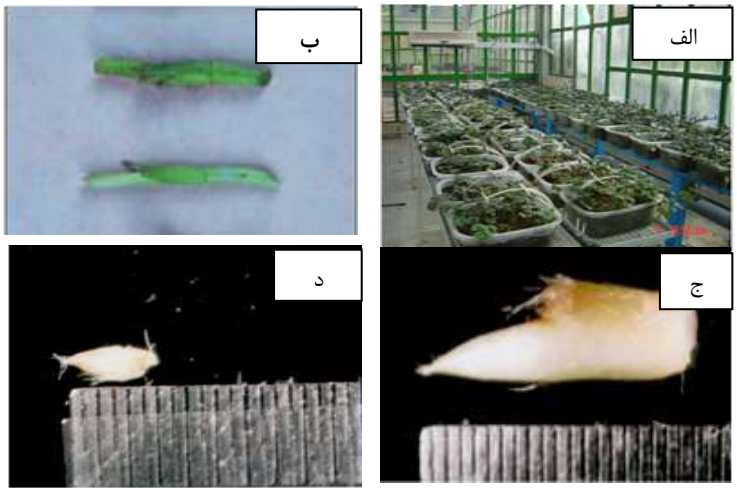
با توجه به ضرورت توسعه سطح زیرکشت توت فرنگی در ایران، لازم است که تحقیقاتی در زمینه ریزازدیادی ارقام مورد استفاده در کشور نیز انجام شود. در پژوهش حاضر، اثرات رقم، ترکیب محیط کشت و نوع ریزنمونه در ریزازدیادی دو رقم توت فرنگی بررسی شده‌اند.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر، از دو رقم پاجارو و پاروس توت فرنگی که در شرایط گلخانه شیشه ای دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، با نور طبیعی و تحت سیستم هیدروپونیک رشد کرده بودند، استفاده شده است (شکل ۱- الف). پاجارو یک رقم زودرس و با عملکرد بالا است که در سال ۱۹۷۹ در کالیفرنیا آزاد شده است. میوه آن درشت، متقارن، قرمز، محکم و با کیفیت بالا است. این رقم مقاوم به پوسیدگی میوه، پژمردگی و سوختگی برگ است. رقم پاروس، رقم حاصل از تلاقی بین ارقام مارمولادا (Marmolada) و ایرواین (Irvine) است که در سال ۱۹۹۸ تولید شده است. میوه های آن مخروطی کشیده تا بیضی- کروی، خالدار، نارنجی- قرمز با رسیدگی متوسط می باشد (Sharma, 2002).از جوانه گره ای و نیز دو نوع جوانه انتهایی (بزرگ و کوچک) رانرهای گیاه توت فرنگی به عنوان ریزنمونه های اولیه برای کشت استفاده شد. برای تهیه جوانه گره ای، از جوانه ای که قبل از گیاهچه انتهای رانرها واقع شده استفاده گردید (شکل ۱- ب). جوانه های انتهایی بزرگ و کوچک، از گیاهچه های انتهای ساقه های رونده فاقد ریشه و به ارتفاع ۳-۲ cm و حاوی یک تا دو برگ استفاده شد. جوانه انتهایی بزرگ از طریق حذف فلس های پوششی جوانه گیاهچه بدست آمد و ارتفاع آن حدوداً ۱۲-۸ mm بود، در حالیکه برای تهیه جوانه کوچک، فلس های پوششی بیشتری از جوانه انتهایی گیاهچه انتهای رانر حذف شدند و ارتفاع آن حدود ۵-۳ mm بود (شکل ا- ج، د). قبل از کشت، مواد گیاهی به مدت ۳ min با ۵-۴ قطره مایع ظرفشویی شسته شده و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ (w/v) حاوی سه قطره توئین ۲۰ به مدت ۲۰ min ضدعفونی شده و نهایتاً سه مرتبه شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. کشت اولیه جوانه ها در لوله آزمایش (۲ cm × ۲۰) حاوی ۲۰ ml محیط کشت جامد انجام شد. از ژل آگار-آگار برای جامد کردن محیط کشت استفاده شد. هر لوله آزمایش حاوی یک ریزنمونه، به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. زیرکشت ها (Subcultures) در ظروف شیشه مربا (به قطر ۶ cm و ارتفاع ۸ cm)، حاوی ۵۰ ml محیط کشت جامد، انجام شد. نتایج حاصل از کشت اولیه و سه زیرکشت بعدی بطور مستقل و به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار بررسی شدند. فاکتورهای مورد بررسی شامل رقم، ترکیب هورمونی، و نوع ریزنمونه بودند. فاکتور رقم از دو سطح شامل ارقام پاجارو و پاروس، فاکتور نوع ریزنمونه از سه سطح شامل جوانه گره ای، جوانه انتهایی بزرگ و جوانه انتهایی کوچک و فاکتور ترکیب هورمونی محیط کشت از دو سطح شامل $1\ mg\ l^{-1}$ BAP و $0.5\ mg\ l^{-1}$ NAA + $0.2\ mg\ l^{-1}$ BAP تشکیل شده بودند. از محیط کشتMS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی $30\ g\ l^{-1}$اساکارز به عنوان محیط کشت پایه استفاده شد. برای انجام زیرکشت اول، پس از گذشت ۴۰ روز از کشت اولیه جوانه های گیاه توت فرنگی، مواد گیاهی هر لوله آزمایش به محیط کشت تازه همان تیمار در یک ظرف شیشه مربا منتقل شدند. برای انجام زیرکشت های دوم و سوم، مواد گیاهی هر ظرف به دستجات حاوی ۳-۲ گیاهچه تقسیم شده و سپس هر دسته به یک ظرف شیشه مربا با همان ترکیب هورمونی قبلی منتقل شد. تمام کشت ها در اتاق رشد کاملاً کنترل شده در دمای $25 \pm 1\ °C$ با فتوپریود ۱۶ h روشنایی و شدت نور ۱۵۰۰ Lux قرار گرفتند. از لامپ های فلئورسنت برای تامین منبع نوری استفاده شد. پس از گذشت ۴۰ روز از کشت اولیه و یک ماه از هر زیرکشت، صفات تعداد گیاهچه و متوسط ارتفاع آن ها در هر ریزنمونه و نیز تعداد ریشه در هر ریزنمونه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این تحقیق، از نرم افزار SPSS جهت آنالیز داده ها و از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین ها استفاده شد. داده های حاصل از تمام آزمایش ها از طریق Normal scores تبدیل شدند و فرض های نرمال بودن و یکنواختی واریانس ها بعد از تجزیه واریانس بررسی شد و آنالیز داده ها روی داده های تبدیل شده صورت گرفت ولی در جداول مقایسه میانگین، از میانگین های واقعی استفاده شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس اثرات مورد مطالعه برای صفات مختلف در کشت اولیه و زیرکشت ها در جدول ۱ ارائه شده است.



شکل ۱- الف: گیاهان مادری توت فرنگی برای تهیه ریزنمونه‌ها. ب: جوانه گره ای، ج: جوانه انتهایی بزرگ، د: جوانه انتهایی کوچک

جدول ۱- میانگین مربعات در تجزیه واریانس اثرات رقم و ترکیب هورمونی محیط کشت روی صفات مورد مطالعه در کشت اولیه و زیرکشت ها در دو رقم توت فرنگی (پاجارو و پاروس)

متوسط تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه				متوسط ارتفاع گیاهچه ها در هر ریزنمونه (cm)				متوسط تعداد ریشه در هر ریزنمونه			
کشت اولیه	زیرکشت اول	زیرکشت دوم	زیرکشت سوم	کشت اولیه	زیرکشت اول	زیرکشت دوم	زیرکشت سوم	کشت اولیه	زیرکشت اول	زیرکشت دوم	زیرکشت سوم
۱/۸۹۲*	۳/۶۵۰*	۰/۶۴۷^{ns}	۰/۹۰۲^{ns}	۲/۱۵۸^{ns}	۰/۸۳۳^{ns}	۰/۱۵۱^{ns}	۰/۵۳۷^{ns}	۰/۳۱۷^{ns}	۰/۲۶۴*	۰/۴۵۶^{ns}	۱/۴۹۸^{ns}
۱/۵۶۱^{ns}	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۰۴۰^{ns}	۰/۱۲۸^{ns}	۰/۱۶۲^{ns}	۰/۱۷۳^{ns}	۰/۴۲۰^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۱۸۲^{ns}	۰/۳۰۶^{ns}	۱/۰۵۳^{ns}	۰/۷۳۴^{ns}
۱۳/۴۴۶***	۱۰/۲۴۵***	۶/۲۳۱***	۱۶/۵۷۹***	۱۳/۴۵۵***	۵/۱۸۴**	۱۳/۵۹۹***	۵/۷۴۴**	۵/۶۲۰***	۵/۱۸۹***	۸/۵۸۶***	۸/۸۴۳***
۰/۰۰۴^{ns}	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۱۴۴^{ns}	۰/۲۴۴^{ns}	۰/۰۰۰^{ns}	۰/۰۱۳^{ns}	۱/۴۱۰^{ns}	۰/۳۰۹^{ns}	۰/۰۵۱^{ns}	۰/۰۳۷^{ns}	۱/۲۸۱^{ns}	۰/۲۹۲^{ns}
۰/۰۶۸^{ns}	۱/۲۰۷^{ns}	۰/۳۳۳^{ns}	۰/۰۱۷^{ns}	۰/۵۷۸^{ns}	۰/۱۲۳^{ns}	۱/۱۸۰^{ns}	۰/۷۶۲^{ns}	۰/۰۳۹^{ns}	۰/۶۱۷^{ns}	۱/۷۸۲^{ns}	۰/۰۱۴^{ns}
۰/۰۳۲^{ns}	۰/۱۰۰^{ns}	۰/۶۶۳^{ns}	۰/۴۵۰^{ns}	۰/۰۱۸^{ns}	۰/۳۱۶^{ns}	۰/۵۰۲^{ns}	۰/۴۵۵^{ns}	۰/۰۵۱^{ns}	۰/۱۰۱^{ns}	۱/۲۱۴^{ns}	۰/۰۱۱^{ns}
۰/۰۱۶^{ns}	۰/۷۹^{ns}	۰/۱۳۹^{ns}	۰/۲۱۷^{ns}	۰/۱۸۷^{ns}	۰/۱۲۵^{ns}	۰/۹۷۰^{ns}	۰/۰۰۵^{ns}	۰/۰۲۳^{ns}	۰/۱۲۵^{ns}	۰/۵۱۶^{ns}	۰/۱۶۶^{ns}
۰/۴۹۴	۰/۶۳	۰/۷۹۲	۰/۷۱۱	۰/۷۲۲	۰/۸۲۵	۰/۶۷۰	۰/۸۸۹	۰/۶۶۷	۰/۶۹۴	۰/۶۲۰	۰/۷۷۸

A : رقم، B: ترکیب هورمونی محیط کشت و C: نوع ریزنمونه

^{ns} نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار و **، **و ***به ترتیب نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطوح احتمال ۵٪، ۱٪ و ۰/۱٪

کشت اولیه جوانه های گیاه توت فرنگی

با توجه به جدول ۱، مشاهده می شود که در مورد صفت متوسط تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه، اثرات فاکتورهای رقم و نوع ریزنمونه معنی دار بودند. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه در رقم پاجارو بیشتر از رقم پاروس بوده است (به ترتیب ۱/۷۳ و ۱/۵۱ گیاه در هر ریزنمونه، شکل۲ -الف). همچنین تعداد گیاهچه ها در هر ریزنمونه در جوانه های گره‌ای (۲/۱۵) از دو نوع جوانه دیگر بیشتر بود (شکل ۲- ب). در مورد صفت متوسط ارتفاع گیاهچه ها در هر ریزنمونه، فقط اثر فاکتور نوع ریزنمونه معنی دار بود و سایر اثرات ساده و متقابل معنی دار نبودند (جدول ۱). مقایسه میانگین ارتفاع گیاهچه‌ها در سه نوع ریزنمونه نشان داد که متوسط ارتفاع گیاهچه ها در ریزنمونه جوانه گره ای بیشتر بوده است (۱/۳۳ cm در جوانه گره ای، ۰/۸۱ cm و ۰/۷ cm به ترتیب در جوانه های انتهایی بزرگ و کوچک، شکل ۲-ج). در کشت اولیه جوانه ها در دو رقم پاجارو و پاروس، استفاده از دو نوع ترکیب هورمونی، تفاوت معنی داری در متوسط ارتفاع گیاهچه ها در هر ریزنمونه ایجاد نکرد. در مورد صفت متوسط تعداد ریشه در هر ریزنمونه فقط اثر فاکتور نوع ریزنمونه معنی دار بود (جدول ۱) و مقایسه میانگین نشان داد که جوانه گره ای و جوانه انتهایی بزرگ، تعداد ریشه بیشتری تولید کردند (به ترتیب ۱/۴۲ و ۱/۱ ریشه در هر ریزنمونه، شکل ۲-د) .

کشت جوانه های گیاه توت فرنگی در زیرکشت اول

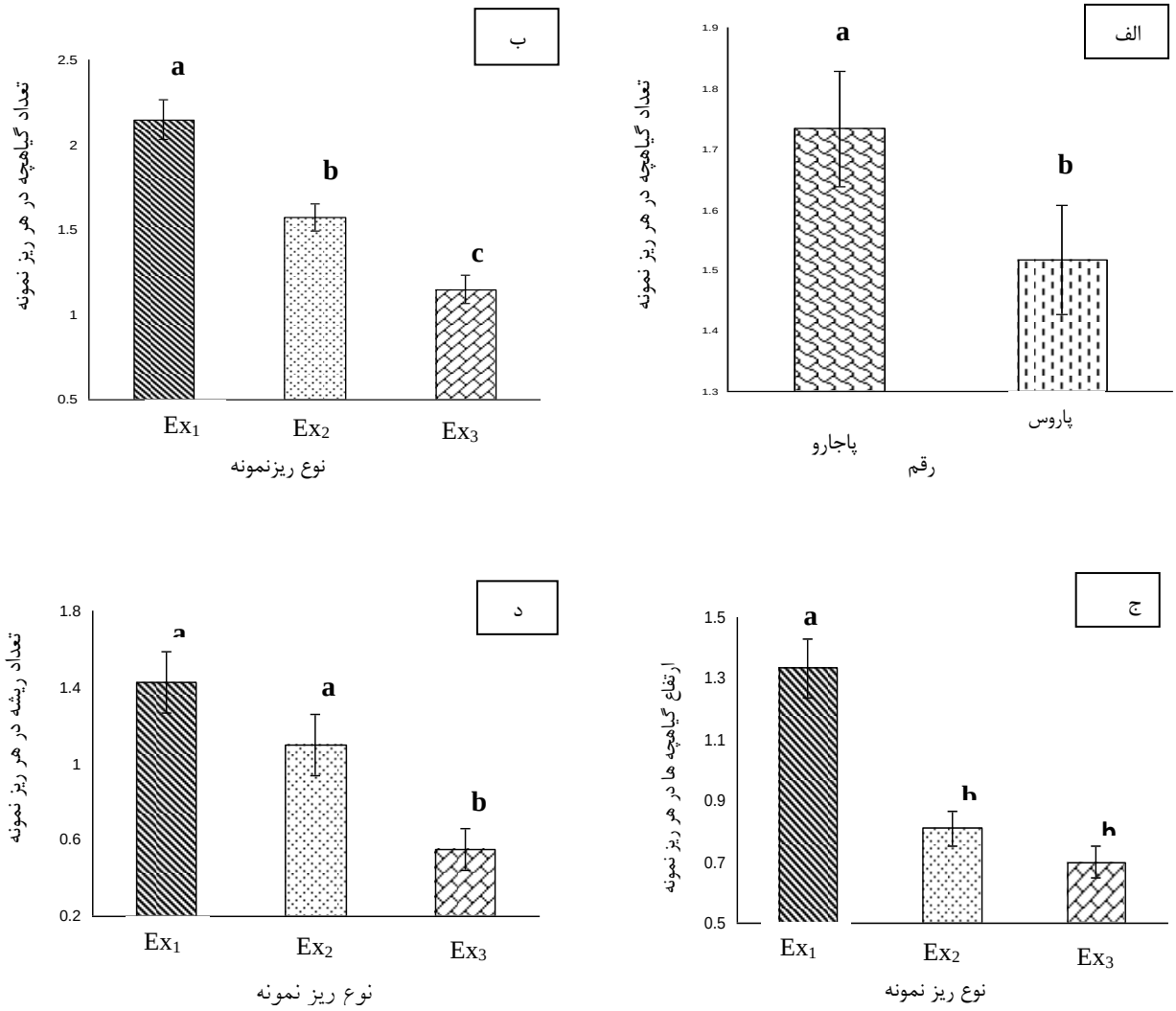
در مورد صفت متوسط تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه، اثرات فاکتورهای رقم و نوع ریزنمونه معنی دار شدند (جدول ۱) و نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که رقم پاجارو تعداد گیاهچه بیشتری در هر ریزنمونه تولید کرده است (به ترتیب ۱/۶۱ و ۱/۲ گیاه، شکل ۳-الف). همچنین، ریزنمونه جوانه گره ای در مقایسه با جوانه های انتهایی بزرگ و کوچک تعداد گیاهچه بیشتری تولید کرد (به ترتیب ۲/۰۵ ، ۱/۳۲ و ۰/۸ گیاهچه، شکل ۳-ب). در مورد صفت متوسط ارتفاع گیاهچه ها در هر ریزنمونه، فقط اثر فاکتور نوع ریزنمونه معنی‌دار بود (جدول ۱) و بهترین نتیجه توسط جوانه گره ای و جوانه انتهایی کوچک حاصل شد (به ترتیب ۲/۳۶ cm و ۲/۰۶ cm). در مورد صفت متوسط تعداد ریشه در هر ریزنمونه، اثرات رقم و نوع ریزنمونه معنی دار بودند (جدول ۱) که با توجه به مقایسه میانگین ها، تعداد ریشه در هر ریزنمونه در جوانه گره ای از جوانه های انتهایی بزرگ و ، شکل ۳-ج). همچنین تعداد ریشه تولید شده توسط هر ریزنمونه در رقم پاجارو بیشتر از رقم پاروس بوده است (به ترتیب ۳/۹۱ و ۲/۵۶ ریشه کوچک بیشتر بود (به ترتیب ۴/۸۷، ۲/۹۲، و ۱/۹۲ ریشه ، شکل ۳-د).

کشت جوانه های گیاه توت فرنگی در زیرکشت دوم

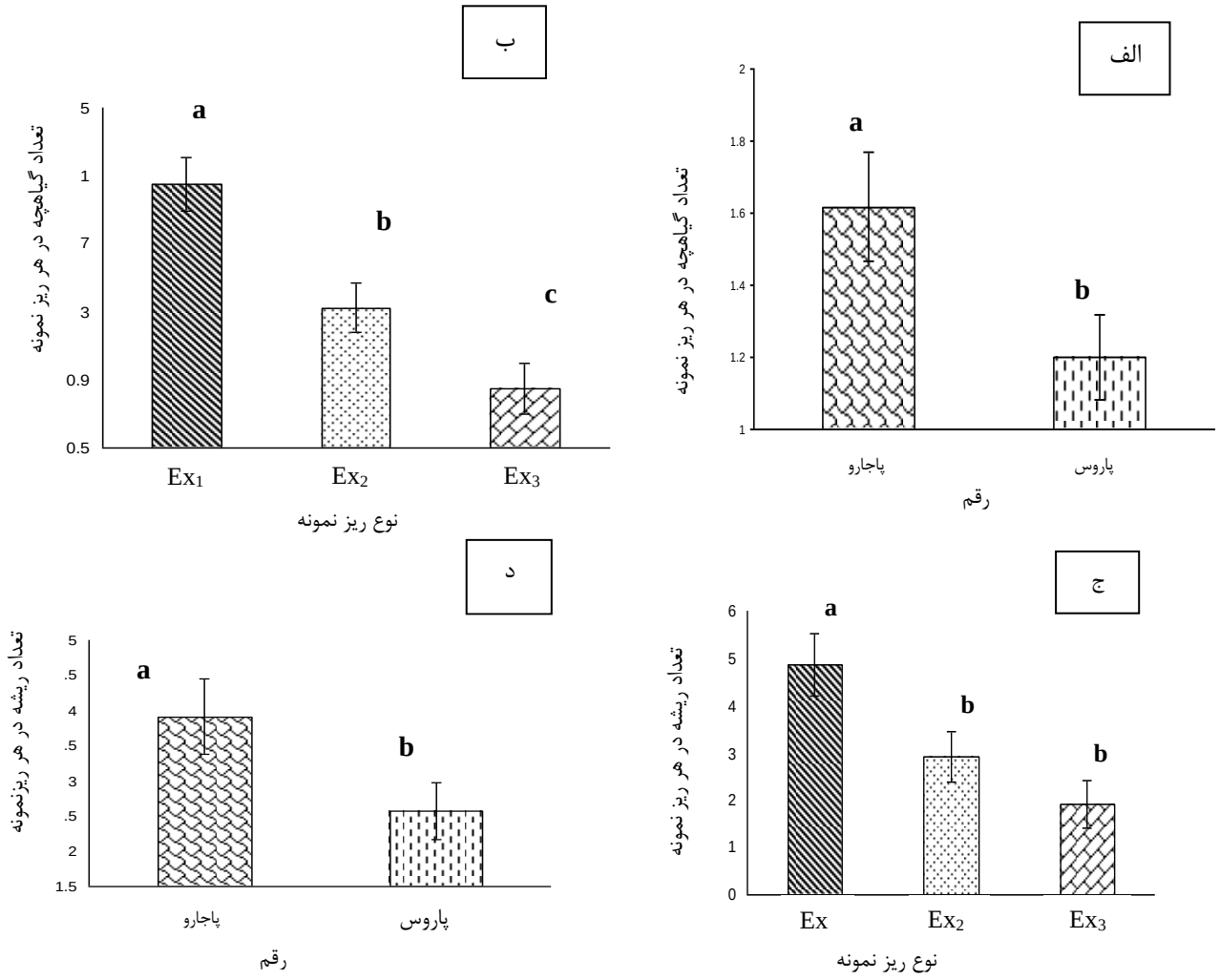
در زیرکشت دوم برای صفات متوسط تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه، متوسط ارتفاع گیاهچه‌ها در هر ریزنمونه، و متوسط تعداد ریشه در هر ریزنمونه، فقط اثر ساده نوع ریزنمونه معنی دار بود (جدول ۱). جوانه انتهایی بزرگ و جوانه گره‌ای بهترین نتیجه را برای تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه داشتند (به ترتیب ۲/۸ و ۲/۵۷ گیاه، شکل ۴-الف). جوانه گره‌ای در مقایسه با جوانه های انتهایی بزرگ و کوچک بیشترین متوسط ارتفاع گیاهچه ها را داشت (به ترتیب ۳/۴۲، ۲/۱۶ و ۱/۳۱ cm، شکل ۴-ب). جوانه گره ای و جوانه انتهایی بزرگ، بیشترین تعداد ریشه در هر ریزنمونه را تولید کردند (به ترتیب ۱۱/۳۵ و ۷/۹ ریشه، شکل ۴-ج).

کشت جوانه های گیاه توت فرنگی در زیرکشت سوم

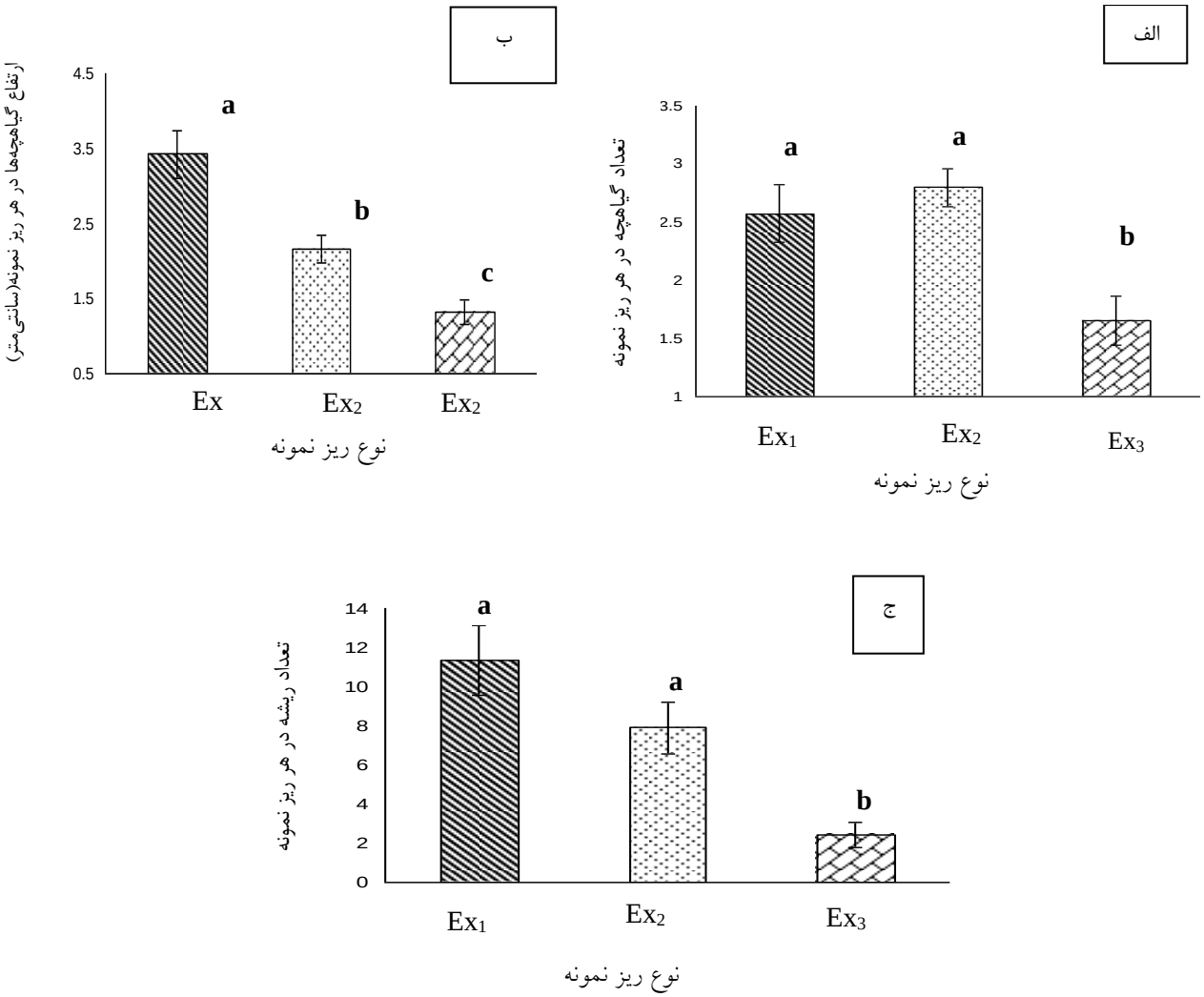
در زیرکشت سوم نیز برای هر سه صفت متوسط تعداد و ارتفاع گیاهچه ها و متوسط تعداد ریشه در هر ریزنمونه، فقط اثر فاکتور نوع ریزنمونه معنی دار بود (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین ها برای هر سه صفت مذکور، جوانه گره ای بهترین نتیجه را داشت (۷/۰۵ گیاه در هر ریزنمونه، متوسط ارتفاع گیاهچه ها برابر با ۴/۲۸ cm و ۱۳/۹ ریشه در هر ریزنمونه، به ترتیب شکل های ۵-الف، ب، ج). شکل ۶ گیاهچه های درون شیشه ای و سازگار شده گیاه توت فرنگی را نشان می دهد.



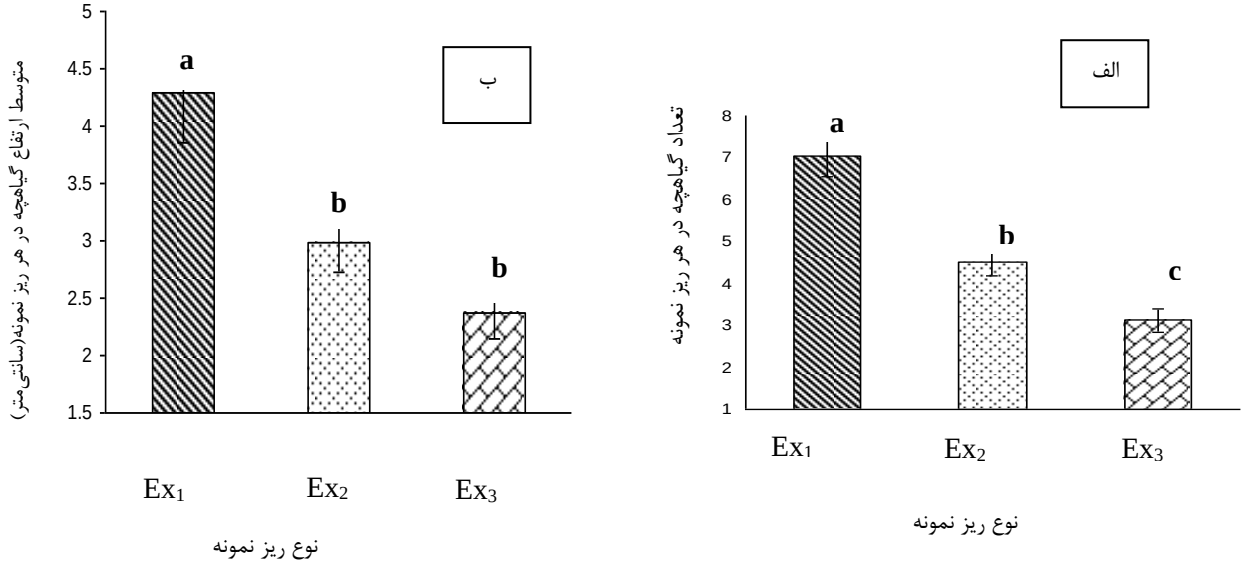
شکل ۲- میانگین صفات در کشت اولیه. تعداد گیاهچه توت فرنگی در هر ریزنمونه در دو رقم مطالعه شده (الف)، تعداد گیاهچه توت فرنگی در هر ریزنمونه (Ex_1: جوانه گره ای، Ex_2: جوانه انتهایی بزرگ و Ex_3: جوانه انتهایی کوچک) (ب) ، متوسط ارتفاع گیاهچه‌ها در هر ریزنمونه (ج) و تعداد ریشه در هر ریزنمونه (د).

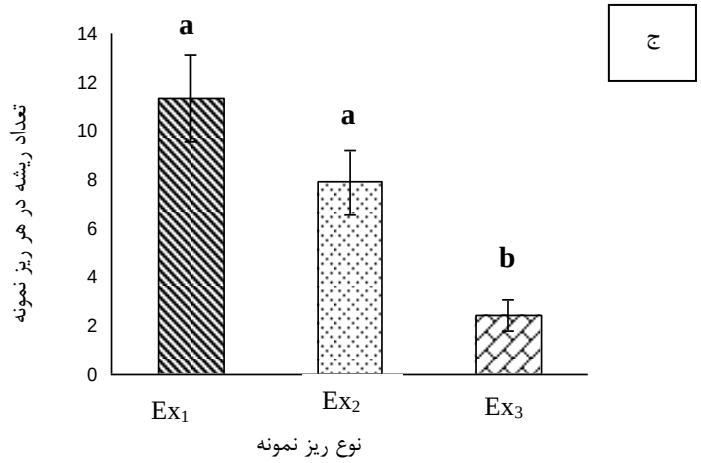


شکل ۳- میانگین صفات در زیرکشت اول. تعداد گیاهچه توت فرنگی در هر ریزنمونه در دو رقم مطالعه شده (الف)، تعداد گیاهچه ی در هر ریزنمونه (ب) ، تعداد ریشه در هر ریزنمونه (ج) و تعداد ریشه در هر ریزنمونه ارقام مورد مطالعه (د).

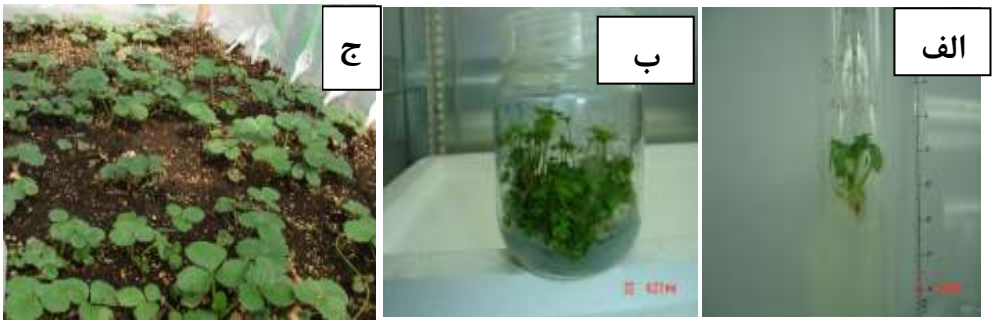


شکل ۴- مقایسه میانگین ها در زیر کشت دوم برای صفات تعداد گیاهچه توت فرنگی در هر ریزنمونه (الف)، متوسط ارتفاع گیاهچه‌ها در هر ریزنمونه و (ب) ، تعداد ریشه در هر ریزنمونه (ج)





شکل ۵- مقایسه میانگین ها در زیر کشت سوم برای صفات تعداد گیاهچه توت فرنگی در هر ریزنمونه (الف)، متوسط ارتفاع گیاهچه‌ها در هر ریزنمونه (ب) و تعداد ریشه در هر ریزنمونه (ج)



شکل ۶- گیاهچه توت فرنگی حاصل از کشت جوانه (الف) افزایش تعداد گیاهچه‌های باززایی شده از طریق زیرکشت‌ها (ب) و گیاهچه های سازگارشده (ج)

نتایج و بحث

برای بررسی باززایی گیاه در دو رقم توت فرنگی (پاجارو و پاروس)، جوانه های رانرهای آنها شامل جوانه گره ای و نیز جوانه گیاهچه های انتهای رانرها بر روی محیط کشت MS با دو ترکیب هورمونی کشت شدند. نتایج نشان داد که برای صفات بررسی شده (به استثناء صفت متوسط تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه که اثر رقم نیز معنی دار شده بود)، فقط اثر نوع ریزنمونه معنی دار بود و دو نوع ترکیب هورمونی محیط کشت استفاده شده اختلاف معنی داری نداشتند و به نظر می رسد که در دو رقم پاجارو و پاروس، هر دو ترکیب هورمونی استفاده شده اثر مطلوبی روی تولید گیاه داشتند.

متوسط تعداد و ارتفاع گیاهچه‌ها در هر ریزنمونه و نیز متوسط تعداد ریشه در هر ریزنمونه با استفاده از جوانه گره ای نسبت به دو جوانه حاصل از گیاهچه های انتهای رانرها بیشتر بود. نتایج نشان می دهد که استفاده از جوانه گره ای به صورت کامل و دست نخورده و همراه با قسمتی از ساقه در طرفین جوانه و نیز بگونه‌ای که هنگام تهیه، صدمه ای به جوانه وارد نشده باشد، برای بدست آوردن نتایج مطلوب اهمیت زیادی دارد. همچنین، بین دو نوع جوانه انتهایی، معمولاً نتایج بهتر مربوط به استفاده از جوانه انتهایی بزرگ بود. در تحقیقی (Sakila *et al.*, 2007) که روی کشت جوانه گره ای گیاه توت فرنگی بر روی محیط کشت MS با غلظت های مختلف BA (۰/۵-۲ mg l^{-1}) به همراه Kinetin (mg

$mg\ l^{-1}$ ۰/۱ و ۰/۵) یا GA_3 ($mg\ l^{-1}$ ۰/۱ و ۰/۵) انجام شد، بیشترین تعداد گیاهچه با استفاده از محیط کشت حاوی $mg\ l^{-1}$ ۱/۵ BA + $mg\ l^{-1}$ ۰/۱-۰/۵ Kin حاصل شد. در تحقیق دیگری (Bhatt and Dhar, 2000) ، با کشت جوانه گره ای بر روی محیط کشت MS، بیشترین تعداد گیاهچه با استفاده از $mg\ l^{-1}$ ۰/۴ BA + $mg\ l^{-1}$ ۰/۱ NAA گزارش شد و ۷۰٪ از گیاهچه ها در شرایط طبیعی در خاک اسقرار یافتند. بطور کلی از محیط کشت MS با ترکیب های هورمونی مختلف و ریزنمونه های متنوعی ازجمله مریستم، جوانه نوساقه، قطعات گره ای، جوانه انتهای رانر برای تولید درون شیشه ای گیاه توت فرنگی استفاده شده است (Biswas *et al*., 2007, Sakila *et al*., 2007, Bhatt and Dhar 2000, Kaur *et al*., 2012, Tanziman *et al*., 2012, Dhukate *et al*., 2021, Sarıdaş *et al*. 2021, Kryukov *et al*. 2022) در تحقیق حاضر از دو ترکیب هورمونی مبتنی بر BAP و NAA (شامل $mg\ l^{-1}$ 1 BAP و $mg\ l^{-1}$ 0.5 NAA + $mg\ l^{-1}$ 0.2 BAP) استفاده شد که اختلاف معنی داری بین آنها برای صفات متوسط تعداد و ارتفاع گیاهچه های و متوسط تعداد ریشه در هر ریزنمونه وجود نداشت.

بررسی تعداد گیاهچه‌های تولید شده از طریق زیرکشت‌ها بر روی ترکیب یکسانی از تنظیم کننده‌های رشد نشان داد که از طریق کشت جوانه‌های گیاه توت فرنگی و زیرکشت کردن آنها به راحتی می‌توان نسبت به ریزازدیادی گیاه توت فرنگی اقدام کرد. در انتهای زیرکشت سوم، تعداد زیادی گیاهچه تولید می‌شد به گونه‌ای که تقریبا تمام فضای ظروف شیشه مربا را پر می کردند (شکل ۲۴) که کارایی بسیار خوب پروتکل استفاده شده را برای ریزازدیادی گیاه توت فرنگی نشان می‌دهد. یکی از نکات بارز در زیرکشت‌ها این بود که علاوه بر تولید گیاهچه‌های قابل تشخیص از هر ریزنمونه، که در آنالیز آماری فقط تعداد آنها بررسی شد، تعداد زیادی نوساقه بسیار کوچک نیز تولید می‌شدند. این دستجات نوساقه‌های بسیار کوچک نیز تقسیم شده و به زیرکشت بعدی منتقل می‌شدند که نهایتا به گیاهچه تبدیل می شدند. در زیرکشت‌ها همانند کشت اولیه، عموماً بهترین نتایج با استفاده از کشت جوانه‌های گره‌ای بدست آمد و درنتیجه می‌توان استفاده از جوانه گره‌ای را برای ریزازدیادی گیاه توت فرنگی پیشنهاد کرد. در زیرکشت‌های هر دو رقم پاجارو و پاروس، هر دو ترکیب هورمونی ذکر شده نتایج مطلوبی داشتند و اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نشد، لذا از این ترکیب های هورمونی می‌توان بطور موثری برای ریزازدیادی گیاه توت فرنگی استفاده کرد. براساس نتایج آزمایشات کشت اولیه جوانه‌ها و زیرکشت‌ها می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از جوانه گره‌ای برای بدست آوردن تعداد قابل ملاحظه گیاه با متوسط ارتفاع بیشتر و نیز تعداد ریشه بیشتر گزینه مناسبی است بطوریکه بیشترین تعداد گیاهچه در هر ریزنمونه با استفاده از جوانه گره‌ای بدست آمد. جوانه‌های انتهایی بزرگ و کوچک تعداد کمتری گیاهچه تولید می‌کردند. همچنین، بیشترین متوسط ارتفاع گیاهچه ها در هر ریزنمونه و نیز تعداد ریشه در هر ریزنمونه با استفاده از جوانه گره‌ای بدست آمد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کشت درون شیشه‌ای جوانه گره‌ای گیاه توت فرنگی در دو رقم مطالعه شده، برای تولید گیاه بسیار مطلوب است و پروتکل ارائه شده، پتانسیل بسیارخوبی برای ریزازدیادی تجاری گیاه توت فرنگی در کشور دارد. همچنین، از پروتکل مذکور می‌توان برای بررسی ریزازدیادی سایر ارقام تجاری توت فرنگی رایج در کشور استفاده کرد.

سپاسگزاری

این پژوهش تحت حمایت مادی بنیاد ملی علم ایران (INSF) برگرفته از طرح شماره ۸۳۱۳۳ انجام شده است.

منابع

Bickford, P. C., Gould, T., Briederick, L., Chadman, K., Pollock, A., Young, D., Shukitt- Hale, B., & Joseph, J. (2000). Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. Brain *Research, 866*, 211-217.

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

Biswas, M. Hossain, M. B., Ahmed, U. K., Roy, R., Karim, M. A., Razvy, M., & Islam, R. (2007). Multiple shoots regeneration of strawberry under various colour illuminations. *American-Eurasian Journal of Scientific Research, 2* (2): 133-135.

Boxus, P. (1989). Review on strawberry mass propagation. *Acta Hortic*. *265*, 309-320.

Chung, M. J., Lee, S. H., & Sung, N. J. (2002). Inhibitory effects of whole strawberries, garlic juice or kale juice on endogenous formation of N-nitrosodimethylenamine in humans. *Cancer Letters, 182*, 1-10.

Dhukate, M. R., Kher, M. M., Vadawale, A. V., & Giri, P. (2021). Protocol for micropropagation of strawberry (Fragaria× ananassa) cv.'Sweet Charlie'and 'Winter Dawn'. *Environmental and Experimental Biology*, *19*(1), 1-6.

Faedi, W., Baruzzi, G., & Lucchi, P. (2002). Outstanding strawberry selections from Italian breeding activity. In XXVI International Horticultural Congress: Berry Crop Breeding, *Production and Utilization for a New Century*, *626*, 125-132.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., and Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality and impact on human health. Nutrition, 28(1): 9-19.

Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2014). Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 3867-3876.

Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Alvarez-Suarez, J. M., Afrin, S., Bompadre, S., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2015). Strawberry as a health promoter: *An evidence based review. Food & function. 6*(5), 1386-1398.

Hernández-Martínez, N. R., Blanchard, C., Wells, D., & Salazar-Gutiérrez, M. R. (2023) Current state and future perspectives of commercial strawberry production: *A review*, *Scientia Horticulturae*, *312*, 111893.

Irshad, M., Rukh, S., Nabi, G., Israr, M., Ali, S., Munsif, F., Suhail, M., Mohammad, S., & Rizwan, H. M. (2023) Fruits of micropropagated strawberry (*Fragaria ananassa*) plants exhibited higher antioxidant metabolites as compared to *in vivo* grown plants. *Pakistan Journal of Botany*, *55*(2), 727-737.

Karmaker, S., Hossain, M. M., Hoque, M. A., Kaium, M. A., Al Amin, M., & Islam, M. S. (2023). *In Vitro* propagation of three strawberry cultivars through runner tips Culture. *American Journal of Plant Sciences*, *14*(11), 1296-1304.

Kaur, R. Sharma, N. Gupta, M. and Sharma, G. (2012) *In vitro* propagation of a commercial strawberry cultivar 'Selva' SKUAST. *Journal* of Research, *14*(1& 2), 1-8.

Kononenko, A., Ivakhnova, O., Kondratiev, V., & Kiselev, M. (2023). Features of the development of strawberry microplants *in vitro.* In BIO Web of Conferences (Vol. 71, p. 01002). EDP Sciences.

Kryukov, L. A., Vodolazhsky, D. I., & Kamenetsky-Goldstein, R. (2022). Micropropagation of grapevine and strawberry from south Russia: rapid production and genetic uniformity. Agronomy, 12(2): 308.

Lopez-Aranda, J. M., Pliego-Alfaro, F., Lopez-Navidad, I., & Barcelo-Munoz, M. (1994). Micropropagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on *in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *The Journal of Horticultural Science*, *69*, 625-637.

Madumali, H. K. C., Abeythilakarathna, P. D., & Seran, T. H. (2021). Rooting performance of in vitro microshoots of strawberry *Fragaria x ananassa* Duch. as influenced by plant growth regulators. *Agrieast*, *15* (2), 69-73.

Manganaris, G. A., Goulas, V., Vicente, A. R., & Terry, L. A. (2014). Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal* of the *Science* of *Food* and *Agriculture*., *94*(5), 825-833.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.

Naing, A. H., Kim, S. H., Chung, M. Y., Park, S. K., & Kim, C. K. (2019). *In vitro* propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars. Plant methods, 15, 1-10.

Neri, J. C., Meléndez-Mori, J. B., Tejada-Alvarado, J. J., Vilca-Valqui, N. C., Huaman-Huaman, E., Oliva, M., & Goñas, M. (2022). An optimized protocol for micropropagation and acclimatization of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Variety 'Aroma'. *Agronomy*, *12*(4): 968.

Pang, W. Q., Tan, S. T., Mad'Atari, M. F., Yoong, I. C. K., & Subramaniam, S. (2023). Establishment of an efficient micropropagation protocol for Cameron Highlands White Strawberry (Fragaria x ananassa) using light emitting diodes (LEDs) system. South African *Journal of Botany*, *157*, 189-200.

Sakila, S., Ahmed, M. B., Roy, U. K., Biswas, M. K., Karim, R., Razvi, M. A., Hossain, M., Islam, R., & Hoque, A. (2007). Micropropagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), A newly introduced crop in Bangladesh. *American- Eurasian Journal of Scientific Research*, 2(2), 151-154.

Sarıdaş, M. A., Baktemur, G., Taşkın, H., & Kargı, S. P. (2021). Effect of plant hormones on micropropagation potential of superior strawberry genotypes and their parents via shoot-tip culture. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 20(3), 63-75.

Sharma, R. R. (2002). Growing Strawberry. First edition. New Delhi: International Book Distributing CO., India.

Tanziman, A., Karim, R., Karim, M. R., Islam, R., & Hossain, M. (2012). Callus induction and shoot regeneration in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) *International Journal of Biosciences*, *2*, 93-100.

Plant Production and Genetics **تولید و ژنتیک گیاهی**

Vol.4 , No. 2, Autumn & Winter 2023, p. 167-178 **جلد ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۲، صفحه ۱۷۸-۱۶۷**

Research Article DOI: 10.22034/PLANT.2024.140066.1075

Study of the effects of the explant type and the hormonal composition of the culture medium in the micropropagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)

Maryam Naghsh [1], Ahmad Moieni [2], Ghasem Karimzadeh [3], Masoud Shams-bakhsh [4], Toktam Sadat Taghavi [5]

1.MSc. graduate, Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Plant Genetics and Breeding, Tarbiat Modares University,Tehran, Iran
3. Professor, Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Former Faculty Member, Department of Horticulture, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 25-11-2023

Accepted: 10-02-2024

Abstract

Micropropagation is one of the most important applications of plant tissue culture. Using the micropropagation for strawberry propagation, in addition to producing many plants, can meet the growing need for healthy and disease-free plants. In this study, the *in vitro* propagation of two strawberry cultivars (cvs. Paros and Pajaro) was investigated using Murashige and Skoog (MS) culture medium. In each cultivar, the effects of hormonal composition of the culture medium (1 mg l^{-1} BAP and 0.5 mg l^{-1} NAA + 0.2 mg l^{-1} BAP) and explant type (nodal bud and terminal bud (big and small) of runners) were studied. All explants provided from the glass greenhouse-grown plants. The *in vitro* cultures were subcultured three times at an interval of 30 d. The results of analysis of variance showed that the effect of explant type was significant for three studied traits (the number of plantlets per explant, the average height of plantlets per explant and the number of roots per explant). The best results for all three traits were obtained using nodal buds. Subculturing significantly increased the number of regenerated plantlets, so that in the third subculture, 7 plantlets were obtained from each explant. In general, the results of the present study showed the good efficiency of *in vitro* culture of nodal buds for the micropropagation of two commercial strawberry cultivars, Pajaro and Paros.

Keywords: Runner-nodal bud culture, Runner-tip culture, MS culture medium, 1-Naphthaleneacetic acid, 6-Benzylaminopurine

Citation: Naghsh, M., Moieni, A., Karimzadeh, G., Shams-bakhsh, M., & Taghavi, T.S. (2023). Study of the effects of the explant type and the hormonal composition of the culture medium in the micropropagation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) .*Plant Production and Genetics*, 4(2), 167-178. https://doi.org/ 10.22034/PLANT.2024.140066.1075

Copyrights:
Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Corresponding Author Email: moieni_a@modares.ac.ir