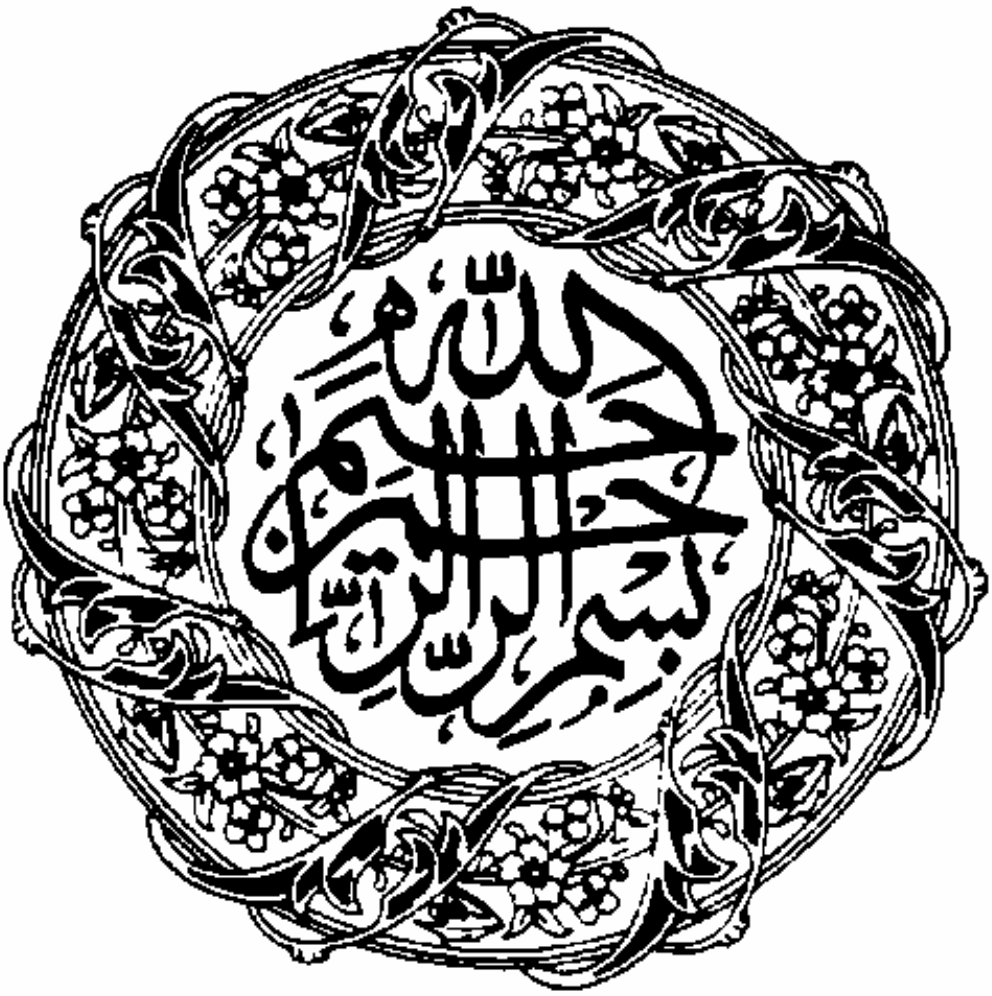

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

باززایی، تراریختی و ارزیابی روابط ژنتیکی با استفاده از نشانگر ISSR در توت‌فرنگی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

گلنوش مدنی

اساتید راهنما
مهندس سیروس قبادی
دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی

۱۳۸۶

دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی خانم گلنوش مدنی
تحت عنوان

باززایی، تراریختی و ارزیابی روابط ژنتیکی با استفاده از نشانگر ISSR در توت‌فرنگی

در تاریخ ۱۳ /۱۲/ ۱۳۸۶ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱ – استاد راهنمای پایان نامه	مهندس سیروس قبادی
۲ – استاد راهنمای پایان نامه	دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی
۳ – استاد مشاور پایان نامه	مهندس احد یامچی
۴ – استاد داور	دکتر مسعود بهار
۵ – استاد داور	دکتر بهرام بانی نسب
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر فرشید نوربخش

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

تقدیم به دو گوهر جاودانه زندگیم،

پدر عزیز

و

مادر مهربانم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هفت
فهرست جداول ..... ده
فهرست اشکال ..... دوازده
چکیده ۱
فصل اول: مقدمه
۱-۱- تاریخچه توت‌فرنگی ۲
۱-۲- پراکنش و سطوح پلوئیدی گونه‌های مختلف توت‌فرنگی ۳
۱-۳- تاریخچه توت‌فرنگی در ایران ۳
۱-۴- گیاه شناسی و ریخت شناسی ۴
۱-۵- فیزیولوژی نموی و تکثیر ۵
۱-۶- اهمیت اقتصادی و میزان تولید جهانی ۶
۱-۷- گونه‌های توت‌فرنگی ۸
۱-۸- ارقام توت‌فرنگی تجاری ۱۰
۱-۹- تنوع ژنتیکی ۱۳
۱-۹-۱- تاریخچه به کارگیری نشانگرهای ژنتیکی ۱۳
۱-۹-۲- نشانگر ژنتیکی ۱۳
۱-۹-۳- کاربردهای نشانگرهای مولکولی ۱۵
۱-۹-۴- نشانگر مولکولی ISSR ۱۵
۱-۹-۵- پژوهش‌های انجام شده در بررسی تنوع ژنتیکی توت‌فرنگی ۱۸
۱-۱۰- کشت بافت ۲۰
۱-۱۰-۱- کشت بافت در توت‌فرنگی ۲۱
۱-۱۰-۲- تاریخچه کشت بافت در توت‌فرنگی ۲۱
۱-۱۰-۳- برخی پژوهش‌های انجام شده در کشت بافت توت‌فرنگی ۲۳
۱-۱۰-۴- ریشه‌دار کردن شاخساره‌های تولیدی ۲۷
۱-۱۰-۵- عوامل موثر بر باززایی ۲۷
۱-۱۱- انتقال ژن در گیاهان ۳۰
۱-۱۱-۱- انتقال مستقیم DNA ۳۱
۱-۱۱-۲- انتقال ژن توسط ناقل ۳۱
۱-۱۱-۳- بیان موقت و پایدار ژن ۳۲
۱-۱۱-۴- برخی پژوهش‌های انجام شده در انتقال موقت ژن ۳۳
۱-۱۱-۵- انتقال پایدار ژن *p5cs* به منظور بالا بردن مقاومت گیاهان به تنش های محیطی ۳۳
۱-۱۱-۶- برخی پژوهش های انجام شده در انتقال پایای ژن در توت فرنگی ۳۵

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی ۳۸
۲-۱-۱- ارقام جمع آوری شده ۳۸
۲-۱-۲- گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه ۳۹
۲-۲- بررسی تنوع ژنتیکی ارقام به کمک نشانگر ISSR ۳۹
۲-۲-۱- استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های گیاهی ۳۹
۲-۲-۲- بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۴۱
۲-۲-۳- بررسی تنوع ژنتیکی بین ارقام به وسیله نشانگر مولکولی ISSR ۴۲
۲-۲-۴- تهیه مخلوط پایه و بهینهسازی شرایط PCR برای آغازگرها ۴۴
۲-۲-۵- الکتروفورز فراورده‌های تکثیر یافته ۴۴
۲-۲-۶- بررسی چندشکلی آغازگرها و تجزیه و تحلیل داده‌ها ۴۷
۲-۳- کشت بافت ۴۷
۲-۳-۱- تهیه محیط کشت ۴۷
۲-۳-۲- کشت بذر توت فرنگی در شرایط *in vitro* ۴۹
۲-۳-۳- کشت هیپوکوتیل ۴۹
۲-۳-۴- کشت ریزنمونه برگی *in vivo* ۵۰
۲-۳-۵- کشت ریزنمونه برگی *in vitro* ۵۱
۲-۳-۶- کشت نوک شاخساره ۵۲
۲-۳-۷- کشت پیش ساخته‌های برگی ۵۳
۲-۳-۸- محیط ریشه زایی ۵۴
۲-۳-۹- واکشت نمونه‌ها ۵۴
۲-۴- انتقال موقت ژن *p5cs* ۵۵
۲-۴-۱- کشت باکتری اگروباکتریوم ۵۵
۲-۴-۲- اگروواینفیلتراسیون ۵۶
۲-۴-۳- تایید انتقال موقت ژن به برگ توت فرنگی به روش مولکولی ۵۸
۲-۴-۴- تایید انتقال موقت ژن به روش هیستوشیمیایی رنگ آمیزی بافت گیاهی به وسیله پیش ماده X-Gluc ۵۹
۲-۴-۵- تایید انتقال موقت ژن به روش بیوشیمیایی سنجش پرولین ۶۰
۲-۵- انتقال دائم ژن *p5cs* ۶۱

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- بررسی تنوع ژنتیکی موجود میان ارقام توت‌فرنگی ۶۲
۳-۱-۱- استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های گیاهی ۶۲
۳-۱-۲- به کارگیری نشانگرهای ISSR ۶۳
۳-۱-۳- بررسی چندشکلی آغازگرها و تجزیه و تحلیل داده‌ها ۶۵
۳-۲- کشت بافت ۷۲

۳-۲-۱- انتخاب ارقام مناسب ۷۲
۳-۲-۲- کشت بذر توت‌فرنگی ۷۳
۳-۲-۳- کشت هیپوکوتیل ۷٤
۳-۲-۴- کشت ریزنمونه برگی *in vivo* و *in vitro* ۷٦
۳-۲-۵- کشت نوک شاخساره در رقم سلوا ۷۸
۳-۲-۶- کشت نوک شاخساره در ارقام کاماروسا و میسیونری ۸۲
۳-۲-۷- کشت پیش‌ساخته‌های برگی ۸۳
۳-۲-۸- محیط ریشه‌زایی ۸۳
۳-۲-۹- واکشت نمونه‌ها ۸٤
۳-۳- انتقال موقت ژن *p5cs* ۸۴
۳-۴- انتقال پایای ژن *p5cs* ۸۵
فصل چهارم: نتیجه گیری و پیشنهادها
۵-۱- نتیجه گیری ۸۸
۵-۲- پیشنهادها ۹۰
منابع ۹۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۱-۱- ارزش تغذیه ای ۱۰۰ گرم توت فرنگی ۵
جدول ۱-۲- برخی ارقام توت‌فرنگی و خصوصیات مهم آنها ۱۰
ادامه جدول ۱-۲- برخی ارقام توت‌فرنگی و خصوصیات مهم آنها ۱۱
ادامه جدول ۱-۲- برخی ارقام توت‌فرنگی و خصوصیات مهم آنها ۱۲
جدول ۱-۳- مروری بر اثر به‌کارگیری زغال‌فعال در کشت بافت گیاهان ۲۹
ادامه جدول ۱-۳- مروری بر اثر به‌کارگیری زغال‌فعال در کشت بافت گیاهان ۳۰
جدول ۲-۱- آغازگرهای به کار گرفته شده در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام توت فرنگی ۴۳
جدول ۲-۲- مواد لازم برای انجام واکنش PCR با آغازگرهای ISSR ۴۵
جدول ۲-۳- برنامه PCR آغازگرهای دسته A ۴۵
جدول ۲-۴- برنامه PCR آغازگرهای دسته B ۴۶
جدول ۲-۵- برنامه PCR آغازگرهای دسته C ۴۶
جدول ۲-۶- برنامه PCR آغازگرهای دسته D ۴۶
جدول ۲-۷- برنامه PCR آغازگر دسته E ۴۷
جدول ۲-۸- ترکیب نمک های پر مصرف و کم مصرف محیط کشت MS ۴۸
جدول ۲-۹- ویتامین های محیط MS و B5 ..... ۴۹
جدول ۲-۱۰- محیط های بررسی شده برای کشت هیپوکوتیل ۵۰
جدول ۲-۱۱- محیط های کشت به کار گرفته شده برای برش های برگی ۵۱
جدول ۲-۱۲- محیط های مورد بررسی برای دستیابی به بهترین نسبت هورمونی در کشت نوک شاخساره (مریستم) ۵۳
جدول ۲-۱۳- محیط های به کار گرفته شده جهت ریشه زایی ۵۴
جدول ۲-۱۴- محیط های بررسی شده برای واکشت نمونه ها ۵۴
جدول ۲-۱۵- محیط کشت LB مایع برای رشد اگروباکتریوم حاوی ژن *p5cs* ۵۵
جدول ۲-۱۶- محیط MS مایع جهت انتقال موقت ژن (محیط هم کشت) ۵۶
جدول ۲-۱۷- مواد لازم برای واکنش برش با آنزیم *Eco*RI ۵۸
جدول ۲-۱۸- مواد لازم برای انجام واکنش PCR به منظور تایید ورود ژن *p5cs* با جفت آغازگرهای pBINN و pBINP ۵۹
جدول ۲-۱۹- برنامه PCR جفت آغازگرهای pBINN و pBINP ۵۹
جدول ۳-۱- تعداد قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای مورد استفاده در تعیین تنوع ژنتیکی ارقام توت فرنگی ۶۷
جدول ۳-۲- مقایسه میانگین طول شاخساره، تعداد شاخساره و ظاهر گیاه باززا شده از کشت مریستم در غلظت های هورمونی مختلف ۸۰
جدول ۳-۳- مقایسه میانگین طول شاخساره، تعداد شاخساره و ظاهر گیاه باززا شده از کشت مریستم در محیط کشت با میزان متفاوت سوکروز ۸۰

جدول ۳-۴- مقایسه میانگین طول شاخساره، تعداد شاخساره و ظاهر گیاه باززا شده از کشت مریستم در محیط کشت دارای آنتی اکسیدان های مختلف.....۸۱
جدول ۳-۵- مقایسه میانگین طول شاخساره، تعداد شاخساره و ظاهر گیاه باززا شده از کشت مریستم در محیط کشت دارای ویتامین های مختلف ۸۱
جدول ۳-۶- جذب نوری در ۵۲۰ نانومتر در نمونه های استاندارد و نمونه های مورد بررسی توت فرنگی.....۸۶

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- بالاترین سطوح زیر کشت توت فرنگی در دنیا بر حسب هکتار ۷
شکل ۱-۲- بالاترین میزان تولید توت فرنگی در دنیا بر حسب تن ۷
شکل ۱-۳- بازده محصول توت فرنگی در ایران بر حسب کیلوگرم در هکتار در ۳۰ سال گذشته ۸
شکل ۱-۴- ساختار ماده فنولی استوسیرینگون (3',5'-Dimethoxy-4'- hydroxyacetophenon) ۳۶
شکل ۳-۱- استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های توت‌فرنگی ۶۳
شکل ۳-۲- بررسی دمای مناسب برای انجام واکنش PCR در آغازگر ISSR-11 با استفاده از Gradient PCR.....۶۴
شکل ۳-۳-مقایسه تعداد و وضوح باندهای تکثیر یافته در PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد (الف)، دو درصد (ب) و ۱/۸ درصد (ج) ۶۴
شکل ۳-۴- الگوی باندی آغازگر ISSR-11 .....۶۸
شکل ۳-۵- الگوی باندی آغازگر ISSR-13 .....۶۸
شکل ۳-۶- الگوی باندی آغازگر ISSR-15 .....۶۸
شکل ۳-۷- الگوی باندی آغازگر ISSR-16 .....۶۹
شکل ۳-۸- الگوی باندی آغازگر ISSR-21 .....۶۹
شکل ۳-۹- گروه‌بندی ۲۲ رقم توت‌فرنگی بر اساس نشانگر ISSR با استفاده از آنالیز UPGMA در نرم افزار NTSYS Ver. 2.02 ..... ۷۰
شکل ۳-۱۰- قرارگیری بذور استریل توت‌فرنگی رقم سلوا روی کاغذ صافی مرطوب به منظور جوانه‌زنی ۷۳
شکل ۳-۱۱- جوانه‌زنی بذر توت‌فرنگی رقم سلوا و خروج برگ‌های لپه‌ای و هیپوکوتیل (الف) و گیاه حاصل از باززایی مستقیم هیپوکوتیل رقم سلوا بر روی محیط کشت H_2 (ب) ۷۵
شکل ۳-۱۲- کالوس‌دهی هیپوکوتیل رقم سلوا روی محیط کشت H_3 (الف) وباززایی ریزنمونه (ب).....۷۶
شکل ۳-۱۳- ترشحات فنولی آزاد شده از برگ های گلخانه ای پس از ۲۴ ساعت (الف) و ممانعت از آزادسازی مواد فنولی در محیط و ادامه رشد ریزنمونه‌ها با به کارگیری آنتی اکسیدان در محیط کشت (ب).....۷۷
شکل ۳-۱۴- آغاز متورم شدن برگ (الف)، عدم رشد ریزنمونه‌های برگی (ب)، تورم و بزرگ شدن برگ (ج) و کالوس دهی ریزنمونه برگی روی محیط‌های کشت مختلف ۷۸
شکل ۳-۱۵- ترشحات فنولی آزادشده در محیط پس از ۲۴ ساعت از کشت نوک شاخساره‌ها (الف) و برطرف شدن این مشکل با استفاده از آنتی‌اکسیدان PVP (ب) و زغال‌فعال (ج) ۷۸
شکل ۳-۱۶- مراحل رشد مریستم رقم سلوا تا رسیدن به گیاه کامل.....۸۲
شکل ۳-۱۷- گیاه کامل با رشد نرمال حاصل از کشت مریستم توت‌فرنگی.....۸۲
شکل ۳-۱۸- ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها بر روی محیط ریشه‌زایی (الف) و بر روی محیط باززایی (ب) ۸۳
شکل ۳-۱۹- تایید ورود ژن *p5cs* به کمک آغازگرهای pBINN و pBINP ۸۵
شکل ۳-۲۰- نمودار معادله خط حاصل از رابطه میان غلظت پرولین و میزان جذب نور ۸۶
شکل ۳-۲۱- سنجش و مقایسه میزان پرولین نمونه‌های شاهد و نمونه‌های تراریخت شده موقت.....۸۷

شکل ۳-۲۲- تغییر رنگ نمونه های تراریخت به دلیل بیان آنزیم گلوکورونیداز نسبت به نمونه های شاهد.....۸۷
شکل ۳-۲۳- گیاهان تراریخت شده در حال رشد بر روی محیط کشت انتخابی دارای کانامایسین ۸۷

چکیده

توت فرنگی (*Fragaria* × *ananassa* L.) یکی از محصولات مهم باغبانی است که به دلیل مقادیر قابل ملاحظه مواد معدنی، انواع ویتامین ها، عطر و طعم دلپذیر میوه و ظاهر زیبا مقبولیت بالایی در بین مصرف کنندگان دارد. ایران از لحاظ سطح زیر کشت این محصول رتبه چهاردهم و از لحاظ تولید سالانه جایگاه هجدهم را در دنیا به خود اختصاص داده است، اما از نظر بازده محصول در واحد سطح سی و هشتمین کشور دنیا محسوب می‌گردد. نظر به اینکه بهبود کمیت و کیفیت باغبانی محصول این گیاه از اهداف کلیدی برنامه اصلاح توت فرنگی می باشد، لذا انتخاب ارقام مناسب کشت، روش‌های تکثیر کارا و همچنین دست‌ورزی ژنتیکی به منظور افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی همواره مورد مطالعه قرار گرفته است. در راستای استمرار و تحقق این اهداف و به منظور انتخاب ارقام مناسب برای ورود به برنامه‌های اصلاح توت فرنگی به کمک ۱۹ آغازگر ISSR با موتیف های دو و سه نوکلئوتیدی، تنوع ژنتیکی ۲۲ رقم توت فرنگی اکتاپلوئید مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده های حاصل از ISSR نشان داد که از مجموع ۳۷۷ باند تولید شده، ۷۸/۸ درصد باندها چند شکل بودند و بر اساس محاسبه تشابه ژنتیکی بین ارقام توسط ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA، سه رقم سلوا، کاماروسا و میسیونری انتخاب شدند؛ بررسی باززایی این گیاهان به منظور کاربرد اقتصادی در تولید انبوه و امکان انتقال موقت و دائم ژن *p5cs* جهت افزایش تحمل به تنش خشکی انجام گرفت. ابتدا بهینه سازی باززایی گیاه از ریزنمونه‌های برگ، مریستم نوک شاخساره به همراه ساختارهای اولیه برگ و هیپوکوتیل گیاهچه در محیط های کشت مختلف صورت گرفت. از بین ریزنمونه‌ها، مریستم توت فرنگی در محیط کشت MS تغییر یافته حاوی دو میلی‌گرم در لیتر BAP و IAA و هیپوکوتیل گیاهچه در محیط کشت MS حاوی تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D، BAP و TDZ به ترتیب به میزان ۰/۰۱ ، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر باززا گردیدند. در هر دو ریزنمونه پرآوری (Proliferation) به صورت مستقیم، بدون تشکیل فاز حد واسط کالوس و با بالاترین میزان باززایی صورت گرفت. در مرحله بعد، بیان موقت ژن *p5cs* به روش Vacuum Agroinfiltration در برگ و بیان پایای ژن با واسطه‌گری اگروباکتریوم سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI121- *p5cs* و ژن های مارکر *gus* و *nptII* در ریزنمونه‌های مریستم و هیپوکوتیل گیاهچه بررسی شد. نتایج نشان داد که بیان ژن *p5cs* خارجی در گیاه توت فرنگی امکان‌پذیر است و میزان پرولین آزاد را به عنوان محصول نهایی ژن می افزاید.

فصل اول

مقدمه

۱-۱- تاریخچه توت‌فرنگی

توت‌فرنگی با نام علمی .*Fragaria* sp متعلق به خانواده گل‌سرخیان[۱] است [۲۱، ۴۱، ۴۴ و ۹۷]. این گیاه نسبتاً جدید می‌باشد و تا ۳۰۰ سال قبل ارقامی که دارای میوه‌های درشت و مشابه با ارقامی که امروزه مورد کشت وکار و مصرف قرار می‌گیرند، وجود نداشته است [۳۳]. آنچه که تا آن زمان شناخته شده و مصرف می‌شد، منحصراً توت‌فرنگی‌های ریز یا توت‌فرنگی موسوم به جنگلی (*Fragaria vesca* L.) بوده که صرف نظر از ریزی میوه، عطر و طعم و مزه خاصی داشته‌اند و بیشتر از نظر خواص دارویی و بهداشتی مورد توجه بوده‌اند [۱، ۶، ۱۰۵ و ۱۲۰]. نوعی از این توت‌فرنگی در جنگل‌های شمال ایران به صورت وحشی یافت می‌شود. در فرانسه در قرن چهاردهم میلادی مستقیماً آن را از طبیعت به زمین زراعی منتقل کردند و آن را به عنوان یک گیاه اهلی مورد کشت و کار قرار دادند. در سال ۱۶۲۹ توت‌فرنگی معروف به ویرجینیایی (*Fragaria virginiana* Duch.) از آمریکای شمالی به اروپا برده شد که به دلیل عدم سازگاری با شرایط محیطی تنها محدود به باغ‌های گیاه‌شناسی بود. در سال ۱۷۱۲ میلادی یک افسر فرانسوی نوعی توت‌فرنگی با میوه درشت که مقاوم به خشکی و حساس به سرما بود، به نام

۱- Rosaceae

توت‌فرنگی شیلی (*Fragaria chiloensis* Duch.) را از شیلی به فرانسه برد. او به طور تصادفی این توت‌فرنگی را در میان گونه‌های ویرجینیایی کشت نمود. بذرهای به دست آمده در اثر گرده افشانی بین این گیاهان، منجر به تولید توت‌فرنگی میوه درشتی به نام توت‌فرنگی آناناس (*Fragaria × ananassa* Duch.) شد که اکثر واریته‌های درشت میوه امروزی از آن حاصل شده‌اند. این توت‌فرنگی از گونه ویرجینیایی به عنوان والد پدری، رنگ قرمز و گوشت سفت و از توت‌فرنگی شیلی به عنوان والد مادری، عطر، طعم، درشتی میوه و مقاومت به سرما را به ارث برده بود. اکنون هزاران رقم مختلف از این نوع پرورش یافته‌اند که از نظر ظاهر و صفات کیفی تنوع بسیار زیادی نشان می‌دهند و به طور کلی خواص ارثی انواع اولیه دو نوع وحشی آمریکایی را در خود دارند [۱، ۶، ۲۱، ۱۱۷ و ۱۳۸].

۱-۲- پراکنش و سطوح پلوئیدی گونه‌های مختلف توت‌فرنگی

جنس *Fragaria* دارای گونه‌های مختلفی است که انواع وحشی آن منشا آسیایی، اروپایی و آمریکایی دارند. اغلب این گونه‌ها در تمام نیمکره شمالی پراکنده بوده و برخی از آنها حتی در نواحی سرد شمال اروپا نیز یافت می‌شوند. در نیمکره جنوبی تاکنون تنها یک نوع توت‌فرنگی (*Fragaria chiloensis*) پیدا شده است [۱، ۶ و ۲۹]. از نظر سیتولوژی در توت‌فرنگی چندین سطح پلوئیدی شناخته شده است، عدد پایه کروموزومی در انواع توت‌فرنگی‌ها n=۷ بوده و انواع دیپلوئید (۲n =۲x =۱۴)، تتراپلوئید (۲n =۴x =۲۸)، هگزاپلوئید (۲n =۶x =۴۲)، اکتاپلوئید (۲n =۸x =۵۶) و دکاپلوئید (۲n =۱۰x =۷۰) وجود دارند [۱۱، ۴۱، ۴۴، ۱۰۵، ۱۰۶ و ۱۱۷]. معمولاً افزایش تعداد گروه‌های کروموزومی با رشد و نمو قوی‌تر گیاه، بزرگ‌تر شدن برگ‌ها، گل‌ها و میوه‌های توت‌فرنگی همراه می‌باشد. این خصوصیات در والدین اولیه توت‌فرنگی‌های میوه درشت امروزی که از انواع اکتاپلوئید بوده‌اند به طور بارزی وجود داشته و با اجرای برنامه‌های به‌نژادی به ارقام جدید انتقال داده شده است [۱ و ۴۴].

۱-۳- تاریخچه توت‌فرنگی در ایران

در جنگل‌های شمال ایران توت‌فرنگی وحشی به طور فراوان یافت می‌شود که میوه‌های آن ریز است و بیشتر مصرف محلی دارد. متاسفانه در ایران مطالعات چندانی روی انواع وحشی موجود، نشده است. به نظر می‌رسد که اولین ارقام اصلاح شده در زمان صدارت اتابک اعظم از فرانسه به ایران وارد شدند و به همین دلیل یکی از ارقام قدیمی ایران به نام اتابکی خوانده می‌شود. در چند دهه اخیر ارقام

متعددی توسط بخش دولتی و خصوصی از نظر سازش‌پذیری با شرایط آب و هوایی مناطق مختلف و همچنین میزان مقاومت به آفات و بیماری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و این بررسی‌ها منجر به انتخاب ارقامی مناسب و پرمحصول در کنار ارقام قدیمی‌تر شده است [۱ و ۶].

۱-۴- گیاه شناسی و ریخت شناسی

همان‌طور که اشاره شد توت‌فرنگی از تیره گل‌سرخیان و جنس *Fragaria* می‌باشد و یک گیاه علفی دائمی است که دارای یک ساقه مرکزی یا طوقه بوده و برگ‌ها، ریشه‌ها و ساقه‌های رونده و گل-آذین‌ها از آن منشا می‌گیرند [۱، ۳، ۶، ۱۰، ۳۳ و ۴۴].

برگ‌ها معمولاً شانه‌ای و سه برگچه‌ای هستند و به صورت مارپیچی روی ساقه قرار می‌گیرند، گرچه گاهی برگ‌های تک برگچه‌ای و پنج برگچه‌ای نیز دیده می‌شوند [۴۴]. روزنه‌های هوایی این گیاه تنها در بخش زیرین برگ‌ها یافت می‌شوند. برگ‌ها در اکثر گونه‌ها پس از قرار گیری در معرض سرما و یخبندان زمستانی از بین می‌روند. برگ‌های تازه که به صورت پیش ساخته (پریموردیا) در بین لایه‌های محافظ گوشوارک زمستان‌گذرانی می‌کنند، در بهار جایگزین برگ‌های پیر می‌شوند. در یک جوانه رویشی به طور معمول پنج تا ده پریموردیای برگی وجود دارد. ساقه رونده در اکثر گونه‌ها از گره دوم یک گیاه دختری ایجاد می‌شود و گره اول یا به حالت خواب باقی می‌ماند یا ساقه رونده دیگری تولید می‌کند. توت‌فرنگی گیاهی خود گرده‌افشان است اما وجود زنبور عسل بر گرده افشانی آن اثرگذار می‌باشد [۱، ۶، ۲۱ و ۱۳۸].

میوه توت‌فرنگی یک میوه مجتمع بوده و از مادگی‌های فراوان تشکیل شده است که هر کدام شامل یک تخمک می‌باشند. بذور حاصله فندقه[۱] نامیده می‌شوند که در واقع میوه حقیقی توت‌فرنگی هستند و روی نهنج گوشتی قرار می‌گیرند. رشد نهنج و تشکیل میوه گوشتی وابسته به باروری موفق تخمک است و اندازه و شکل میوه بستگی به تعداد فندقه‌های تشکیل شده دارد. میوه توت‌فرنگی حدود ۹۰ درصد آب و ۱۰ درصد مواد جامد محلول دارد [۱۰، ۲۱ و ۳۳]. ارزش تغذیه‌ای توت‌فرنگی نسبتاً کامل است (جدول ۱-۱). میزان ویتامین C آن بیشتر از پرتقال است، میزان اسید فولیک آن زیاد بوده، چربی و کلسترول ندارد و میزان فیبر آن قابل ملاحظه می‌باشد [۲۱، ۵۴ و ۱۳۸].

۱- Achen

جدول ۱-۱- ارزش تغذیه‌ای ۱۰۰ گرم توت‌فرنگی

ماده	میزان	ماده	میزان
کربوهیدرات	۷/۰۲ گرم	آهن	۰/۳۸ میلی‌گرم
فیبر	۲/۳ گرم	منگنز	۰/۲۹ میلی‌گرم
پروتئین	۰/۶۱ گرم	ویتامین A (RE†)	۰/۱۴ میلی‌گرم
چربی	۰/۳۷ گرم	روی	۰/۱۳ میلی‌گرم
پتاسیم	۱۶۶ میلی‌گرم	ویتامین B_6	۰/۰۵۹ میلی‌گرم
فسفر	۱۹ میلی‌گرم	مس	۰/۰۴۹ میلی‌گرم
کلسیم	۱۴ میلی‌گرم	اسید فولیک	۱۷/۷ میکروگرم
منیزیوم	۱۰ میلی‌گرم	ویتامین A (IU‡)	۳ میکروگرم
سدیم	۱ میلی‌گرم	سلنیوم	۰/۷ میکروگرم

† Retinol Equivalents , ‡ International Units

۱-۵- فیزیولوژی نموی و تکثیر

توت‌فرنگی‌های تجاری در دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی، از معتدله تا گرمسیری، به طور موفقیت‌آمیزی پرورش داده می‌شوند. نمو توت‌فرنگی به مجموعه پیچیده‌ای از عوامل فیزیولوژیکی و محیطی وابسته است، به گونه‌ای که پیدایش و رشد برگ‌ها، طوقه‌ها، ریشه‌ها، ساقه‌های رونده و گل-آذین‌ها به طور محسوسی توسط ژنوتیپ و عوامل محیطی از جمله دما، شدت نور و کیفیت نور یا فتوپریود تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۱، ۳، ۳۳ و ۱۳۸].

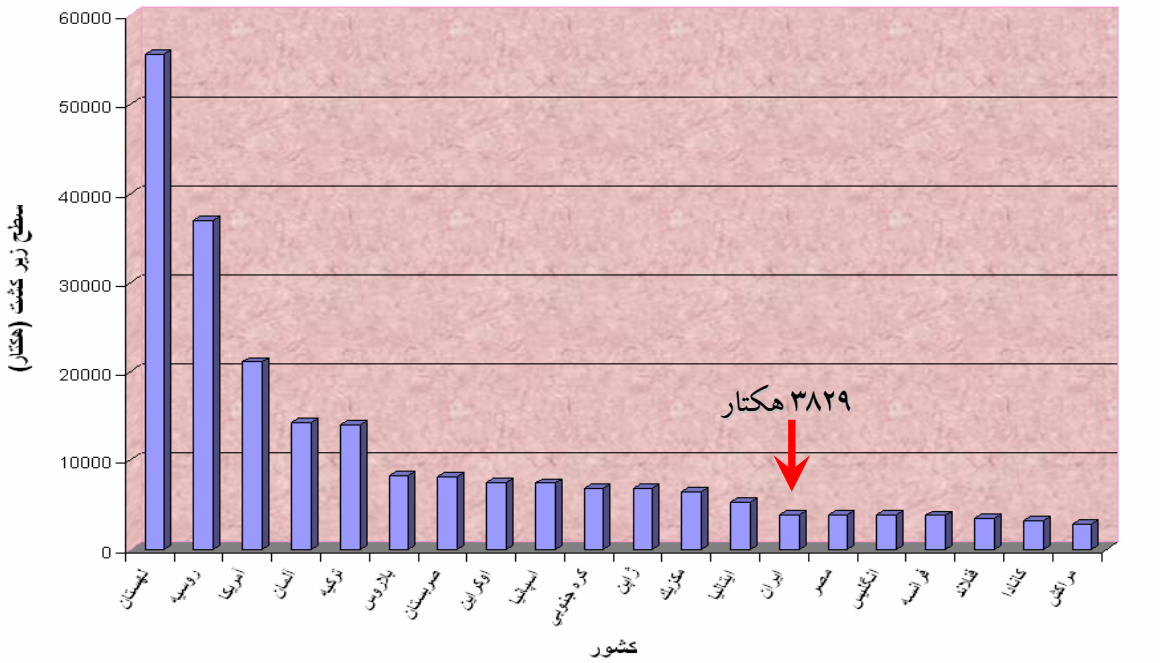
به منظور تکثیر و ازدیاد توت‌فرنگی می‌توان از کشت بذر (روش جنسی) استفاده کرد که تنها در ارقام فاقد ساقه‌رونده و یا در برنامه‌های اصلاحی از آن استفاده می‌شود. روش عمومی تکثیر توت‌فرنگی، روش غیرجنسی است [۲۱، ۴۴ و ۱۴۴]. ازدیاد از طریق تقسیم بوته یکی از ساده‌ترین طرق ازدیاد غیرجنسی توت‌فرنگی است. روش مرسوم تکثیر، ازدیاد به کمک ساقه‌های رونده است [۲۶]. در عمل یک گیاه مادری بین چهار تا بیست بوته با قابلیت رشد مناسب تولید می‌کند [۱].

همان‌گونه که اشاره شد جنس *Fragaria* توسط دانه و ساقه رونده تکثیر می‌گردد، اما هر دو این روش‌ها محدودیت‌هایی دارند؛ تکثیر به وسیله دانه برای تهیه گیاهچه به صورت تجاری مناسب نیست، زیرا مدت زمان بیشتری را نسبت به روش تکثیر با ساقه رونده جهت میوه‌دهی می‌طلبد [۵۴ و ۹۷].

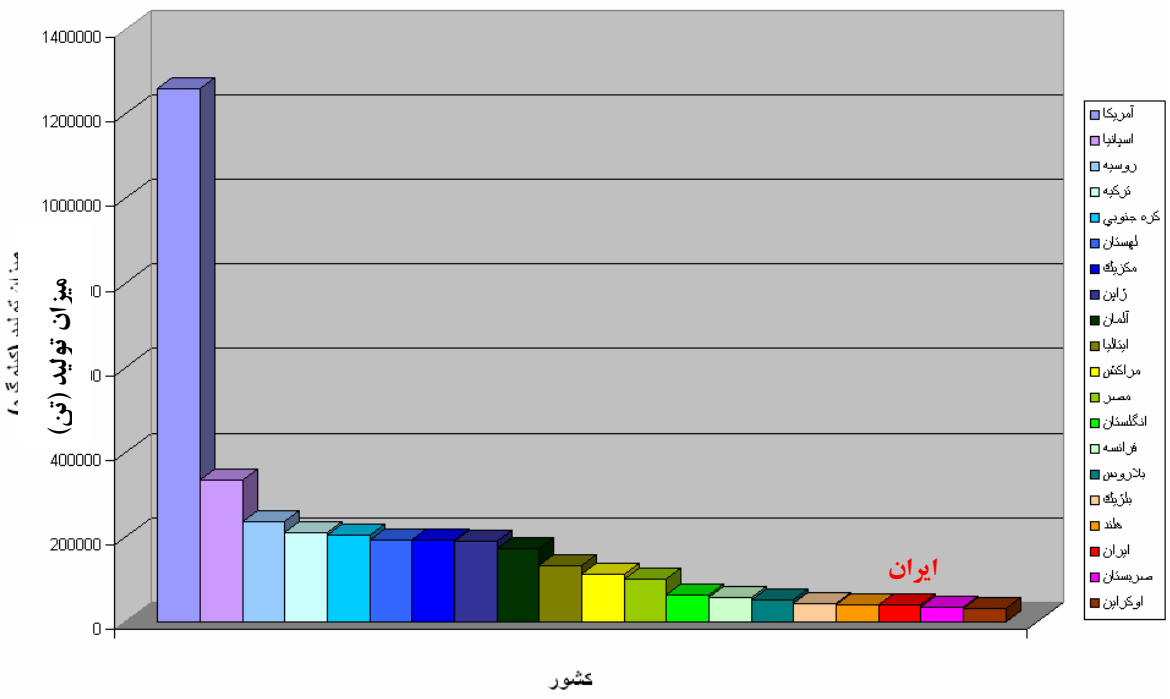
همچنین گفته شده که بذر توت‌فرنگی برای جوانه‌زنی به شش تا هشت هفته سرمادهی و یا تیمارهای خاص نیاز دارد [۹۷]. به عنوان مثال ویلسون و همکاران (۱۹۷۳) اثر CEPA (۲-کلرو اتیل فسفونیک اسید یا اترل) را روی جوانه‌زنی بذر توت‌فرنگی بررسی کرده‌اند و معلق سازی ۲۴ ساعته در غلظت ppm ۵۰۰۰ آن را در سرعت و درصد جوانه‌زنی موثر گزارش کرده‌اند [۱۴۰]. تکثیر با ساقه‌رونده نیز تعداد محدودی گیاهچه فراهم می‌کند. با نگاهی به پتانسیل ارزش اقتصادی در این جنس، ایجاد روش‌های سریع و پر بازده در تکثیر *Fragaria* مورد توجه است. به این منظور مطالعات باززایی از طریق کشت بافت و به کارگیری ریزنمونه‌های مختلف مانند مریستم [۶۳، ۸۵، ۹۷، ۱۱۵، ۱۲۵ و ۱۴۴]، نوک ساقه [۱۴۴]، دمبرگ [۷۲ و ۱۱۵]، ساقه رونده [۸۸] و سایر بافت‌ها در گونه‌های مختلف این جنس انجام شده [۲۱] که در قسمت‌های بعد به طور مفصل به آن پرداخته خواهد شد.

۱-۶- اهمیت اقتصادی و میزان تولید جهانی

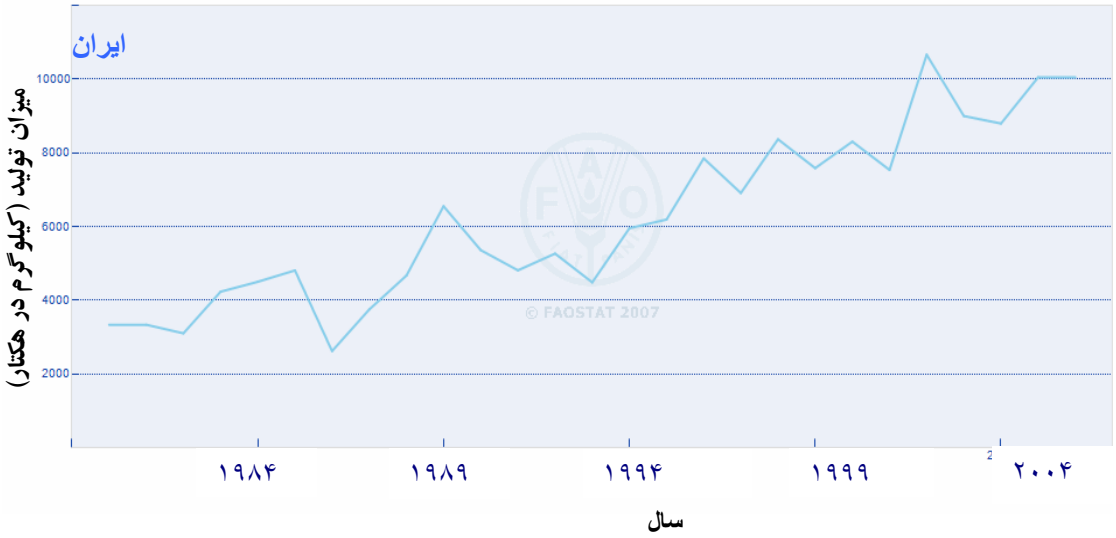
توت‌فرنگی در میان میوه‌های مناطق معتدله یک میوه بی‌نظیر محسوب می‌شود و در فصل بهار از زودرس‌ترین میوه‌ها در بازار است [۱]. طبق آمار منتشر شده در سال ۲۰۰۶ میلادی، کشورهای لهستان، روسیه، ایالات متحده آمریکا، آلمان و ترکیه بالاترین سطح زیر کشت در دنیا را به خود اختصاص داده‌اند و ایران در رتبه چهاردهم سطح زیر کشت (شکل ۱-۱) قرار گرفته است [۱۴۸]. از نظر میزان تولید توت‌فرنگی ایالات متحده، اسپانیا، روسیه، ترکیه و کره در جایگاه برتر در دنیا قرار دارند و ایران با ۳۸۴۹۴ تن تولید سالیانه در جایگاه هجدهم (شکل ۱-۲) ایستاده است [۵۴، ۸۱ و ۱۴۸]. بازده محصول در هر هکتار در ایالات متحده، اسپانیا، مراکش، بلژیک و کاستاریکا از همه بیشتر است و ایران از این نظر در رتبه سی‌وهشتم (شکل ۱-۳) جای دارد [۱۴۸]. تولید جهانی این محصول بیش از چهار میلیون تن در سال است. امروزه نیمی از تولید جهانی این محصول به مناطقی با زمستان‌های ملایم اختصاص دارد [۶ و ۵۴]. ایالات متحده آمریکا بزرگترین تولیدکننده توت‌فرنگی در جهان می‌باشد و بیش از ۳۰ درصد تولید دنیا را به خود اختصاص داده است [۱۳۸ و ۱۴۸]. ایران نیز به دلیل دارا بودن شرایط اقلیمی منحصر به فرد می‌تواند به تولیدکنندگان عمده در جهان بپیوندد و با ایجاد روش‌های مناسب و پربازده رتبه‌های برتری در دنیا را به خود اختصاص دهد [۱].



شکل ۱-۱- بالاترین سطوح زیر کشت توت‌فرنگی در دنیا بر حسب هکتار [۱۴۸]



شکل ۱-۲- بالاترین میزان تولید توت‌فرنگی در دنیا بر حسب تن [۱۴۸]



شکل ۱-۳- بازده محصول توت‌فرنگی در ایران بر حسب کیلوگرم در هکتار در ۳۰ سال گذشته [۱۴۸]

۱-۷- گونه‌های توت‌فرنگی

گونه‌های زیادی از توت‌فرنگی در نواحی معتدله یافت می‌شوند. در دنیا بیش از ۲۰ گونه *Fragaria* شناسایی شده است [۴۴ و ۱۱۷]. در این بخش به معرفی برخی گونه‌های خویشاوند توت‌فرنگی و پراکنش آن‌ها می‌پردازیم:

- *F. vesca* L.

توت‌فرنگی آلپی گونه‌ای دیپلوئید (۲n =۲x =۱۴) است که در سطح محدودی در شمال آمریکا و اروپا کشت می‌شود و دارای برگ‌هایی به رنگ سبز روشن، نازک، دندانه‌دار و دمبرگ‌های استوانه‌ای شکل می‌باشد. این گیاه دارای رشد عمودی و ارتفاع ۱۵ تا ۳۰ سانتیمتر است. گل‌ها دو جنسی‌اند و اکثر گیاهان این گونه روزکوتاه می‌باشند. میوه‌ها بیضی شکل به رنگ قرمز درخشان و بسیار معطر و دارای گوشت بسیار نرم هستند. این گونه فاقد ساقه‌رونده است. این گیاه به دلیل اندازه کوچک ژنوم، دوره تولیدمثل کوتاه و تکثیر سریع مدل مناسبی برای بررسی‌های ژنومی و تجربیات ژنتیکی در خانواده گل-سرخیان محسوب می‌شود [۱، ۱۰۵ و ۱۱۷].

- *F. viridis* Duch.

این گیاه دیپلوئید (۲n =۲x =۱۴) دارای عادت رشدی راست و برگ‌هایی به رنگ سبز تیره با دندانه‌های کوچک‌تر نسبت به توت‌فرنگی آلپی است و در علف‌زارها، استپ‌ها، حواشی جنگل‌ها و بیشه‌زارها یافت می‌شود. این گیاهان تنها تعداد اندکی ساقه‌رونده بدون گره تولید می‌کنند. میوه این گونه کوچک‌تر از انواع امروزی می‌باشد اما بزرگ‌تر از *F. vesca* است [۱ و ۶].