بررسی اثر متقابل بنزیل‌آدنین و کیتوسان در پرآوری درون‌شیشه‌ای توت‌فرنگی رقم سلوا

Investigation on Interaction Effect of Benzyladenine and Chitosan on *in vitro* Proliferation of Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. Selva)

رسول جلیلی‌مرندی[۱*]، لطفعلی ناصری[۱]، مهدی محسنی‌آذر[۱]، رامین حاجی‌تقی‌لو[۱] و محمدرضا مرحمتی[۱]

چکیده

ریز ازدیادی توت‌فرنگی امکان تکثیر سریع آن را فراهم می‌کند تنظیم‌کننده‌های رشد می‌توانند در ریز ازدیادی توت‌فرنگی و تکثیر سریع آن موثر باشند. با توجه به اهمیت مرحله پرآوری ریز ازدیادی، در این پژوهش اثر متقابل بنزیل آدنین و کیتوسان مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) با دو غلظت بنزیل آدنین (۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و پنج غلظت کیتوسان با وزن مولکولی بالا (صفر، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم) مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تکرار به‌کار برده شد. صفات مورد ارزیابی شامل تعداد شاخساره‌ها، قطر شاخساره‌ها، طول شاخساره‌ها، تعداد برگ، سطح برگ، میزان کلروفیل و وزن خشک توده گیاهی بود. براساس نتایج به‌دست آمده بین غلظت ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین از لحاظ تاثیر بر صفات مورد آزمایش تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. بیش‌ترین تعداد شاخساره، قطر شاخساره، تعداد برگ و وزن خشک توده گیاهی در غلظت ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین و بدون کیتوسان به‌دست آمد. اما بیش‌ترین طول شاخساره و میزان کلروفیل در ترکیب ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان مشاهده گردید. بیش‌ترین سطح برگ در ترکیب ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین با صفر، ۲۰، ۳۰ یا ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به‌دست آمد. بر اساس نتایج، ترکیب ۱ میلی‌گرم بنزیل آدنین در پرآوری رقم توت‌فرنگی سلوا معنی‌دار بود.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، توت فرنگی، بنزیل آدنین، کیتوسان، درون شیشه‌ای

۱. به ترتیب دانشیار، استادیار، کارشناس‌ارشد بیوتکنولوژی ،کارشناس‌ارشد باغبانی و دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*: نویسنده مسوول

مقدمه

توت فرنگی سلوا از ارقام تجاری توت فرنگی بوده و رقم روز خنثی می باشد *جلیلی مرندی* (Jalili Marandi. 2007). پژوهش‌گران از کشت مریستم توت‌فرنگی برای ویروس‌زدایی و تولید انبوه استفاده نموده‌اند *آبرامنکو* (Abramenko 1983) و *بات* و *دار* (Bhatt & Dhar 2000). به‌طور کلی می‌توان از قسمت‌های مختلف گیاه توت‌فرنگی نظیر برگ، ساقه، مریستم انتهایی، ریشه، ساقه رونده و قسمت‌های مختلف گل در کشت بافت استفاده نمود *خوشخوی* (Khosh-Khui, 1994). پسی و همکاران (Passey *et al*. 2002) در آزمایشی روی شش رقم توت فرنگی با استفاده از ریزنمونه‌هایی از برگ، گلبرگ، گوشوارک و ریشه در محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) و کاربرد اسیدجیبرلیک، اسیدایندول‌بوتریک اسید و بنزیل‌آدنین در مرحله پرآوری بهترین نتیجه را از ریزنمونه‌های برگ به‌دست آوردند.

طبق نتایج *ساکیلا* و همکاران (Sakila, *et al*. 2007) استفاده از غلظت ۰/۵میلی‌گرم در لیتر از بنزیل آدنین با ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین سبب کوتاه ماندن و کوتوله شدن ۵۰ درصد از گیاهان باززایی شده در توت‌فرنگی گردیده است. در پژوهش انجام شده توسط *ساکیلا* و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است که محیط کشت موراشیک و اسکوگ تکمیل شده با بنزیل آدنین همراه با جیبرلین یا کینتین، بیش‌ترین پرآوری شاخساره را در توت‌فرنگی داشته است. هم‌چنین طبق اظهار این پژوهش‌گران استفاده از گره‌های بوته توت‌فرنگی در محیط کشت موراشیک و اسکوگ با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین همراه با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین سبب پرآوری ریزنمونه‌ها می‌شود.

براساس نتایج پژوهش‌های *بیسوایس* و همکاران (Biswas *et al*. 2007) غلظت‌های ۰/۱میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک برای استقرار اولیه مریستم‌های اولیه توت‌فرنگی و طویل‌شدن شاخساره‌ها موثر بوده، بنزیل آدنین و کینتین هر کدام به‌طور جداگانه و یا به‌صورت ترکیب در باززایی شاخساره مناسب می‌باشد.

در بین تنظیم‌کننده‌های مختلف به‌کار برده شده در کشت بافت توت‌فرنگی، بنزیل آدنین همراه با نفتالین‌استیک‌اسید نتیجه بهتری نسبت به کینتین و یا استفاده بنزیل آدنین به تنهایی داشته است *بات* و *دار* (۲۰۰۰). کیتوسان یک ماده ارزان، قابل تجزیه در طبیعت، غیرسمی و تحریک کننده رشد گیاه به شمار می‌آید. کیتوسان، کینتین داستیله شده است و از پوسته سخت‌پوستان مانند خرچنگ‌ها و میگوها به‌دست می‌آید *فریپونس* (Freepons 1991). یکی از عوامل مهم در میزان تاثیر کیتوسان از لحاظ کنترل بیماری‌های قارچی، نفوذ پذیری اکسیژن و بخار آب، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، پرآوری و رشد گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای، غلظت و وزن مولکولی آن می‌باشد *پارک* و همکاران (Park *et al*. 2002)، *نگ* و همکاران (Nge *et al*. 2006) و *چین* و همکاران (Chien *et al*. 2007).

کیتوسان در کشت بافت انگور سبب تحریک رشد و نمو ریزنمونه‌ها گردیده و با غلظت ۱/۷۵درصد سبب افزایش وزن خشک ریشه، شاخساره‌ها و طویل‌شدن ساقه گردیده است اما در غلظت بالاتر از ۲/۵ درصد اثر منفی داشته است *ایت بارکا* و همکاران (Ait Barka *et al*. 2004). گزارش شده است که کیتوسان تحریک‌کننده رشد و عامل افزایش پرآوری در کشت بافت ارکیده‌ها می‌باشد. کیتوسان میگویی و قارچی، رشد و نمو بافت مریستم ارکیده را در محیط کشت مایع و جامد افزایش می‌دهد. مقادیر کم کیتوسان تاثیر زیادی بر روی رشد و نمو بافت گیاهی ارکیده دارد *نگ* و همکاران (۲۰۰۶). تاثیر مثبت کیتوسان با وزن مولکولی کم، بر باززایی درون‌شیشه‌ای جنین‌های سوماتیکی در تولید مجدد کالوس هویج، تولید دوباره ریشه و شاخساره در توت‌فرنگی و بافت مریستم جوانه‌های جانبی ارکیده گزارش گردیده است *کومه* و همکاران (Kume *et al*. 2002) و *نگ* و همکاران (۲۰۰۶).

براساس پژوهش‌های انجام گرفته در کشت بافت سیب‌زمینی گزارش شده است که غلظت‌های بین ۵ الی ۱۵میلی‌گرم در لیتر کیتوسان سبب افزایش وزن تر و خشک ریشه می‌شود و غلظت‌های بالاتر سبب کاهش وزن تر ریشه‌ها گردیده است *اصغری ذکریا* و همکاران (Asghari- Zakaria *et al*. 2009). نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که کیتوسان موجب افزایش میزان کلروفیل در بافت‌های گیاهی می‌شود *زانگ* و همکاران (Zhang *et al*. 2009).

با توجه به پژوهش‌های انجام گرفته در مورد اثرات مثبت کیتوسان و بنزیل آدنین در باززایی برخی گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای، در این پژوهش غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین و کیتوسان و ترکیب آن‌ها در پرآوری درون‌شیشه‌ای رقم توت‌فرنگی سلوا مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش که در آزمایشگاه‌های کشت بافت گروه باغبانی دانشگاه ارومیه انجام گرفت از نوک استولون‌های

(دستک‌ها) توت‌فرنگی رقم سلوا برای پرآوری در شرایط درون‌شیشه‌ای استفاده گردید. برای این منظور ریزنمونه‌های تهیه شده در کلریدجیوه ۰/۱۵درصد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت و سپس با آب مقطر استریل ۵ الی ۶ بار آبشویی شدند. ابتدا ریزنمونه‌ها در محیط کشت موراشیک و اسکوگ برای تولید شاخساره کشت گردید و بعد از ۳۵ روز شاخساره-های تولید شده که طول ۱ الی ۱/۵ سانتی‌متر داشتند به محیط کشت موراشیک و اسکوگ (MS) تکمیل شده با بنزیل آدنین با غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر و غلظت‌های مختلف کیتوسان واکشت گردید. کیتوسان مورد استفاده در این آزمایش دارای وزن مولکولی بالا بود و از شرکت Sigma-Aldrich Co. تهیه گردید. محیط‌های کشت آماده شده در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ دقیقه داخل اتوکلاو استریل گردیدند. سپس ریزنمونه‌ها به داخل ظروف حاوی محیط کشت انتقال داده شده و در اتاق رشد قرار گرفتند. شرایط اتاق رشد شامل فتوپریود شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با دمای ۲۴درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰۰ الی ۳۰۰۰ لوکس بود. پس از ۵۰ روز بعد از کشت ریزنمونه‌ها، صفات مورد نظر اندازه‌گیری و یادداشت گردید. صفات اندازه‌گیری شده شامل تعداد شاخساره، قطر شاخساره، طول شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ، میزان کلروفیل و وزن خشک توده گیاهی بود. تعداد شاخساره تشکیل شده و تعداد برگ شمارش و یاداشت گردید. طول شاخساره‌ها با خط‌کش میلی‌متری و قطر شاخساره‌ها توسط کولیس بر حسب میلی-متر اندازه‌گیری شد. سطح برگ بر حسب نمره‌دهی از ۱ الی ۴ ثبت گردید *آرورا* و همکاران (Arora *et al.* 2006). برای این منظور سطح تقریبی برگ‌ها به ۴ گروه تقسیم شد. در گروه ۱ برگ‌هایی با سطح ۱ الی ۱/۵ سانتی‌متر مربع، در گروه ۲، سطح برگ‌های ۱/۵ الی ۲ سانتی‌متر مربع، در گروه ۳، سطح برگ‌های بین ۲ الی ۲/۵ سانتی‌متر مربع و در گروه ۴، سطح برگ‌های بین ۲/۵ الی ۳ سانتی‌متر مربع نمره‌دهی گردید. میزان کلروفیل توسط دستگاه کلروفیل‌متر مدل Konica Minolta 502 بر حسب شاخص SPAD اندازه گیری شد.

وزن خشک توده گیاهی بعد از قرار دادن ریزنمونه‌ها تحت دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ساعت در آون، توسط ترازوی حساس توزین و یادداشت گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در هشت تکرار انجام گرفت. هر واحد آزمایشی شامل ۴ ظرف بود. فاکتور اول شامل دو سطح بنزیل آدنین (۱و۲ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور دوم شامل کیتوسان در پنج سطح (صفر، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم-افزار MSTATC و ASA انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن استفاده گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس (جدول۱) نشان می‌دهد که بین غلظت‌های بنزیل آدنین از لحاظ تاثیر بر صفات اندازه‌گیری شده، اختلاف معنی‌دار وجود نداشت اما بین غلظت‌های مختلف کیتوسان از لحاظ تاثیر بر صفات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار بود. اثر متقابل بنزیل آدنین و کیتوسان به جز تعداد برگ و شاخص کلروفیل در دیگر صفات مورد نظر معنی‌دار نبود.

چنان‌که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تعداد شاخساره با افزایش غلظت کیتوسان کاهش یافت و بیشترین شاخساره تولید شده مربوط به غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر کیتوسان بود. به‌عبارت دیگر در محیط‌های کشت فاقد کیتوسان که حاوی ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بود، بیش‌ترین شاخساره تولید گردید. بر اساس نتایج شکل ۲، قطر شاخساره‌های به‌وجود آمده در غلظت‌های مختلف کیتوسان کمتر از ریزنمونه‌های فاقد کیتوسان و حاوی بنزیل آدنین بود. شکل ۳ تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوسان بر طول شاخساره-ها را نشان می‌دهد و براساس نتایج به‌دست آمده بیش‌ترین طول شاخساره در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان همراه با غلظت ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین مشاهده گردید. شکل ۴ اثر متقابل بنزیل آدنین و کیتوسان بر تعداد برگ تشکیل شده را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج این شکل بیش‌ترین تعداد برگ در غلظت‌های ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با صفر میلی‌گرم در لیتر کیتوسان مشاهده گردید. چنان‌که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود، بیش‌ترین سطح برگ در ترکیب ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با صفر، ۲۰، ۳۰ یا ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به‌دست آمد. در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به علت سوختگی ریزنمونه‌ها کم‌ترین سطح برگ مشاهده گردید.

اثر متقابل بنزیل آدنین و کیتوسان بر شاخص کلروفیل برگ‌ها در شکل ۶ نشان داده شده است. براساس نتایج این نمودار بیش‌ترین شاخص کلروفیل در ترکیب ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان به‌دست آمد. بیش‌ترین وزن خشک توده گیاهی در ریزنمونه‌های فاقد کیتوسان و حاوی ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر

بنزیل آدنین مشاهده گردید (شکل۷) و با افزایش غلظت کیتوسان وزن خشک توده گیاهی کاهش یافت و کم‌ترین وزن خشک مربوط به غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان بود. شیشه‌ای شدن یکی از مشکلات معمول در ریزازدیادی می‌باشد. در اثر این پدیده ریزنمونه‌ها آبکی گردیده و شفاف می‌شوند. در این آزمایش در هیچ یک از تیمارها عارضه شیشه‌ای شدن مشاهده نگردید.

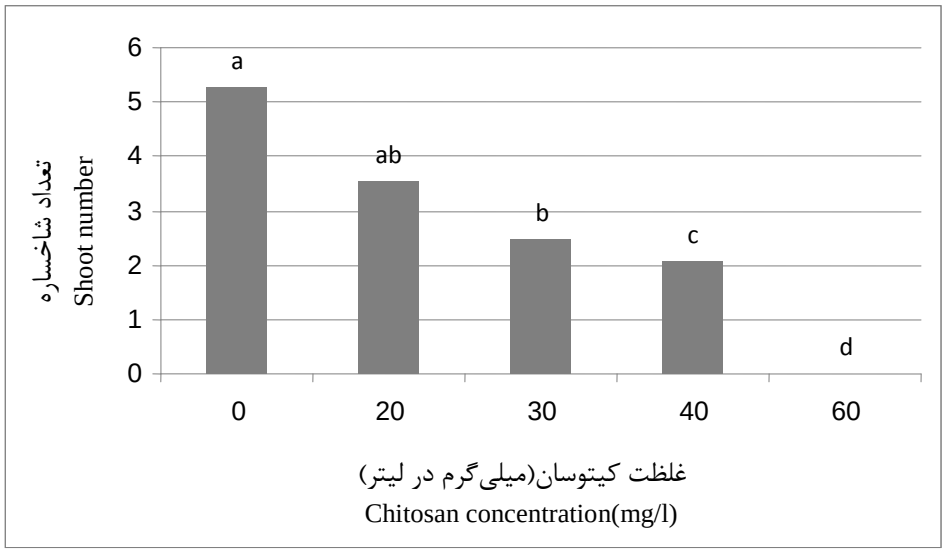
جدول۱: تجزیه واریانس تاثیر بنزیل آدنین، کیتوسان و اثر متقابل آن‌ها بر صفات اندازه گیری شده در توت‌فرنگی سلوا

Tab 1: Anova of benzyladenine , chitosan and their interaction effect on evaluated characteristics of Selva strawberry cultivar

منابع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی D.F.	میانگین مربعات MS						
		تعداد شاخساره Number of shoot	قطر شاخساره Diameter of shoot	طول شاخساره Length of shoot	تعداد برگ Number of leaf	سطح برگ size of leaf	شاخص کلروفیل Chlorophyll index	وزن خشک توده گیاهی Dry weight of plant mass
بنزیل آدنین Benzyladnine	1	0.06^{ns}	0.003^{ns}	0.022^{ns}	3.581^{ns}	2.00^{ns}	0.598^{ns}	0.000^{ns}
کیتوسان Chitosan	4	5.903^{**}	3.097^{**}	23.932^{**}	49.23^{**}	24.50^{*}	46.692^{**}	0.004^{**}
اثر متقابل بنزیل‌آدنین و کیتوسان Interaction of Benzyladenine×Chitosan	4	0.162^{ns}	0.008^{ns}	0.114^{ns}	8.671^{**}	1.37^{ns}	1.910^{**}	0.000^{ns}
خطای آزمایش Error	70	0.148	0.015	0.233	0.961	0.132	0.399	0.000
ضریب تغییرات (٪) CV %		23.23	7.67	16.89	27.56	15.17	18.27	1.76

*، ** و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ۱درصد و غیر معنی‌دار

*, ** and ns: Significant at $p < 0.01, 0.05$ and not significant, respectively.

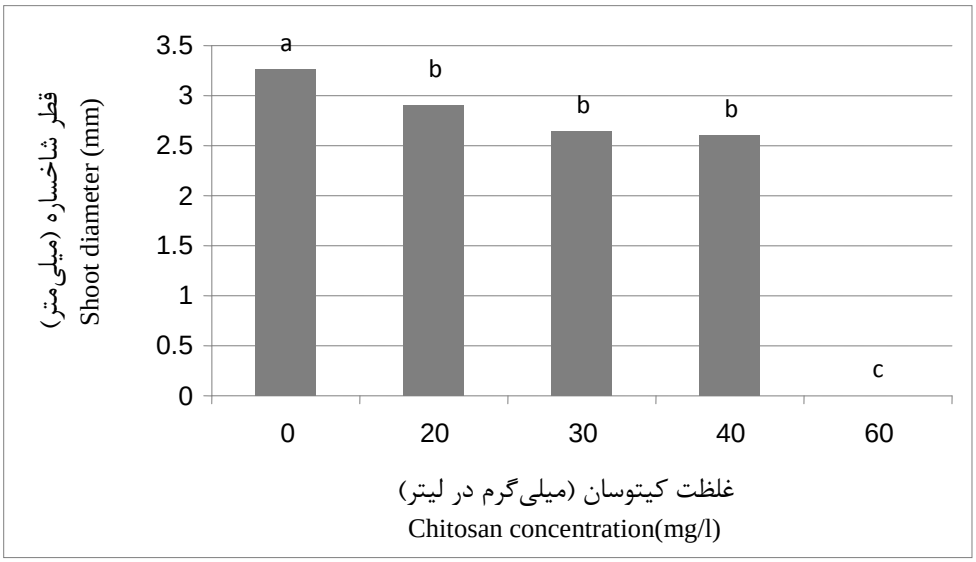


شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف کیتوسان بر تعداد شاخساره تولید شده در ریزنمونه‌ها

ستون‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

Fig 1: Effect of different concentrations of chitosan on shoot number

Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.

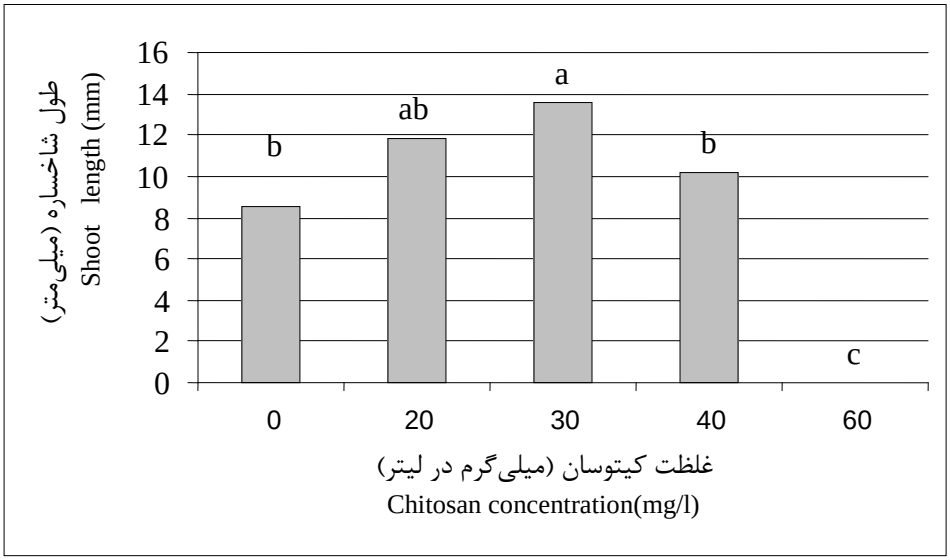


شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف کیتوسان بر متوسط قطر شاخساره.

ستون‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

Fig: 2.Effect of different concentrations of chitosan on shoot diameter

Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.

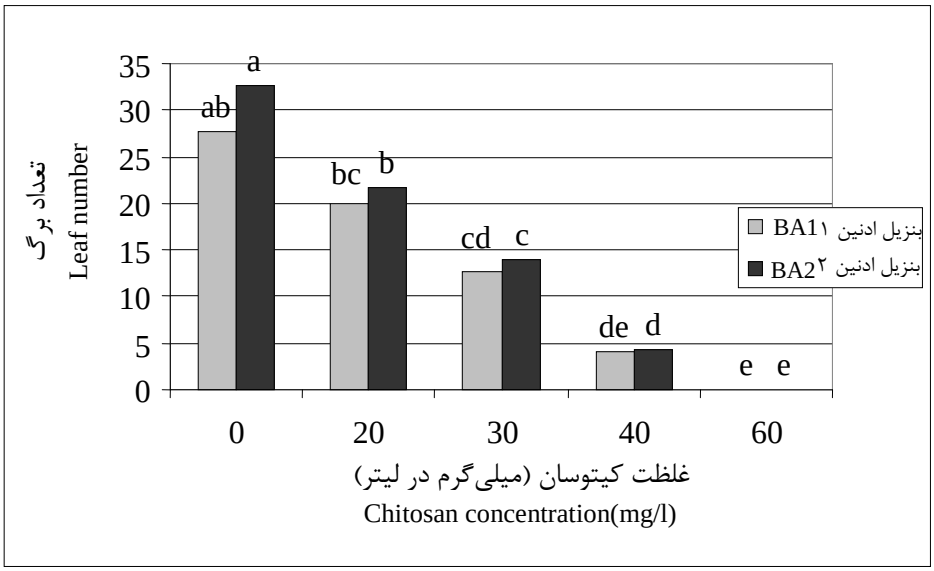


شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف کیتوسان بر متوسط طول شاخساره.

ستون‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

Fig 3: Effect of different concentrations of chitosan on shoot length

Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.

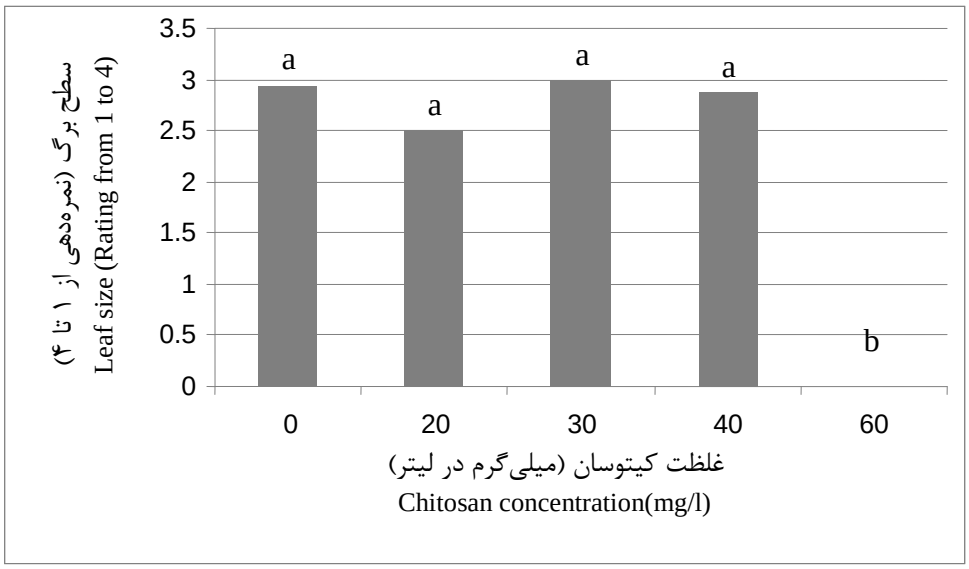


شکل ۴: اثرات متقابل بنزیل‌آدنین و کیتوسان بر تعداد برگ تشکیل شده

ستون‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

Fig 4: Interaction effect of chitosan and benzyladenine on leaf number

Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.

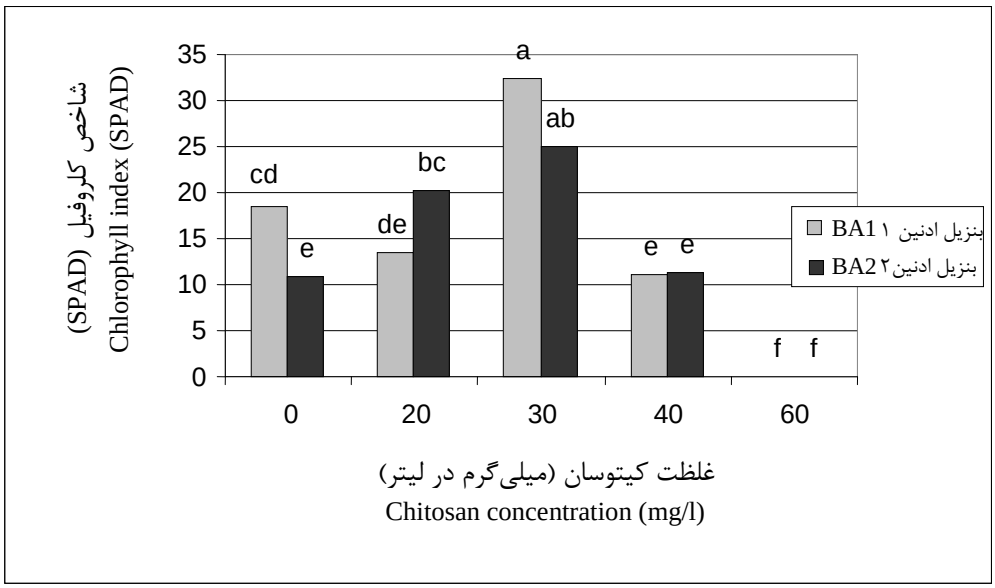


شکل ۵: اثر غلظت های مختلف کیتوسان بر سطح برگ

ستون‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

Fig 5: Effect of different concentrations of chitosan on leaf size

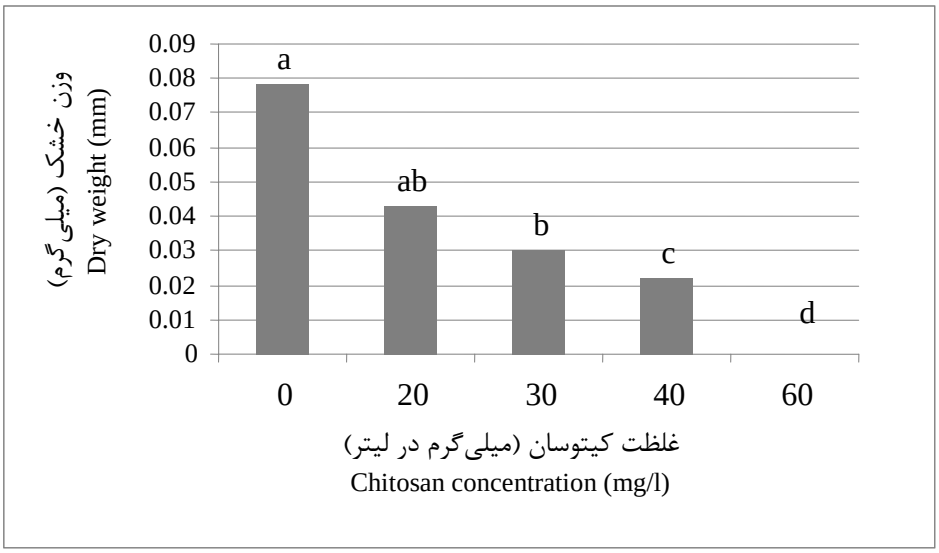
Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.



شکل۶: اثرات متقابل بنزیل‌آدنین و کیتوسان بر شاخص کلروفیل.

ستون‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

Fig 6: Interaction effect of benzyladenine and chitosan on leaf chlorophyll index.
Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.



شکل ۷: تاثیر غلظت‌های مختلف کیتوسان بر وزن خشک توده گیاهی

ستون‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با آزمون دانکن ندارد.

Fig 7: Effect of different concentration of chitosan on dry weight of plant mass
Columns with the same letters are not significantly different at 1% level of probability using DMRT.

بحث

در این پژوهش گرچه اختلاف معنی‌دار بین غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر در صفات اندازه‌گیری شده مشاهده نگردید اما افزودن بنزیل آدنین به محیط کشت سبب افزایش پرآوری شاخساره‌ها گردید و به‌صورت افزایش تعداد شاخساره‌های تشکیل شده، قطر شاخساره، تعداد برگ، کوتاه شدن طول شاخساره‌ها و افزایش وزن خشک توده گیاهی مشاهده شد. موارد فوق اثر مثبت بنزیل آدنین را در پرآوری نشان می‌دهد و با نتایج برخی پژوهش‌گران هماهنگ می‌باشد *پاسای* و همکاران (Passey *et al.* 2002)، *کارلی* و *اشوریجاری* (Carelli & Echeverrigary. 2002) و *بیس‌واس* و همکاران (Biswas *et al.* 2007).

بر اساس مطالعات *ویلکینز* و *دادز* (Wikins & Dodds. 1982) غلظت‌های ۲/۵ الی ۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین سبب افزایش تولید برگ و تولید کالوس در گیاهچه‌های پایه کلت گیلاس گردیده و با نتایج این پژوهش مبنی بر اثر بنزیل آدنین در افزایش تعداد برگ در گیاهچه‌های مورد آزمایش توت‌فرنگی سلوا مطابقت دارد.

اثر مهم بنزیل آدنین در پرآوری درون‌شیشه‌ای این آزمایش، افزایش تعداد شاخساره تشکیل شده، کاهش طول شاخساره‌ها و افزایش قطر آن‌ها بود. نتایج برخی آزمایش‌ها نشان می‌دهد که بنزیل آدنین با کاهش چیرگی انتهایی و طول شاخساره‌ها سبب افزایش تعداد شاخساره می‌شود *اون* و *میلر* (Owen & Miller. 1996)، *کارلی* و *اشوریجاری*، (۲۰۰۲) و *یاکیموا* و همکاران (Yokimova *et al*. 2000).

نتایج این آزمایش نشان داد که در غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان طول شاخساره و میزان کلروفیل بیشتر از سایر تیمارها بود اما افزایش غلظت کیتوسان سبب کاهش تعداد شاخساره، قطر شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ، وزن خشک توده گیاهی و به‌طور کلی کاهش رشد گیاهچه‌ها گردید. نتایج سایر پژوهش‌گران نیز موارد فوق را تائید می‌کند *ایت* و همکاران (۲۰۰۴) و *نگ* و همکاران (۲۰۰۶). هم‌چنین براساس گزارش *ایت* و همکاران (۲۰۰۴) غلظت ۱/۷۵ درصد کیتوسان فرموله شده (کیتوژل) موجب افزایش طول شاخساره‌ها و فتوسنتز گردیده اما با افزایش غلظت، تاثیر کیتوسان بر روی گیاهچه‌های انگور منفی بود که با نتایج این پژوهش هماهنگ می‌باشد.

گرچه براساس گزارش‌ها، کیتوسان با وزن مولکولی پایین سبب افزایش پرآوری در کشت بافت ارکیده‌ها گردیده است *نگ* و همکاران (۲۰۰۶)، اما در این آزمایش به‌دلیل استفاده از کیتوسان با وزن مولکولی بالا، باعث کاهش پرآوری در توت‌فرنگی رقم سلوا گردید. به‌نظر می‌رسد عکس‌العمل گونه‌های مختلف گیاهی نسبت به کیتوسان و وزن مولکولی کیتوسان مورد استفاده متفاوت می‌باشد. هم‌چنین کیتوسان با وزن مولکولی بالا اثر بازدارندگی در پرآوری و توسعه گیاهچه دارد *نگ* و همکاران (۲۰۰۶). براساس گزارش *نگ* و همکاران (۲۰۰۶) تاثیر کیتوسان با وزن مولکولی ۱ کیلودالتون در رشد و توسعه مریستم جوانه‌های جانبی ارکیده، چهار برابر بیشتر از کیتوسان با وزن مولکولی بالا (۱۰۰ کیلودالتون) می‌باشد.

طبق نتایج این پژوهش غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان همراه با ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین، سبب افزایش طول شاخساره گردید که علت آن ناشی از کاهش تعداد شاخساره تولید شده می‌باشد و در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان سوختگی گیاهی حاصل گردید و به نظر می‌رسد ناشی از اثر منفی غلظت و وزن مولکولی بالای کیتوسان مورد استفاده در این آزمایش باشد. طبق اظهار *نگ* و همکاران (۲۰۰۶)، کیتوسان حاوی وزن مولکولی بالا تاثیر منفی در پرآوری ریزنمونه‌ها داشته و با نتایج این این تحقیق هماهنگی دارد.

اثر متقابل بنزیل آدنین و کیتوسان در میزان کلروفیل برگ گیاهچه‌ها معنی‌دار بود و بیش‌ترین میزان کلروفیل در تیمار ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان مشاهده گردید. طبق اظهار *کیوپینگ* و *ونشوایی*، (Qiuping & Wenshui. 2007) کیتوسان موجب پایداری کلروفیل می‌گردد. زیرا احتمال دارد سبب تحریک بیان برخی ژن‌ها که در مسیر سنتز کلروفیل نقش دارند می‌شود. باتوجه به عدم اختلاف معنی‌دار بین غلظت ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین بر صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش می‌توان اظهار نمود که ترکیب ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و صفر میلی‌گرم در لیتر کیتوسان با وزن مولکولی بالا برای پرآوری شاخساره در توت‌فرنگی سلوا نسبت به سایر تیمارها مناسب‌تر می‌باشد. زیرا در ترکیب فوق تعداد شاخساره‌های تشکیل شده، وزن خشک توده گیاهی بیشتر بود و از طول مناسب برخوردار بودند. علی‌رغم این که در ترکیب ۱ یا ۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین همراه با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوسان، طول شاخساره و میزان کلروفیل برگ‌ها افزایش یافت اما با توجه به این‌که در مرحله پرآوری افزایش تعداد شاخساره مورد نظر می‌باشد لذا کیتوسان مورد استفاده که دارای وزن مولکولی بالا بود، اثر مثبت در این مورد نداشت. در عین حال می‌توان گفت که تمامی گیاهان عکس‌العمل مشابه در مقابل غلظت و وزن مولکولی متفاوت کیتوسان نشان نمی‌دهند و بایستی انواع کیتوسان با غلظت و وزن مولکولی متفاوت برای رقم توت‌فرنگی سلوا و ارقام دیگر توت فرنگی به‌طور جداگانه بررسی شود تا شناخت جامعی بر اساس مطالعات انجام گرفته در پرآوری ارقام توت‌فرنگی در ایران به‌دست آید. هم‌چنین امکان استفاده از نانو ذرات کیتوسان و مقایسه آن با نوع معمولی در کشت بافت قابل توصیه می‌باشد.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۷-۸ متن انگلیسی مراجعه شود.

Investigation on Interaction Effect of Benzyladenine and Chitosan on *in vitro* Proliferation of Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. Selva)

Jalili Marandi[1]*, R., Naseri[1], L., Mohseniazer[1], M., Hajitagiloo[1], R. and Marhamati[1], M. R.

Abstract

Micropropagation of strawberry provides possibility of fast multiplication. Growth regulators can be effective on micropropagation of strawberry and fast multiplication. To attention to the importance of proliferation stage of micropropagation, in this research an investigation carried out on the interaction effect of benzyladenine (BA) and chitosan. The Murashige and Skoog (MS) culture medium was supplemented with BA in two concentration (1 and 2 mg/l) and Chitosan with high molecular weight in five concentration (0,20,30,40 and 60 mg/l). A factorial experiment based on completely de +sign with eight replication was used. Evaluated characteristics included number of shoots, diameter of shoots, length of shoots, number of leaves, size of leaves, chlorophyll content and dry weight of plant mass. Based on the obtained results there was not significant differences between 1or 2 mg/l concentration of BA from the point of effect on examined characteristics. The highest number of shoots, diameter of shoots, number of leaves and dry weight of plant mass were obtained in 1 or 2 mg/l BA and without chitosan. But the highest length of shoot and chlorophyll content were observed in combination of 1 or 2 mg/l BA with30 mg/l chitosan. The highest leaf size were obtained in combination of 1 or 2 mg/l BA with 0, 20, 30 or 40 mg/l chitosan. According to the results, 1mg/l BA was significant effective on proliferation of Selva strawberry.

Keywords: Proliferation, Strawberry, Benzyladenine, Chitosan, *in vitro*

References

Abramenko, N. M. 1983. A rapid method of strawberry propagation by meristem culture in vitro. Horticulturae, 53:209-212.

Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clement, C. and Vernet, G. 2004. Chitosan improves development and protect- *Vitis vinifera* L. Against *Botrytis cinerea*. Plant Cell Report, 22:608-614.

Arora, D. K., Suri,S. S. and Ramawat, K. G. 2006. Assessment of variability in the regenerants from long- term cultures of sfed musli *(Chlorophytum borivilianum*).Indian Journal of Biotechnology, 5:527- 534.

Asghari- Zakaria, R., Maleki-Zanjani. B. and Sedghi, E. 2009. Effect of in vitro chitosan application on growth and minituber yield of *Solanum tuberosum* L. Plant Soil Environ, 55: 252-254.

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

Biswas, M. K., Hossain, M. and Islam, R. 2007. Virus free plantlets production of strawberry through meristem culture. World Journal of Agricultureal Science, 3:757-763.

Carelli, B. P., and Echeverrigary, S. 2002. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. Scientia Horticulturae, 92:64-74.

Chien, P. J., Sheu, F. , Huang, W. T. and Su , M. S. 2007. Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice . Food Chemistry 102 :1192–1198.

Freepons, D. 1991. Chitosan, does it have a place in agriculture? Proceeding of Plant Growthe Regulation Society of America, p. 11-19.

Jalili Marandi, R. 2007. Small Fruits. Jihad-e-Daneshgahi. Urmia.297 pp. (In Farsi).

Khosh-Khui, M. and Sink, K.C. 1982. Rooting enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. Science Horticulture, 17:371-376.

Khosh-Khui, M. 1994. (Translator). By Kenneth ,C. Torres. Tissue culture techniques .Shiraz University press.467 pp.

Kume, T., Nagasawa, N. and Yoshii, F. 2002. Utilization of carbohydrates by radiation processing. Radiation Physics and Chemistry, 63.:625-627.

Nge, K. L., New, N. Chandrkrachang, S. and Stevens, W.F. 2006. Chitosan as a growth stimultor in orchid tissue culture. Plant Science, 170:1185-1190.

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

Park , S. Y. , Marsh , K. S. and Rhim , J. W. 2002. Characteristics of different molecularweight chitosan films affected by the type of organic solvents. Journal of Food Science, 67(1): 194- 197.

1. Associate professor, Assistant Professor, MS in Horticulture Respectivly, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia

*: Corresponding author

Passey, A. J., Barrett, K. J. and James, D. J. 2002. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria* × *ananassa* Duch). Using range of explant types. Plant Cell Report, 21:397-401.

Qiuping, Z., and Wenshui, X. 2007. Effect of 1-methylcyclopropene and/or chitosan coating treatments on storage life and quality maintenance of Indian jujube fruit. Science Direct, 40:404-411.

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

Wikins, C. P., and Dodds, J. H. 1982. Effect of various growth regulators on growth *in Vitro* of cherry shoot tips. Plant Growth Regulation, 1:209-216.

Yokimova, E., Kapchina-Toteva, V., Groshkoff, I. and Ivanova, G. 2000. Effect of BA CPPU on protease and amylase activity of *Rosa hybrida*. Bulgaria Journal of Plant Physiology, 26:39-47.

Zhang, J., Ningtong, XU., Qihuan, QU. and Xiuhong, XU. 2009. Effect of composite of traditional Chinese medicine and chitosan seed coating agent on growth of soyban. Journal of Northeast Agricultural University, 1:202-207.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 27-34= ۲۷-۳۴).