اثر تنظیم‌کننده‌های رشد و انواع ریزنمونه بر باززایی و ریزازدیادی توت‌فرنگی تجارتی رقم سلوا (*Fragaria* × *ananassa* cv. Selva)

گلنوش مدنی[۱]، سیروس قبادی[۲*]، بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی[۱]، مجید طالبی[۱] و احد یامچی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۷)

چکیده

توت‌فرنگی یکی از محصولات مهم باغبانی است که به‌دلیل دارا بودن مقادیر قابل ملاحظه مواد معدنی، انواع ویتامین‌ها، عطر و طعم، و متابولیت‌های ثانویه مقبولیت زیاد بین مصرف‌کنندگان دارد. معمول‌ترین روش ازدیاد توت‌فرنگی استفاده از ساقه رونده می‌باشد. اما تعداد گیاهچه حاصل محدود است. از نظر تولید انبوه و هم‌چنین انتقال ژن، بهینه‌سازی روش‌های کشت بافت توت‌فرنگی (*Fragaria* X *ananassa* Duch.) بسیار حائزاهمیت است. در این پژوهش، باززایی رقم سلوا با استفاده از ریزنمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و مریستم در محیط کشت دارای ترکیبات مختلف مورد بررسی قرار گرفت. از بین این ریزنمونه‌ها، نوک ساقه (shoot tip) در محیط کشت MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) و هیپوکوتیل در محیط کشت MS دارای تنظیم‌کننده‌های رشد توفوردی (2,4-D)، BAP و تیدیازورون (TDZ) به‌ترتیب به میزان ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌صورت مستقیم (بدون تشکیل فاز حد واسط کالوس) باززا گردید. هم‌چنین هیپوکوتیل روی محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌صورت غیرمستقیم باززا شد. ریزنمونه‌های برگی این رقم تجارتی در این پژوهش باززا نشدند. به‌کارگیری زغال فعال در کشت بافت این گیاه نه تنها مشکل ترشح مواد فنولی در محیط کشت را برطرف نمود، بلکه رشد بهتر ریزنمونه‌ها را نیز به دنبال داشت.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، نوک ساقه، هیپوکوتیل، کالوس، زغال فعال

مقدمه

در توت‌فرنگی، چندین سطح پلوئیدی شناخته شده و معمولاً افزایش تعداد گروه‌های کروموزومی با رشد و نمو قوی‌تر گیاه، بزرگ‌تر شدن برگ‌ها، گل‌ها و میوه‌ها همراه می‌باشد. این ویژگی‌ها در توت‌فرنگی آناناس (*F.* × *ananassa* L.) که مهمترین گونه توت‌فرنگی اکتاپلوئید (۲n =۸x =۵۶) مورد کشت در جهان است و محصولی با ارزش در باغبانی به حساب می‌آید، به طور بارزی وجود داشته و با اجرای برنامه‌های به‌نژادی به ارقام جدید انتقال داده شده است (۱ و ۱۱). به منظور ازدیاد توت‌فرنگی می‌توان از کشت بذر (روش جنسی) استفاده

۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۳. گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: cyrus@cc.iut.ac.ir

کرد که تنها در ارقام فاقد ساقه رونده و یا در برنامه‌های اصلاحی از آن استفاده می‌شود و برای تهیه گیاهچه به صورت تجاری مناسب نیست. علاوه بر این، بذر توت‌فرنگی برای جوانه‌زنی به شش تا هشت هفته سرمادهی و یا تیمارهای خاص نیاز دارد (۳۰ و ۴۳). بنابراین، روش عمومی ازدیاد توت‌فرنگی، روش غیرجنسی است (۷، ۱۱ و ۴۵) که می‌تواند از طریق تقسیم بوته و به طور مرسوم، به کمک ساقه‌های رونده انجام شود (۸). در عمل، یک گیاه مادری تنها تعداد محدودی گیاهچه با قابلیت رشد مناسب تولید می‌کند و این روش کاملاً وابسته به فصل بوده و پتانسیل تولید را می‌کاهد (۱). از این‌رو، ایجاد روش‌های سریع و پربازده ازدیاد همواره مورد توجه بوده است. به این منظور، مطالعات باززایی از طریق کشت بافت و به‌کارگیری ریزنمونه‌های مختلف مانند مریستم (۱۷، ۲۶، ۳۰، ۳۲، ۳۹، ۴۰ و ۴۵)، نوک ساقه (۱۴ و ۴۵)، دمبرگ (۲۱، ۲۲ و ۳۹)، ساقه رونده (۲۸) و سایر بافت‌ها در گونه‌های مختلف این جنس انجام شده است (۷ و ۳۱). ژنوتیپ، نوع و منبع ریزنمونه، تعادل هورمونی و شرایط نگهداری نمونه‌ها، مهار فنل ترشحی از بافت‌های آسیب دیده و مواردی از این دست از مهمترین عوامل تأثیرگذار در باززایی موفق توت‌فرنگی هستند (۵، ٦، ۱۰، ۱۴، ١٦ و ۳۴). هر یک از این عوامل می‌توانند میزان باززایی را از صفر تا ۱۰۰٪ تغییر دهد (۲۱).

توت‌فرنگی از جمله گیاهانی است که حاوی ترکیبات فنلی است و در اثر تنش‌های زنده و غیر زنده مقدار آنها افزایش می‌یابد. در حین جداسازی ریزنمونه و پس از صدمه دیدن بافت، این ترکیبات با فعالیت پلی‌فنل‌اکسیدازها که در پلاست‌های سلول‌ها وجود دارند، اکسید شده و موجب قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت مزبور می‌گردند. محصولات این اکسیداسیون فعالیت آنزیمی را متوقف نموده و سبب تیره شدن بافت‌ها، عدم تثبیت ریزنمونه در محیط کشت و در نهایت مرگ ریزنمونه می‌شود (۲۰). از روش‌های غلبه بر این مشکل، استفاده از زغال فعال و پلی‌وینیل پیرولیدین (PVP) در محیط کشت می‌باشد که در جذب ترکیبات بازدارنده رشد مانند فنل‌ها مشارکت دارند (۷ و ۳۷).

توسعه روش‌های ریزافزایی نه تنها بخش بسیار مهمی از برنامه‌های پژوهشی اصلاحی درون شیشه‌ای (*In vitro*) و انتقال ژن به این گیاه است، بلکه به دلیل عدم وابستگی به فصل، زیاد بودن سرعت و کیفیت ازدیاد، امکان تولید گیاه عاری از بیماری و جلوگیری از انتقال بسیاری از بیماری‌های جابجا شونده توسط خاک و گیاه بسیار ارزشمند می‌باشد (۴، ۷ و ۴۵). از این رو، با توجه به ارزش اقتصادی و فراهم بودن بستر اقلیمی جهت کشت گسترده‌تر این محصول در نقاط مختلف ایران و به عنوان پیش زمینه لازم جهت انتقال ژن با اهداف کمی و کیفی، این پژوهش با هدف انتخاب ریزنمونه مناسب جهت کشت بافت رقم تجاری سلوا، بهینه سازی محیط کشت، ریزازدیادی و تولید گیاه کامل در شرایط گلخانه صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

ابتدا به منظور پرورش گیاه درون شیشه‌ای و استریل کردن توت‌فرنگی، میوه رسیده رقم سلوا از گلخانه‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه و بذرهای آن از گوشت میوه جدا گردید. تعدادی از بذرها به مدت حداقل یک ماه تحت تیمار سرما (۴ درجه سلسیوس) قرار گرفتند و تعدادی نیز در محلول ppm ۵۰۰۰ اترل به مدت یک شبانه‌روز غوطه‌ور شدند. به منظور ضدعفونی نمودن، بذرها در محلول ۳۰٪ سفید کننده خانگی حاوی ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به همراه ۰/۰٦ درصد شوینده (Tween 20) به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. سپس نمونه‌ها در شرایط استریل سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند. تعدادی از بذرهای ضدعفونی شده روی محیط MS بدون هورمون کشت داده شدند. تعدادی از بذرها نیز روی کاغذهای صافی مرطوب در ظروف پتری سترون قرار داده شدند. این نمونه‌ها در اتاق رشد (دمای ۲ ±۲۲ درجه سلسیوس و شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار داده شدند. پس از جوانه‌زنی، گیاهچه‌های حاصل هر ماه واکشت شدند تا بعد از رشد کافی در آزمایش‌های بعدی

جدول ۱. تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مورد استفاده در ریزازدیادی توت‌فرنگی با استفاده از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و برگ

نام تیمار	نوع ریزنمونه	غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد (میلی‌گرم بر لیتر)						
		IAA	IBA	NAA*	2,4-D	GA3	TDZ	BAP
H_1	هیپوکوتیل	----	----	۰/۹	----	----	----	۱/۱
H_2	هیپوکوتیل	----	----	----	۰/۰۱۱	----	۱	۰/۱۱
H_3	هیپوکوتیل	----	----	----	۰/۱	----	----	۰/۵
H_4	هیپوکوتیل	----	----	----	۱	----	----	۲
H_5	هیپوکوتیل	----	----	----	----	----	----	۲
L_1	برگ	----	----	----	----	----	----	۲
L_2	برگ	----	----	----	----	----	----	۴
L_3	برگ	۱/۹	----	----	----	----	----	۲
L_4	برگ	۳/۸	----	----	----	----	----	۴
L_5	برگ	۱۵	----	----	----	----	----	۱۰
L_6	برگ	۱۵	----	----	----	----	----	۳۰
L_7	برگ	۱۵	----	----	----	----	----	۵۰
L_8	برگ	۰/۴	----	----	----	----	----	۴
L_9	برگ	۴	----	----	----	----	----	۰/۵
L_{10}	برگ	----	۰/۲	----	----	----	----	۲
L_{11}	برگ	----	۰/۱	----	----	۰/۱	----	۰/۵
L_{12}	برگ	----	----	۰/۴	----	----	----	۲
L_{13}	برگ	----	----	----	۰/۱	----	----	۰/۵
L_{14}	برگ	----	----	----	۰/۳	----	----	۰/۵
L_{15}	برگ	----	----	----	۱	----	----	۲
L_{16}	برگ	----	----	----	۰/۰۱	----	۱	۰/۱
L_{17}	برگ	۱/۵	----	----	----	----	۷	----

*: نفتالین استیک اسید

مورد استفاده قرار گیرند.

اولین ریزنمونه مورد بررسی، هیپوکوتیل تـوت‌فرنگـی بـود. پس از جوانه‌زنی بذرهای توت‌فرنگی و خارج شدن بـرگ‌هـای لپه‌ای، ناحیه هیپوکوتیل در شرایط عاری از آلـودگی جـدا شـد. این ریزنمونه‌ها به محیط کـشت MS حـاوی ۳۰ گـرم در لیتـر سوکروز و ۷ میلی‌گرم در لیتر آگار با اسیدیته ۵/۷±۰/۱ پیش از اتوکلاو کردن و حاوی ویتـامین‌هـای B5 و ۰/۲ درصـد زغـال فعال دارای پنج ترکیب مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول ۱، تیمارهای H_1 تا H_5) انتقال یافتند.

ریزنمونه دوم، برگ توت‌فرنگـی‌هـای گلخانـه‌ای بـود. بـه ایـن منظور، تعدادی برگ جوان تاخورده و تعدادی برگ جوان رشد یافته انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. پـس از جـدا نمـودن برگ‌ها از یکدیگر، به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه نمونه‌ها زیر جریان مداوم آب قرار گرفتند. سپس در محلول ۵۰٪ ماده سفید کننـده حاوی ۲/۵ درصد هیپوکلریـت سـدیم، بـه همـراه چنـد قطـره شوینده، برای ۱۰ دقیقه غوطـه‌ور شـدند. بعـد از ایـن مرحلـه، نمونه‌ها تحت شرایط سترون سه بار با آب مقطر سترون شـسته شدند. سپس برای آماده‌سازی برش‌های برگـی (Leaf disc) در

شرایط استریل به کمک تیغ با حذف رگبرگ میانی، برگ‌ها به قطعات کوچک‌تر با اندازه‌های تقریبی یک تا دو میلی‌متر مربع بریده شدند و به محیط کشت MS با ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد (بر اساس مقالات مختلف و جهت بررسی اثر نوع و نسبت تنظیم‌کننده‌ها) انتقال یافتند (جدول ۱، تیمارهای L1 تا L17). سپس ظروف کشت به اتاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و تعدادی نیز در تاریکی قرار گرفتند.

به منظور کشت نوک شاخساره (Shoot tip culture) از گیاهان موجود در گلخانه، نوک ساقه‌های رونده و گره‌های در حال رشد آنها جدا شد و برگ‌های پوشاننده نوک ساقه رونده و برگ‌ها و ریشه‌های در حال تشکیل از محل گره‌ها حذف شدند. بخش‌های جدا شده، مانند آنچه برای برگ ذکر گردید، ضدعفونی شدند. در شرایط کاملاً استریل به کمک پنس و تیغ در زیر میکروسکوپ دو چشمی، برگ‌های محافظ اطراف این بافت‌ها به ترتیب حذف گردیدند. این کار تا رسیدن به قسمت انتهایی که دربرگیرنده مریستم بود، ادامه پیدا کرد. سپس ریزنمونه‌ها جهت بررسی بهترین نسبت هورمونی در کشت نوک شاخساره به محیط MS دارای ویتامین‌های B5 و ۰/۲ درصد زغال فعال حاوی IAA و BAP هر کدام در سه غلظت (صفر، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. نمونه‌ها برای باززایی و طی مراحل رشدی به اتاق رشد با شرایط ذکر شده برده شدند.

برای بررسی میزان اثرگذاری سوکروز، مریستم‌های جدا شده در شرایط استریل به محیط MS دارای ویتامین B5 و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و IAA دارای تیمار ۳۰ گرم در لیتر و ۲۰ گرم در لیتر سوکروز انتقال داده شدند.

به منظور مطالعه اثر نوع آنتی اکسیدان به کار گرفته شده در محیط، محیط کشت MS دارای ویتامین B5 که به آن ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و IAA افزوده شده بود، با تیمارهای شامل ۲٪ PVP و دیگری ۰/۲ درصد زغال فعال مورد مقایسه قرار گرفت.

برای بررسی اثر نوع ویتامین به کار رفته، محیط MS با ویتامین‌های مربوطه و محیط MS دارای ویتامین‌های B5 مورد مقایسه قرار گرفت. سایر مواد محیطی مشابه و شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و IAA بود.

جوانه‌ها و شاخه‌های تولیدی از ریزنمونه‌های مختلفی مانند مریستم که روی محیط باززایی خود، به میزان مناسب رشد کرده بودند به محیط ریشه‌زایی که محیط MS با غلظت‌های متفاوت IAA (صفر و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (صفر، ۰/۳ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) بود، انتقال یافتند.

پس از کشت ریزنمونه‌ها و باززا شدن و ریشه‌زایی آنها، نمونه‌ها در صورت رشد زیاد و نیاز به واکشت، به محیط MS با غلظت IAA (صفر و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (صفر، ۰/۳ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) انتقال یافتند تا به رشد خود در محیط تازه ادامه دهند.

کلیه این آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار شامل چهار ریزنمونه بود. ریزنمونه‌های کشت داده شده پس از حدود یک ماه از نظر طول ساقه و تعداد ساقه‌های تولید شده مقایسه شدند و داده‌های حاصل از امتیازدهی به گیاهان باززا شده با برنامه SAS مورد مقایسه آماری و تجزیه واریانس قرار گرفتند.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی بذرها

توت‌فرنگی آناناس رقم سلوا از ارقام پرمحصولی است که نه تنها در ایران بلکه در کل دنیا از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. بذرهای این رقم نیز مانند آنچه برای سایر بذرهای این جنس گفته می‌شود، نیازمند تیمارهایی جهت جوانه‌زنی است. هر دو تیمار سرمادهی برای حداقل یک ماه (۴ درجه سلسیوس) و تیمار بذرها در اتر ppm ۵۰۰۰ به مدت ۲۴ ساعت موجب افزایش جوانه‌زنی بذرهای توت‌فرنگی گشت، که با نتایج اغلب تحقیقات انجام شده هماهنگ است (۳۰ و ۴۳). بذرهای جدا شده و استریل شده روی محیط کشت MS

بدون هورمون ۳۰٪ و بذرهای قرار گرفته روی کاغذ صافی مرطوب استریل ۵۰٪ در مدت زمان مشابه جوانه زدند. درصد جوانه‌زنی بیشتر بذرها روی کاغذ مرطوب نسبت به محیط جامد MS مؤید عدم نیاز شدید بذر در حال جوانه‌زنی به مواد غذایی خارجی است و اینکه مهمترین عامل در جوانه‌زنی، رطوبت محیط می‌باشد.

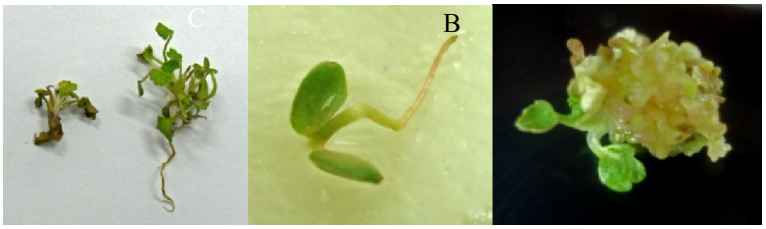
رشد و نمو درون شیشه‌ای گیاهان تحت تأثیر بسیاری از عوامل از جمله ژنتیک گیاه، فاکتورهای فیزیکی رشد (نور، دما، پ- هاش، غلظت CO_2 و O_2)، مواد غذایی، آب، عناصر پرمصرف و کم‌مصرف، منبع قندی و برخی مواد آلی (تنظیم‌کننده‌های رشد و ویتامین‌ها) می‌باشد (۲، ۳، ۴، ۱۴، ۲۲، ۳۱، ۳۲ و ۳۷). در این پژوهش نیز هر یک از ریزنمونه‌های مورد استفاده تحت شرایط خاص و با نیازهای مخصوص به خود روند باززایی را طی نمودند.

باززایی ریزنمونه هیپوکوتیل

ریزنمونه‌های هیپوکوتیل قرار داده شده روی محیط H_2 پس از دو هفته به صورت مستقیم و بدون تشکیل فاز حد واسط کالوس، باززا شدند (شکل‌های۱- A و B). ریزنمونه‌های قرار داده شده روی محیط H_1 نیز با گذشت دو هفته مستقیماً باززا شدند. دو محیط کشت H_3 و H_4 که تنها حاوی BAP و 2,4-D بودند، باززایی ریزنمونه‌ها را در دو هفته اول به دنبال داشتند. اگرچه این شاخه‌های تولید شده قدرت ادامه رشد و ریشه‌زایی نداشته و از بین رفتند، اما باززایی و اندام‌زایی روی محیط کشت H_5 که تنها حاوی سیتوکینین BAP به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر بود، ابتدا با تشکیل کالوس و سپس باززایی غیر مستقیم از آن همراه بود (شکل۱-C) که پس از اندام‌زایی از کالوس به دلیل ضعف و توقف رشد شاخه‌ها، نمونه‌ها به محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر از هورمون‌های BAP و IAA انتقال یافته و به رشد خود ادامه دادند.

عدم باززایی و ریشه‌زایی ریزنمونه هیپوکوتیل روی محیط حاوی BAP و 2,4-D با برخی گزارش‌ها مبنی بر جنین‌زایی در حضور این دو تنظیم‌کننده رشد مغایرت دارد (۱۴). اما در این پژوهش، با افزودن تیدیازورون (TDZ) به عنوان یک هورمون سیتوکینینی به محیط، نمونه‌ها به طور مستقیم باززا شده و گیاهچه قوی تولید نمودند. به نظر می‌رسد نوع سیتوکینین به‌کار گرفته شده در محیط کشت در میزان باززایی و قدرت رشدی گیاه باززا شده بسیار مهم است و از اساسی‌ترین عوامل مؤثر بر میزان موفقیت در کشت بافت می‌باشد. گفته می‌شود که جنین‌زایی سوماتیک معمولاً به وسیله اکسین‌ها تحریک می‌گردد و 2,4-D به این منظور پرکاربرد بوده است. اما گزارش‌های دیگری نیز مانند این تحقیق عدم کارایی این هورمون را مطرح نموده‌اند (۲۲). اثر نوع هورمون و غلظت به کار گرفته شده در محیط در بسیاری تحقیقات دیگر نیز مطرح شده است (٦، ۹، ۱۰، ۲۱، ۳۲ و ۳۴). مطابق با نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد هورمون TDZ در محیط کشت ریزنمونه هیپوکوتیل نسبت به BAP کارایی بهتری در اندام‌زایی مستقیم داشته است. کاربرد این هورمون بسته به نوع گیاه، نوع ریزنمونه و غلظت به کار برده شده اثرهای متفاوتی از تحریک به کالوس‌دهی تا شکل‌گیری جنین سوماتیک را به دنبال دارد (۲۴، ۳۳، ۳۵، ۴۲ و ۴۴). هورمون TDZ فعال‌ترین ماده شبه سیتوکینین است (۱۹) و تأثیر آن بر تحریک مناسب ریزنمونه‌ها به اندام‌زایی، شاخه‌زایی، کالوس‌دهی و جوانه‌زایی نابه‌جا در بسیاری تحقیقات دیگر نیز بیان شده است (۱۲، ۲۰، ۲۳، ۳۳ و ۴۱). با توجه به این نتایج می‌توان گفت که وجود هورمون رشد TDZ در محیط کشت، توانسته است تعادل مناسبی بین میزان اکسین و سیتوکینین ایجاد نماید و سبب رشد متناسب و سریع هیپوکوتیل‌ها گردد (۲۳، ۳۵ و ۳۸). این ایجاد شرایط رشدی بهینه می‌تواند به خصوصیت خاص TDZ برگردد. اگرچه این هورمون در گروه سیتوکینین‌ها قرار می‌گیرد، ولی یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد آن بروز همزمان اثر اکسین‌ها و سیتوکینین‌هاست. این در حالی است که از نظر ساختاری کاملاً متفاوت از این گروه از تنظیم‌کننده‌ها می‌باشد (۱۹).

حضور NAA در کنار BAP نیز نتایج نسبتاً مشابهی در



شکل ۱. A) برگ‌های لپه‌ای و هیپوکوتیل، B) گیاه حاصل از باززایی مستقیم هیپوکوتیل و C) باززایی غیر مستقیم هیپوکوتیل

شکل ۲. A) ترشحات فنولی آزاد شده از برگ‌های گلخانه‌ای پس از ۲۴ ساعت، B) جذب مواد فنولی توسط آنتی‌اکسیدان، C) آغاز کالوس‌زایی در ریزنمونه برگ و D) کالوس‌دهی ریزنمونه برگی

باززایی مستقیم از هیپوکوتیل در بر داشت. اما در این محیط، نسبت به محیط قبلی، غلظت سیتوکینین ۱۰ برابر بوده که می‌تواند خود گواهی بر ضعیف‌تر بودن BAP نسبت به TDZ در باززایی ریزنمونه‌ای مانند هیپوکوتیل باشد. پیش از این نیز مطالعات دیگری نتایج مشابه به دست آورده‌اند (۲۳، ۲۶ و ۳۵).

در محیط کشتی که تنها دارای سیتوکینین از نوع BAP بود، باززایی هیپوکوتیل به صورت غیرمستقیم و با تشکیل مرحله میانی کالوس صورت گرفت. به کارگیری سیتوکینین بدون حضور اکسین‌ها روند رشدی سلول‌ها را به سمت کالوس‌دهی می‌برد و سپس اندام‌زایی از کالوس‌های تشکیل شده اتفاق می‌افتد. در عین حال، محیط دارای سیتوکینین بدون دارا بودن اکسین نتوانست اندام‌زایی بیشتر و ریشه‌دهی را به طور کامل تحریک کند و نیاز به انتقال ریزنمونه‌های باززا شده به محیط حاوی هر دو نوع هورمون احساس شد. در منابع علمی نیز به تشکیل کالوس پیش از باززایی و در حضور سیتوکینین‌ها در محیط کشت اشاره شده است (۶، ۱۵ و ۳۰). القای جنین‌زایی مانند کالوس‌دهی به ترکیب اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها در کنار هم نیازمند است. شرایطی که گیاه برای تمایز و تشکیل جنین رویشی از سلول‌های بدنی نیاز دارد، ناشناخته بوده و به سختی فراهم می‌شود (۴).

باززایی ریزنمونه برگ

ریزنمونه‌های برگ گلخانه‌ای پس از قرارگیری روی محیط کشت، به دلیل شرایط محیطی و تنش‌های اعمال شده به گیاه و همچنین آسیب بافتی در حین ضدعفونی کردن و برش برگ‌ها، مقادیر فراوانی مواد فنولی در محیط آزاد نمودند (شکل ۲-A) و در مدت زمان کوتاهی (کمتر از ۲۴ ساعت) اکثر ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شده و از بین رفتند. از این رو، برای حل مشکل آزاد شدن مواد فنولی از ریزنمونه‌ها به محیط‌های کشت، دو نوع آنتی‌اکسیدان PVP (۲٪) یا زغال‌فعال (۰/۲ درصد) اضافه گردید. افزودن این آنتی‌اکسیدان‌ها مشکل قهوه‌ای شدن و مرگ بافت‌ها را در اکثر موارد به طور کامل مرتفع ساخت (شکل ۲-B). قهوه‌ای شدن و مرگ ریزنمونه‌ها بر اثر ترشحات فنولی از نواحی بریده شده ریزنمونه و حل این مشکل با افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط‌های کشت جهت جذب مواد فنولی و ممانعت از آسیب به بافت‌های کشت شده پیشتر هم مطرح شده بود (۷، ۲۵ و ۳۷). در مورد کشت ریزنمونه‌های برگی (چه از گیاه درون شیشه و چه از گیاه گلخانه‌ای) نتایج با اکثر

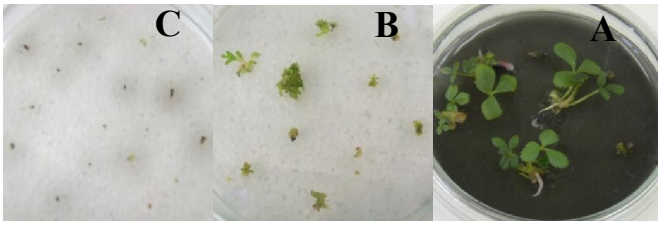
پژوهش‌های پیشین هم‌خوانی نداشت. در هیچ‌یک از محیط‌های مورد استفاده، باززایی کامل صورت نگرفت و تنها در برخی تا مرحله تولید کالوس‌های ریز و فشرده پیش رفت (اکثراً در محیط‌هایی که نسبت اکسین به سیتوکینین مساوی و یا میزان سیتوکینین بیشتر از اکسین بود، مانند L_3، L_4 و L_8)، اما باززایی به دنبال نداشت. همچنین، در این پژوهش، اندازه قطعات برگی، *in vivo* یا *in vitro* بودن آنها، قرارگیری در تاریکی یا روشنایی و نوع محیط کشت به کار گرفته شده (۴، ٦، ۱۰، ١٦، ۲۱، ۲۷، ۳۴، ٣٦ و ۳۹)، هیچ‌کدام باززایی دیسک‌های برگی را به دنبال نداشت ؛ اگرچه در تعدادی از منابع نیز عدم باززایی نمونه برگی در محیط کشت برای برخی ارقام دیگر گزارش شده (٦، ۱۰، ۱۵، ۲۱، ۳۴ و ۳۹) و این بررسی نیز تأیید می‌کند که نوع رقم به کار گرفته شده در موفقیت و میزان باززایی توت‌فرنگی بسیار حائز اهمیت است. بسیاری از محققین نیز تفاوت زیاد ژنوتیپ‌ها در ظرفیت جنین‌زایی را مطرح نموده‌اند. شاید این تفاوت‌ها به تفاوت در توانایی فعال سازی عناصر کلیدی مسیر جنین‌زایی باز گردد (۲۲). همچنین، IBA به نسبت سایر اکسین‌ها از کارایی کمتری برخوردار می‌باشد (مانند تیمار L_{10})؛ هر چند در برخی ارقام، IBA بهتر از IAA در باززایی گزارش شده است (٦ و ۲۸). ضمناً عدم حضور اکسین در محیط و نسبت بالاتر اکسین به سیتوکینین در محیط نیز بازدارنده بوده و حتی از تشکیل کالوس‌های ریز نیز ممانعت کرده است (مانند تیمارهای L_1، L_2، L_5 و L_9) که این مطلب مشابه با عقیده پژوهشگرانی است که معتقدند غلظت‌های زیاد هورمون IBA اثر منفی دارد. عدم حضور اکسین نیز سبب متوقف شدن باززایی می‌شود (۱۵ و ۳۴). در عین حال، به نظر می‌رسد برگ گلخانه‌ای حساسیت کمتری به تجمع هورمونی نسبت به برگ‌های درون شیشه‌ای دارد و غلظت هورمونی بیشتری جهت تحریک نیاز دارد (۲۸).

برش‌های برگی قرار داده شده روی محیط‌های کشت دارای نسبت نزدیک سیتوکنین به اکسین (مانند تیمارهای L_3 و L_4) و محیط‌هایی که میزان سیتوکینین آنها بیشتر از اکسین بوده و به ویژه آنهایی که دارای IAA و BAP بودند (تیمار L_8)، منجر به متورم شدن و حالت بادکردگی ریزنمونه‌ها (شکل ۲- C) شد. در نهایت، محیط‌های دارای نسبت تقریباً مساوی IAA و BAP(مانند تیمارهای L_3 و L_4)، محیط‌های دارای نسبت بالاتری از BAP نسبت به IAA (مانند تیمارهای L_6 و L_8)، محیط دارای BAP دو برابر میزان 2,4-D (تیمار L_{15})، محیط دارای 2,4-D، TDZ و BAP (L_{16}) و نهایتاً محیطی که تنها دو میلی‌گرم در لیتر BAP داشت (تیمار L_1)، همگی کالوس‌های ریز و فشرده، بخصوص در حاشیه‌های برگ (شکل ۲-D)، ایجاد نمودند. ریزنمونه‌ها روی سایر محیط‌های کشت بدون تغییر خاصی از بین رفتند. در نهایت، هیچ‌کدام از نسبت‌های هورمونی باززایی دیسک‌های برگی و کالوس‌های ایجاد شده را به دنبال نداشتند. بررسی تشکیل کالوس روی ریزنمونه های اولیه نشان می‌دهد که پاسخ‌دهی در محیط‌های کشت مختلف ایجاد کننده کالوس متفاوت است. به‌طور کلی، همه ریزنمونه‌های کشت شده، کالوس ایجاد نمی‌کنند و حتی نوع کالوس ایجاد شده براساس حجم، رنگ، شکنندگی و میزان باززایی بسیار متفاوت است (۳).

باززایی ریزنمونه مریستم

پس از ضدعفونی کردن، جداسازی و قرار دادن گنبدهای مریستمی روی محیط کشت، این ریزنمونه‌ها نیز مانند برش‌های برگی به دلیل مقدار فنول زیاد دچار قهوه‌ای شدن و مرگ شدند (شکل ۳- A). از این رو، به محیط کشت این بافت‌ها نیز آنتی‌اکسیدان افزوده شد که در این مورد نیز مشکل قهوه‌ای شدن و مرگ ریزنمونه‌ها بر طرف گردید (شکلهای ۳-B و C).

به منظور آزمون بهینه‌سازی محیط کشت برای رشد مناسب مریستم‌ها، بررسی‌های آماری اجرا شده روی این ریزنمونه حاکی از آن بود که در سطح احتمال ۱٪ از لحاظ طول شاخه‌های تولیدی محیط‌های دارای نسبت مساوی اکسین به سیتوکینین نسبت به سایر تیمارهای هورمونی تفاوت معنی‌داری نشان داده و مناسب‌تر تشخیص داده شدند. محیط‌هایی که در آنها IAA وجود نداشت، ضعیف‌ترین نتایج را به دنبال داشتند.



شکل ۳. A) ترشحات فنولی آزادشده در محیط پس از ۲۴ ساعت از کشت نوک شاخساره‌ها، B) جذب مواد فنولی توسط PVP و C) جذب مواد فنلی توسط زغال فعال

جدول ۲. مقایسه میانگین طول شاخساره و تعداد شاخساره گیاه باززا شده از کشت مریستم در غلظت‌های هورمونی مختلف براساس آزمون LSD و سطح احتمال ۵٪

BAP:IAA (mg/L)	میانگین تعداد شاخساره	میانگین طول شاخساره (سانتی‌متر)
(۰ و ۰)	۲/۰۶ de†	۰/۱۳۵ d
(۰ و ۲)	۱/۶۷e	۰/۹ d
(۰ و ۴)	۱ e	۰/۶۵d
(۲ و ۰)	۴/۸۳ bc	۱/۵۲c
(۲ و ۲)	۹/۷a	۲/۱۵a
(۲ و ۴)	۵/۶۷ bc	۱/۹۷ab
(۴ و ۰)	۴/۳۳cd	۱/۶۵bc
(۴ و ۲)	۷ b	۲/۲۳a
(۴ و ۴)	۷ b	۲/۲۲a

† وجود حداقل یک حرف مشترک، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین تیمارها در سطح ۵٪ می‌باشد.

از لحاظ تعداد ساقه‌های تولید شده، محیط دارای دو میلی‌گرم در لیتر از هر یک از هورمون‌های IAA و BAP بیشترین تعداد ساقه و محیط‌های فاقد IAA کمترین تعداد ساقه را ایجاد نمودند. طبق نتایج به دست آمده، محیط‌هایی که اکسین در آنها به‌کار نرفته بود، کمترین تعداد و کوتاهترین ساقه‌ها را تولید کردند (جدول ۲). بنابراین، نسبت هورمونی متعادل بین BAP و IAA منجر به بهترین باززایی، طول مناسب شاخساره و ظاهر طبیعی گیاه گردید. این در حالی است که عدم حضور اکسین در محیط، به شدت بر این روند اثر منفی داشت. با توجه به نتایج، در کشت نوک شاخساره در توت‌فرنگی رقم سلوا محیط MS دارای دو میلی‌گرم در لیتر هورمون بنزیل‌آمینوپورین و دو میلی‌گرم در لیتر ایندول‌استیک‌اسید محیط مناسبی می‌باشد. به نظر می‌رسد که حضور اکسین در باززایی مستقیم از مریستم‌ها مهمتر از حضور سیتوکینین بوده، زیرا عدم حضور اکسین در محیط نتایج ضعیف‌تری از محیط فاقد سیتوکینین ایجاد نموده است. در گزارش‌های علمی گذشته نیز به اهمیت حضور هورمون اکسین در باززایی اشاره شده است (٦، ۱۵ و ۳۴). همچنین، قرارگیری محیط‌های بدون سیتوکینین در گروه‌های متوسط در بررسی ویژگی‌های مورد مطالعه گیاه باززا شده نیز بیانگر اثر مثبت و افزاینده این هورمون رشد گیاهی در کنار اکسین برای باززایی بهتر ریزنمونه‌هاست (٦، ۱۵ و ۲۱). در مورد این ریزنمونه نیز یکی از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر

میزان باززایی و طبیعی بودن گیاهان حاصل از کشت بافت، غلظت و نسبت هورمونی به کار گرفته شده در محیط‌های کشت می‌باشد (٦، ١٠، ٢١ و ٣٤)، که نتایج این تحقیق نیز مبین این نکته بود.

طرح کاملاً تصادفی اجرا شده برای بررسی اثر میزان سوکروز در محیط کشت نیز پس از مقایسه داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار (در سطح ٥٪) در بین دو تیمار اعمال شده بود. در برخی منابع به اثر مثبت به‌کارگیری میزان زیاد سوکروز و برخی دیگر تأثیر مثبت مقادیر کمتر سوکروز (١٨، ٢٢ و ٣٧) در باززایی ریزنمونه‌ها را مطرح نموده‌اند.

هرچند در بررسی نوع آنتی‌اکسیدان مصرف شده در محیط کشت از لحاظ تعداد شاخه و برگ تولیدی گیاهان باززا شده تفاوت آماری معنی‌داری در سطح ٥٪ در بین تیمارها دیده نشد، اما از جنبه طول شاخه‌ها در سطح ٥٪، محیط دارای ٠/٢ درصد زغال فعال برتر از محیط حاوی ٢٪ PVP عمل نمود. با وجود اینکه زغال فعال در تحقیقات گذشته در کشت بافت توت‌فرنگی کمتر مورد استفاده قرار گرفته، اما با توجه به نتایج این پژوهش، به عنوان آنتی‌اکسیدان مناسبی جهت کشت بافت توت‌فرنگی پیشنهاد می‌گردد. آثار مثبت به‌کارگیری این آنتی‌اکسیدان در محیط کشت می‌تواند به دلیل جذب بهتر مواد فنولی و زائد از محیط و همچنین تیرگی محیط‌های کشت که رشد بهتر ریزنمونه‌ها را فراهم می‌کنند و سبب تأخیر در تجزیه شدن هورمون‌های رشد بر اثر نور نیز می‌گردند، باشد. برخی از پژوهشگران آزادسازی مواد مفید در رشد گیاه را نیز به عنوان مزیت برای زغال فعال مطرح نموده‌اند (٧ و ٣٧).

برخی از منابع (٣٠ و ٤٥) برای باززایی توت‌فرنگی از ویتامین‌های محیط MS و برخی دیگر (١٣، ٣٤، ٣٦ و ٣٩) از ویتامین‌های محیط B5 استفاده کرده بودند؛ اگرچه در مورد رقم سلوا و ریزنمونه مریستم، نتایج از نظر آماری مشابه بود.

ریشه‌زایی

در بین محیط‌های به کار گرفته شده برای ریشه‌زایی، محیط دارای دو میلی‌گرم در لیتر IAA و BAP ریشه‌زایی بهتری را نسبت به سایر محیط‌ها به دنبال داشت. محیط فاقد هر دو نوع تنظیم کننده رشد نیز پس از محیط اول ریشه‌زایی مناسبی در نمونه‌ها ایجاد نمود، هر چند روی سایر محیط‌ها هم ریشه ایجاد شد و حتی معدودی از ریزنمونه‌ها در همان محیط باززایی خود نیز با گذشت بیش از یک ماه ریشه‌دار شدند. حضور همزمان اکسین و سیتوکینین در محیط ریشه‌زایی، مانند آنچه برخی بررسی‌های دیگر نیز نشان داده (٧)، می‌تواند تولید ریشه را بهتر القا نماید و رشد سریع‌تر ریشه‌ها را موجب گردد. اما محیط MS بدون هورمون نیز این امکان را به گیاه می‌دهد که خود تنظیم‌کننده‌های رشدی مورد نیاز برای ریشه‌زایی را ایجاد نموده و برای تحریک به ریشه‌دهی محیط مناسب و مقرون به صرفه‌تری است. بسیاری از تحقیقات دیگر نیز جهت ریشه‌دار نمودن نمونه‌های باززا شده همین محیط را توصیه نموده‌اند (١٠، ١٦، ٢٩، ٣٠، ٣٤ و ٣٦).

واکشت

پس از باززا شدن و ریشه‌زایی، واکشت نمونه‌ها به منظور ادامه رشد و ازدیاد آنها انجام شد که در بین محیط‌های بررسی شده، محیط فاقد هورمون و محیط دارای هورمون‌های اکسین و سیتوکینین به خوبی ادامه رشد گیاهان حاصل را امکان‌پذیر ساختند و گیاه‌های تولید شده دارای رشد مناسب، شکل طبیعی و ریشه‌زایی کامل بودند. هر ماه، نمونه‌ها به محیط جدید منتقل می‌شدند تا به رشد خود ادامه دهند (شکل ۴). به نظر می‌رسد که در صورت افزوده شدن یک نوع تنظیم‌کننده رشد به محیط کشت، تعادل لازم برای رشد گیاه از بین می‌رود و گیاه قادر به تطبیق خود با شرایط نامتعادل هورمونی نیست (١٦ و ٣٠). گیاه در محیط فاقد هورمون نیز خود مواد مورد نیاز و تنظیم‌کننده‌های لازم برای رشد را می‌سازد و با ایجاد شرایط مناسب محیط را برای رشد مهیا می‌نماید (١٦).

شکل ۴. مراحل رشد توت‌فرنگی رقم سلوا از مریستم تا گیاه کامل

نتیجه‌گیری

براساس نتایج این پژوهش، ریزنمونه‌های مریستم در محیط کشت MS تغییر یافته دارای دو میلی‌گرم در لیتر BAP و دو میلی‌گرم در لیتر IAA و هیپوکوتیل در محیط کشت MS دارای تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D، BAP و TDZ به ترتیب به میزان ۰/۰۱، ۰/۱ و یک میلی‌گرم در لیتر به صورت مستقیم و بدون تشکیل فاز حد واسط کالوس بیشترین میزان باززایی را به دنبال داشتند، که این خود نه تنها از جنبه ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای توت‌فرنگی رقم سلوا، بلکه به عنوان پیش زمینه بسیار مناسب جهت اهداف اصلاحی و انتقال ژن به این گیاه، مورد توجه می‌باشد. همچنین، بر خلاف اکثر تحقیقات انجام شده پیشین روی توت‌فرنگی، زغال فعال به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بسیار مناسب جهت ممانعت از قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها و ادامه رشد ریزنمونه‌های مختلف روی محیط کشت معرفی می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری‌های بی‌دریغ آقای مهندس پرهام حسینی دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی طی انجام این پژوهش صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. بهنامیان، م. و س. مسیحا. ۱۳۸۴. توت‌فرنگی، نشر ستوده، تبریز، ایران.

۲. فارسی، م. و ج. ذوالعلی. ۱۳۸۲. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۳. معینی، ا. و د. کهریزی. ۱۳۸۲. کشت بافت گیاهی (ترجمه). انتشارات سازمان بسیج دانشجویی، تهران، ایران.

۴. موسوی زاده، ج.، ک. مشایخی و م. اثنی عشری. ۱۳۸۸. بررسی کالوس‌زایی و جنین‌زایی رویشی توت‌فرنگی. فن‌آوری تولیدات گیاهی ۹(۱): ۵۵-۶۸.

5. Ashraf, M. and M.R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59(2): 206-216.
6. Barcelo, M., I. El-Mansouri, J.A. Mercado, M.A. Quesada and F.P. Alfaro. 1998. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 54: 29-36.
7. Bhatt, I.D. and U. Dhar. 2000. Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60: 83-88.
8. Bringhurst, R.S., V. Voth and D. Van Hook. 1960. Relationship of root starch content and the chilling history of performance of California strawberries. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 75:373-381.
9. Debnath, S.C. 2005. Strawberry sepal: Another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration. In Vitro Cell Dev. Biol. 41: 671-676.
10. Folta, K.M., A. Dhingra, L. Howard, P.J. Stewart and C.K. Chandler. 2006. Characterization of LF9, an octoploid strawberry genotype selected for rapid regeneration and transformation. Planta 224(5): 1058-1067.
11. Gaafar, R.M. and M.M. Saker. 2006. Monitoring of cultivars identity and genetic stability in strawberry varieties grown in Egypt. World J. Agric. Sci. 2(1): 29-36.

12. Gallo-Meagher, M., R.G. English and A. Abouzid. 2000. Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. In Vitro Cell. Dev. Biol. 36: 37-40.
13. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures and soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
14. Gerdakaneh, M., A.A. Mozafari, A. Khalighi and A. Sioseh-mardah. 2009. The effects of carbohydrate source and concentration on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duch.). American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 6 (1): 76-80.
15. Gruchała, A., M. Korbin and E. Zurawicz. 2004. Conditions of transformation and regeneration of 'Induka' and 'Elista' strawberry plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 79: 153-160.
16. Hanhineva, K., H. Kokko and S. Karenlampi. 2005. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. In Vitro Cell Dev. Biol. 41: 826-831.
17. Hirai, D., K. Shirai, S. Shirai and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. Euphytica 101: 109-115.
18. Hong Vu, N., P. Hoang Anh and D.T. Nhut. 2006. The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. "First Prize". Plant Cell Tiss. Org. Cult. 87(3): 315-320.
19. Huetteman, C.A. and J.E. Preece. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 33(2): 105-119.
20. Husain, M.K., M. Anis and A. Shahzad. 2007. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpusmarsupium* Roxb.) using Thidiazuron. In Vitro Cell Dev. Biol. 43: 59-64.
21. James, D.J., A.J. Passey and D.J. Barbara. 1990. Regeneration and transformation of apple and strawberry using disarmed Ti-binary vectors. PP. 239-248. *In*: Lycett, G. W. and D. Grierson (Eds.), Genetic Engineering in Crop Plants. Butterworths, Boston.
22. Karimi Kordestani, G. and O. Karimi. 2008. Picloram-induced somatic embryogenesis in leaves of strawberry (*Fragaria ananassa* L.). Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 50(1): 69-72.
23. Kim, M.K., H.E. Sommer, B.C. Bongarten and S.A. Merkle. 1997. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. Plant Cell Rep. 16: 536-540.
24. Kishor, P.B.K. 1995. Over expression of *p5cs* increases proline production. Plant Physiol. 108: 1387-1394.
25. Kitazava, H., T. Asao, T. Ban, M.H.R. Pramanic and T. Hosoki. 2005. Autotoxicity of root exudates from strawberry in hydroponic culture. J. Hort. Sci. Biotechnol. 80(6): 677-680.
26. Landi, L. and B. Mezzetti. 2006. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria.* Plant Cell Rep. 25: 281-288.
27. Litwinczuk, W. 2004. Field performace of Senga Sengana strawberry plants obtained by runners and *in vitro* through axillary and adventitious shoots. Electron. J. Pol. Agric. Univ. 7(1).
28. Liu, Z.R. and J.C. Sanford. 1988. Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. HortSci. 23(6): 1057-1059.
29. Mezzetti, B., L. Landi, T. Pandolfini and A. Spena. 2004. The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. BMC Biotechnol. 4(4): 1-10.
30. Miller, A.R. and C.K. Chandler. 1990. Plant regeneration from excised cotyledons of mature strawberry achenes. HortSci. 25(5): 569-571.
31. Moradi, K., M. Otroshy and M.R. Azimi. 2011. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures. J. Agric. Technol. 7(6): 1755-1763.
32. Mozafari, A.A. and M. Gerdakaneh. 2012. Influence of media and growth regulators on regeneration and morphological characteristics of strawberry cvs Kurdistan and Merck (*Fragaria*× *ananassa* Duch.). Int. J. Plant Physiol. Biochem. 4(5): 99-104.
33. Mroginski, E., H.Y. Rey, A.M. Gonzalez and L.A. Mroginski. 2004. Thidiazuron promotes *in vitro* plant regeneration of *Arachiscorrentina* (Leguminosae) via organogenesis. J. Plant Growth Regul. 23: 129-134.
34. Nehra, N.S. and C. Stushnoff. 1989. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114(6): 1014-1018.
35. Neto, V.B.P., T.R. Mota and W.C. Otoni. 2003. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixaorellana*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 75: 159-167.
36. Oosumi, T., H.A. Gruszewski, L.A. Blischak, A.J. Baxter, P.A. Wadl, J.L. Shuman, R.E. Veilleux and V. Shulaev. 2005. High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. Planta 223(6): 1219-1230.
37. Pan, M.J. and J. Van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. Plant Growth Regul. 26: 155-163.
38. Radhika, K., M. Sujatha and T. Nageshwar Rao. 2006. Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. Biol. Plantarum 50(2): 174-179.

39. Rugini, E. and R. Orlando. 1992. High efficiency shoot regeneration from calluses of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) stipules of *in vitro* shoot cultures. J. Hort. Sci. 67(4): 577-582.
40. Smith, S.H., R.E. Hilton and S.R. McCall. 1969. Strawberry meristem culture. Strawberry New Bull. 14: Bulletin 5.
41. Sujatha, G. and B.D. Ranjitha Kumari. 2007. High-frequency shoot multiplication in *Artemisia vulgaris* L. using thidiazuron. Plant Biotechnol. Rep. 1: 149-154.
42. Wilhelm, E. 1999. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57: 57-60.
43. Wilson, D., A. Goodall and J. Reeves. 1973. An improved technique for the germination of strawberry seeds. Euphytica 12: 362-366.
44. Yucesan, B., A.U. Turker and E. Gurel. 2007. TDZ-induced high frequency plant regeneration through multiple shoot formation in witloof chicory (*Cichorium intybus* L.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 91: 243-250.
45. Zebrowska, J.I., J. Czernas, J. Gawronski and J.A. Hortynski. 2003. Suitability of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) microplants to the field cultivation. Food Agric. Environ. 1(3&4): 190-193.