

ریزازدیادی خرما از طریق جنین‌زایی رویشی

علی اکبر حبشی^۱، امیر موسوی^۲، مینا کاویانی^{۱*}، صغری خوشکام^۱ و علیمردان رستمی^۱

(تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۱۸)

چکیده

خرما (*Phoenix dactylifera L.*) به صورت سنتی از طریق پاجوش تکثیر می‌شود. در این روش مشکلاتی مانند محدود بودن تعداد پاجوش‌ها، پرهزینه بودن و کند بودن دوران رشد آنها وجود دارد، بنابراین تکثیر از طریق روش‌های کشت بافت حائز اهمیت است. در این تحقیق برای بهینه‌سازی و تعیین بهترین ترکیب هورمونی و محیط کشت برای ریزازدیادی در خرما از بافت مرستمی پاجوش‌های ۲ تا ۳ ساله ارقام کبکاب، استعمران، پیارم و برهی به عنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌ها بعد از ضد عفونی در محیط کشت MS حاوی مقادیر مختلف از 2ip و NAA، 2,4-D به عنوان محیط کالوس‌زایی در تاریکی در دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نتایج نشان داد که بیشترین و بهترین تحریک کالوس‌زایی برای ارقام مختلف در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۲۰ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2ip بوده است. رقم کبکاب نسبت به ارقام دیگر از واکنش بهتری (۸۷/۲۵ درصد) نسبت به محیط کشت کالوس‌زایی برخوردار بود. بعد از ازدیاد کالوس، به منظور القای جنین‌زایی، کالوس‌ها وارد محیط کشت جنین‌زایی حاوی مقادیر مختلف BAP، کینتین و NAA شدند. بهترین محیط کشت برای جنین‌زایی سوماتیکی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بود. ارقام کبکاب و استعمران نسبت به دو رقم دیگر از جنین‌زایی بالاتری برخوردار بودند. جنین‌های رویشی به منظور ریشه‌دار شدن در محیط MS بدون هورمون قرار داده شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده برای سازگار کردن در شرایط کنترل شده به گلدان و در نهایت به گلخانه منتقل شدند.

واژه‌های کلیدی: کالوس، جنین‌زایی رویشی، خرما، کشت مرستم

مقدمه

دارد (۱۳). تعداد پاجوش‌های به دست آمده از هر نخل مادری محدود بوده و تنها در طی دوران خاصی از زندگی گیاه به وجود می‌آیند. تکثیر خرما از این روش بسیار کند و پر زحمت بوده و گران تمام می‌شود (۱۵). از ریزازدیادی درون شیشه‌ای می‌توان به عنوان یک روش جایگزین برای تولید و ازدیاد خرما در سطح زیاد استفاده کرد. باززایی خرما در محیط کشت از طریق اندام‌زایی یا جنین‌زایی سوماتیکی بستگی زیادی به

خرما، *Phoenix dactylifera L.* سال‌هاست که به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان مناطق خشک و بیابانی آفریقای شمالی، خاور میانه و آسیای جنوبی به شمار می‌رود (۸). این گیاه به صورت سنتی از طریق پاجوش که معمولاً در زیر یا نزدیک سطح زمین در کنار تنه خرما رویده می‌شوند، تکثیر می‌شود. با این حال مشکلات بسیاری در رابطه با این نظام تکثیر وجود

۱. به ترتیب عضو هیئت علمی، کارشناسان و تکنیسین پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

۲. عضو هیئت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، تهران

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: habashia@yahoo.com

۵۰ درصد با چند قطره توین (Tween) ۲۰ ضد عفونی شده و سپس ۴ بار با آب مقطر استریل آبشویی شدند.

القا و تکثیر کالوس

مریستم بعد از ضد عفونی به قطعات ۱×۱ سانتی متری تقسیم شدند و سپس به تعداد ۵ ریز نمونه در هر پتری دیش داخل محیط کشت MS (۱۱) حاوی ۳ گرم در لیتر زغال فعال، ۱۸۰ میلی گرم در لیتر NaH₂PO₄، ۲۰۰ میلی گرم در لیتر گلوتامین (Glutamine)، ۱ میلی گرم در لیتر بیوتین (Biotin) و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز نگهداری شدند. محیط با ۸ گرم در لیتر آگار جامد و pH محیط روی ۵/۸ تنظیم شد. کشت‌ها در تاریکی در دمای ۲۷±۱ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سه هورمون گیاهی در غلظت‌های مختلف برای تشکیل کالوس به محیط کشت اضافه شدند که شامل 2,4-D (۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر)، NAA (۱۵ و ۲۰ میلی گرم در لیتر) و 2ip (۱، ۳ و ۵ میلی گرم در لیتر) بود. ریزنمونه‌ها هر ۵ هفته یکبار واکست شدند. بعد از چهار ماه از کشت کالوس‌هایی که از نظر کیفی ترد و دارای رنگ سفید متمایل به شیری بودند، به محیط حاوی ۴۰ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۳ میلی گرم در لیتر 2ip برای تکثیر کالوس منتقل شدند (شکل ۱، ب). ظاهر کالوس‌ها (امتیاز ۱ برای ترد نبودن و ۲ برای ترد بودن)، درصد تشکیل کالوس (نسبت تعداد ریزنمونه‌هایی که در محیط کشت مورد نظر تشکیل کالوس داده بودند به مجموع ریزنمونه‌های کشت شده) و رنگ کالوس (امتیاز ۱ برای نکروزه و قهوه‌ای بودن و ۲ برای شیری و سفید رنگ بودن) به صورت چشمی رتبه بندی شد و داده‌های آنها با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

القای جنین‌های سوماتیکی و تکثیر جنین‌ها

کالوس‌های به دست آمده از محیط کشت تکثیر برای تحریک جنین‌زایی به محیط کشت MS دارای غلظت‌های مختلف از هورمون‌های کینیتین و BAP هر کدام با غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ میلی گرم در لیتر و NAA غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر منتقل و در روشنایی با شدت ۱۰۰۰ لوکس با فتوپریود ۱۶

ژنوتیپ و ترکیب هورمونی دارد.

از ریز نمونه‌های متعددی برای کشت بافت در خرما استفاده می‌شود، که از بین آنها می‌توان به جنین‌های بذری، مریستم و جوانه انتهایی گیاه اشاره کرد که به نظر می‌رسد بافت‌های مریستمی بهترین ریز نمونه برای استفاده در ریزازدیادی خرما باشند (۱ و ۱۰ و ۱۶). تولید جنین‌زایی سوماتیکی از طریق کالوس‌های حاصل از مریستم یکی از روش‌های کشت از طریق اندام‌زایی یا جنین‌زایی سوماتیکی بستگی زیادی به ژنوتیپ و ترکیب هورمونی دارد.

از ریز نمونه‌های متعددی برای کشت بافت در خرما استفاده می‌شود، که از بین آنها می‌توان به جنین‌های بذری، مریستم و جوانه انتهایی گیاه اشاره کرد که به نظر می‌رسد بافت‌های مریستمی بهترین ریز نمونه برای استفاده در ریزازدیادی خرما باشند (۱ و ۱۰). تولید جنین‌زایی سوماتیکی از طریق کالوس‌های حاصل از مریستم یکی از روش‌های موفق آمیز در ریزازدیادی خرما به شمار می‌رود (۱، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۲، ۱۴ و ۱۹). جنین‌زایی سوماتیکی در خرما به طور معمول شامل یکسری مراحل متوالی شامل تحریک تشکیل کالوس، به دست آوردن کالوس جنین‌زا و تکثیر آن، تشکیل جنین رویشی، شاخه‌زایی و در نهایت ریشه‌دار شدن آنهاست (۱). گزارش‌های محدودی در رابطه با ریزازدیادی خرما از روش جنین‌زایی سوماتیکی (۵، ۱۵ و ۱۹) و اندام‌زایی (۲ و ۳) وجود دارد. آزمایش‌های انجام گرفته در این مطالعه با هدف به وجود آوردن یک روش کارا و مطمئن برای تکثیر وسیع ارقام ایرانی خرما طراحی شده‌اند. به همین منظور از چهار رقم کبکاب، استعمران، برحی و پیام استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پاجوش‌های ۲ تا ۳ ساله درختان ماده خرما از ارقام مورد تحقیق به عنوان منبع ریزنمونه در آزمایش‌ها استفاده شد. این پاجوش‌ها از میناب، اهواز و بندرعباس تهیه گردید. بعد از جدا کردن برگ‌ها و بافت‌های اضافی اطراف پاجوش‌ها، مریستم‌ها جدا شدند. این ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم



شکل ۱. تشکیل کالوس در بافت‌های مرستمی خرما در محیط کشت کالوس‌زایی رقم استعمران (الف) کالوس جنین‌زای در حال تکثیر ۴ ماه بعد از کشت (ب)

نتایج و بحث

بافت‌های مرستمی خرما بعد از قرار گرفتن در محیط کشت کالوس‌زایی، در دومین یا سومین واگشت از کناره‌های ریزنمونه شروع به تولید کالوس کردند (شکل ۱، الف). درصد تشکیل کالوس، رنگ و شکننده بودن آنها بررسی شد. کالوس‌های جنین‌زا دارای ظاهری ترد و شکننده با رنگ سفید شیری بودند (شکل ۱، ب). درصد تشکیل کالوس و کیفیت آن در ارقام مختلف تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱). رقم کبکاب دارای بالاترین میزان کالوس‌دهی با میانگین ۸۷/۲۵ درصد و بعد از آن ارقام استعمران، پیارم و برخی به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. این امر نشان دهنده تأثیر ژنوتیپ در کمیت و کیفیت تشکیل کالوس است.

در بررسی اثر 2,4-D بر روی کالوس‌زایی و کیفیت آن معلوم شد که تمامی ارقام در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بالاترین میزان (۹۰/۱۶ درصد) و بهترین کیفیت کالوس را از نظر شکننده بودن و رنگ کالوس از خود نشان دادند (نمودار ۱، الف). در بررسی اثر NAA روی تشکیل کالوس و کیفیت آن در خرما مشخص شد که تمامی ارقام در محیط کشت حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین پاسخ را در تشکیل کالوس از خود نشان دادند (نمودار ۱، ب).

هم‌چنین همان‌طور که در نمودار ۱ ج نمایان است، همه ارقام

ساعت روز و ۸ ساعت تاریکی در دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کشت‌ها هر ۵ هفته یک بار واگشت شدند. واکنش کالوس‌ها به محیط کشت جنین‌زایی ۱۲ هفته بعد از قرار گرفتن در این محیط کشت به صورت تعداد جنین به ازای هر ۵ گرم وزن کالوس بررسی شد.

آزمایش در قالب طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده بعد از تبدیل شدن از محیط کشت‌های مختلف کالوس‌زایی و جنین‌زایی توسط نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند.

بعد از بزرگ شدن جنین‌ها و بلوغ، آنها به محیط MS دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA منتقل شدند، تا در این محیط ریشه‌دار شوند. برای سازگار کردن گیاهچه‌های ریشه‌دار شده، گیاهچه‌ها بعد از ریشه‌دار شدن از لوله آزمایش بیرون آورده شدند و بعد از زدودن آگار اطراف ریشه‌ها با آب مقطر استریل در داخل گلدانی که دارای نسبت مساوی از پیت‌ماس و ورمی‌کولیت بود، قرار داده شدند. به آنها آب کافی داده شد و روی آنها با یک روکش پلاستیکی پوشانده شد. بعد از ۱ هفته پوشش پلاستیکی برداشته شده و گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند.



شکل ۲. جنین‌های حاصل از بافت مریستمی در خرما رقم کبکاب (الف)
جنین‌های حاصل از بافت مریستمی در خرما (با بزرگنمایی ۵x) ۱۰ ماه بعد از کشت (ب)

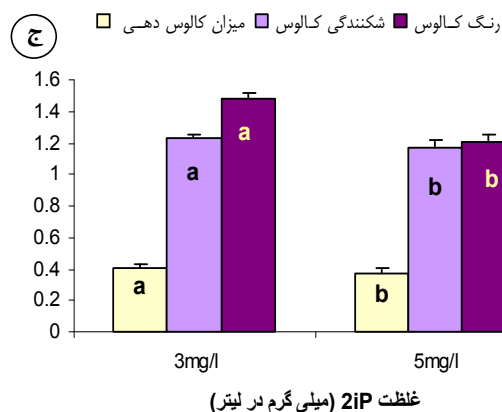
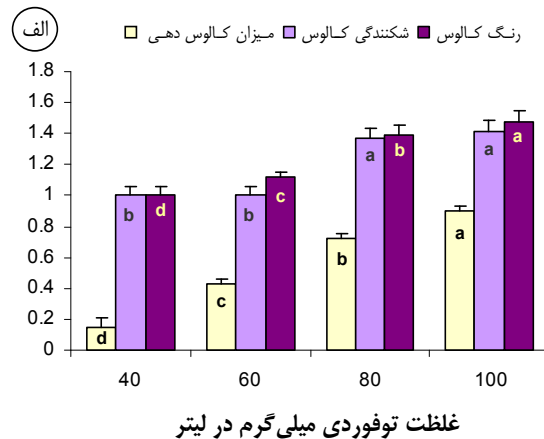
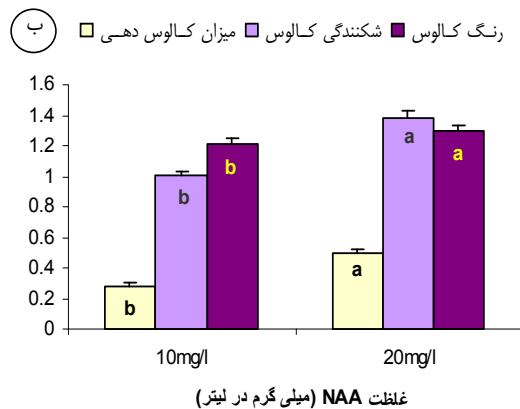
جدول ۱. مقایسه میانگین درصد کالوس‌دهی، شکنندگی و رنگ کالوس در ۴ رقم مختلف خرما

رقم	درصد تشکیل کالوس	شکنندگی کالوس	رنگ
کبکاب	۸۷/۲۵ ^a	۱/۲۷ ^a	۱/۳۵ ^a
استعمران	۷۰/۳۲ ^b	۱/۲۵ ^a	۱/۳۱ ^a
پیارم	۶۰/۲۵ ^c	۱/۱۵ ^b	۱/۱۹ ^b
برحی	۴۰/۳۵ ^d	۱/۱۳ ^b	۱/۱۵ ^c

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت‌های آماری معنی‌دار با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۳. گیاهچه‌های ریشه دار شده خرما در محیط MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (الف).
گیاهچه خرما کشت بافتی کاشته شده در گلدان آماده انتقال به گلخانه (ب)



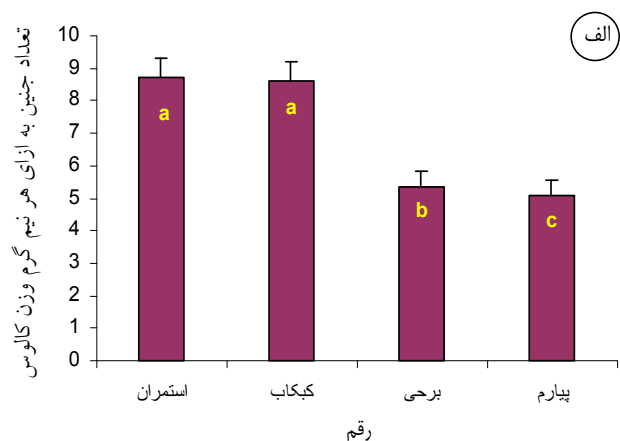
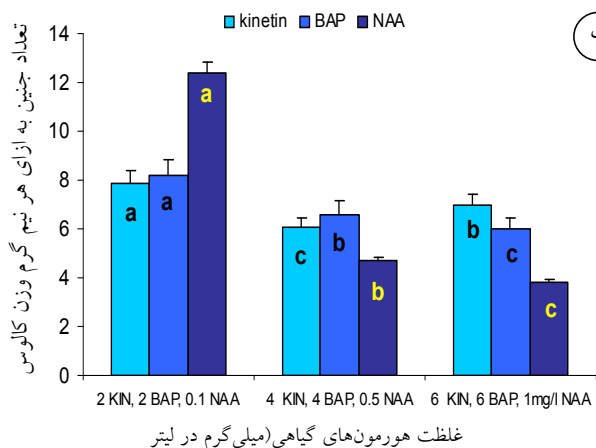
نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف الف (2,4-D، ب) NAA، ج) 2iP روی میزان کالوس‌دهی*، شکندگی و رنگ کالوس در خرما. (*میزان کالوس‌دهی $\times 100 =$ درصد کالوس‌دهی)

شدند (شکل ۱، ب). کالوس‌ها بعد از ازدیاد وارد محیط‌های مختلف جنین‌زایی شده و بعد از یک واگشت جنین‌ها در این محیط‌ها ظاهر شدند (شکل ۲).

تعداد جنین‌ها به ازای هر ۰/۵ گرم وزن کالوس در هر تیمار شمارش شدند. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که ارقام استعمران و کبکاب دارای بالاترین میزان جنین‌زایی (۸/۳۷ و ۸/۶ جنین به ازای هر ۰/۵ گرم وزن کالوس) بودند و از این لحاظ تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند و ارقام برحی و پیارم در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (نمودار ۲، الف). همان‌طور که در نمودار ۲ ب مشاهده می‌شود، بهترین جنین‌زایی در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کابینتین، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد.

در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2iP واکنش بهتری از نظر کالوس‌زایی، شکندگی و رنگ کالوس نسبت به محیط حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2iP از خود نشان دادند. این نتایج نمایانگر این موضوع هستند که برای القای کالوس در مریستم‌های خرما به مقادیر زیادی از اکسین‌ها مانند 2,4-D و NAA نیاز است. از مقادیر بالای اکسین به تنهایی یا همراه با سیتوکینین در القای کالوس‌زایی در خرما استفاده شده است (۲، ۳، ۴، ۵، ۱۶، ۱۴ و ۲۱). تیسرات از کشت مریستم‌های خرما در محیط کشت حاوی مقادیر بالای 2,4-D و NAA مقادیر قابل توجهی کالوس جنین‌زا به دست آورد (۱۹).

بعد از گذشت حدود ۴ ماه از کشت، تمام کالوس‌های به دست آمده برای تکثیر وارد محیطی با غلظت کمتر 2,4-D



نمودار ۲. الف) مقایسه میانگین میزان جنین‌زایی در ۴ رقم مختلف خرما،

ب) اثر غلظت‌های مختلف کابنتین، BAP و NAA روی جنین‌زایی در خرما

به دست آمده از محیط جنین‌زایی در محیط ریشه‌زایی، تولید ریشه کردند و بعد از سازگاری به خاک منتقل شدند (شکل ۳).

سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز بین‌المللی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (ICGEB) برای در اختیار گذاردن منابع مادی این پروژه (طرح تحقیقاتی (b)-3-IRAO/CRP) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

از اکسین‌ها به تنهایی یا همراه با سیتوکینین‌ها در القای جنین‌زایی در خرما استفاده شده است (۲، ۳، ۴، ۵، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۲۰ و ۲۱). به نظر می‌رسد سطوح کمتر 2,4-D استفاده شده در محیط تکثیر به القای جنین‌زایی در کالوس‌ها کمک کرده و در مراحل بعدی با بردن آنها به محیط جنین‌زایی، جنین‌های رویشی به وجود آمدند (۱۹). قرار دادن جنین‌ها در این محیط باعث تبدیل جنین‌ها به گیاهچه می‌شوند و این روند با قرار دادن آنها در محیط ریشه‌زایی تکمیل می‌شود. همه گیاهچه‌های

منابع مورد استفاده

- Al-Khayri, J.M. 2003. *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: Effect of auxin concentration and strength of MS salts. *Current Sci.* 85 (5): 680-683.
- Beauchesne, G. 1983. Vegetative propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by *in vitro* culture. Proc. First Symp. Date Palm, King Faisal University, Saudi Arabia.
- Beauchesne, G., A. Zaid and A. Rhiss. 1986. Meristematic potentialities of bottom of young leaves to rapidly propagate date palm. Second Symp. Date Palm, 3-6 March, King Saudi Arabia.
- Bhargava, S.C., S.N. Saxena and R. Sharma. 2003. *In vitro* multiplication of *Phoenix dactylifera* L. *J. Plant Bioch. Biotech.* 12:43-47.
- Daguin, F. and R. Letouze. 1988. Régénération du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par embryogenèse somatique: amélioration de l'efficacité par passage au milieu liquide agit6. *Fruits* 43:191-194.
- Dass, H.C., R.K. Kaul, S.P. Joshi and R.R. Bhansali. 1989. *In vitro* regeneration of date palm plantlets. *Current Sci.* 58(1): 22-24.
- El, M.I. and M. Baaziz. 1995. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L. *Biologica Plantarum* 37(2): 197-203.
- Hodel, D.R. and D.R. Pittenger. 2003. Studies on the establishment of date palm (*Phoenix dactylifera* 'Deglet Noor') offshoots. Part I. Observations on root development and leaf growth. *Palms* 47(4): 191-200.
- Iraqi, D. and F.M. Tremblay. 2001. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and

- white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiol. Plant* 111: 381-388.
10. Kacker, N.C., K.R. Solanki and S.P. Joshi. 1989. Micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khadrawy using tissue culture technique. *Ann. Arid Zone* 28: 137-141.
 11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-495.
 12. Omar, M.S., M.K. Hameed and M.S. Al-Rawi. 1992. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Protoplast and Genetic Engineering*. Springer-Verlag, Pub., Berlin.
 13. Popenoe, P. 1979. The date palm. Field Research Projects, Coconut Grove, Miami.
 14. Sharma, D.R., S. Dawra and J.B. Chowdhury. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Indian J. Exp. Biol.* 22:596-598.
 15. Sharma, D.R., S. Deepak and J.B. Chowdhury. 1986. Regeneration of plantlets from somatic tissues of the date palm *Phoenix dactylifera* L. *Indian J. Exp. Biol.* 24:763-766.
 16. Sudherson, C. and M. Abo El- Nil. 2004. Axillary shoots production in micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Curr. Sci.* 86(6): 771-773.
 17. Tisserat, B. 1982. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. *Euphytica* 31: 201-214.
 18. Tisserat, B. 1991. Clonal Propagation of Palms. PP: 1-14. *In: Lindsey, K. (Ed.), Plant Tissue Culture Manual C2*. Kluwer Academic Pub., Dordrecht.
 19. Tisserat, B. H. 1979. Propagation of date palm. *In vitro. Bot.* 30: 1275-83.
 20. Veramendi, J. and L. Navarro. 1996. Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 45: 159-164.
 21. Zouine, J. and I. Hadrami. 2004. Somatic embryogenesis in *phoenix dactylifera* L. Effect of exogenous supply of sucrose on proteins, sugars, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture. *Biotechnol.* 3(2):114-118.