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 ریز ازدیادی در خرما از بافت مریستمی پاجوش‌های ۲ تا ۳ ساله ارقام کبکاب، استعمران، پیارم و برهی به عنوان ریزنمونه استفاده شد. ریزنمونه‌ها بعد از ضد عفونی درمحیط کشت MS حاوی مقادیر مختلف از 2,4-D، NAA و 2ip به عنوان محیط کالوس‌زایی در تاریکی در دمای ۱±۲۷ 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، کینیتین و NAA شدند. بهترین محیط کشت برای جنین‌زایی سوماتیکی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۲ میلی‌گرم در لیتر کینیتین 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 مریستم

مقدمه

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 روییده می‌شوند، تکثیر می‌شود. با این حال مشکلات بسیاری در رابطه با این نظام تکثیر وجود 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

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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.33.7]

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 و۱۰). 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 جنین زا و تکثیر آن، تشکیل جنین رویشی، شاخه زایی و در نهایت ریشه‌دار شدن آنهاست (۱). گزارش‌های محدودی در رابطه با ریزازدیادی خرما از روش جنین‌زایی سوماتیکی (۵، ۱۵ و ۱۹) و اندام زایی (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 شده اند. به همین منظور از چهار رقم کبکاب، استعمران، برحی و پیارم استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پاچوش‌های ۲ تا ۳ ساله درختان ماده خرما از ارقام مورد تحقیق به عنوان منبع ریزنمونه در آزمایش‌ها استفاده شد. این پاچوش‌ها از میناب، اهواز و بندرعباس تهیه گردید. بعد از جداکردن برگ‌ها و بافت‌های اضافی اطراف پاچوش‌ها، مریستم‌ها جدا شدند. این ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد با چند قطره توین(Tween) ۲۰ ضدعفونی شده و سپس ۴ بار با آب مقطر استریل آبشویی شدند.

القا و تکثیر کالوس

مریستم بعد از ضدعفونی به قطعات ۱×۱ سانتی متری تقسیم شدند و سپس به تغداد ۵ ریز نمونه در هر پتری دیش داخل محیط کشت MS (۱۱) حاوی ۳ گرم در لیتر زغال فعال، ۱۸۰ میلی‌گرم در لیتر NaH2PO4، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین(Glutamine) ، ۱ میلی‌گرم 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 ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌گرم در لیتر), NAA (۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و 2ip (۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) بود. ریزنمونه‌ها هر ۵ هفته یکبار واکشت 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 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2ip برای تکثیر کالوس منتقل شدند (شکل ۱، ب). ظاهرکالوس‌ها (امتیاز ۱ برای ترد نبودن و ۲ برای ترد بودن)، درصد تشکیل کالوس (نسبت تعداد ریزنمونه هایی 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 کینتین و BAPهر کدام با غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر و NAA غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر منتقل و در روشنایی با شدت ۱۰۰۰ لوکس با فتوپریود ۱۶

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.33.7]

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

ساعت روز و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کشت‌ها هر ۵ هفته یک بار واکشت شدند. واکنش کالوس‌ها به محیط کشت جنین‌زایی ۱۲ هفته بعد از قرار گرفتن در این محیط کشت به صورت تعداد جنین به ازای هر ۰/۵ 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 ریشه دار 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 ورمی کولیت 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.

نتایج و بحث

بافت‌های مریستمی خرما بعد از قرار گرفتن در محیط کشت کالوس‌زایی، در دومین یا سومین واکشت 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 کمّیت و کیفیت تشکیل کالوس است.

در بررسی اثر 2,4-D برروی کالوس‌زایی و کیفیت آن معلوم شد که تمامی ارقام درمحیط 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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.33.7]

شکل۲. 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)

جدول۱. مقایسه میانگین درصد کالوس‌دهی، شکنندگی و رنگ کالوس در ۴ رقم مختلف خرما

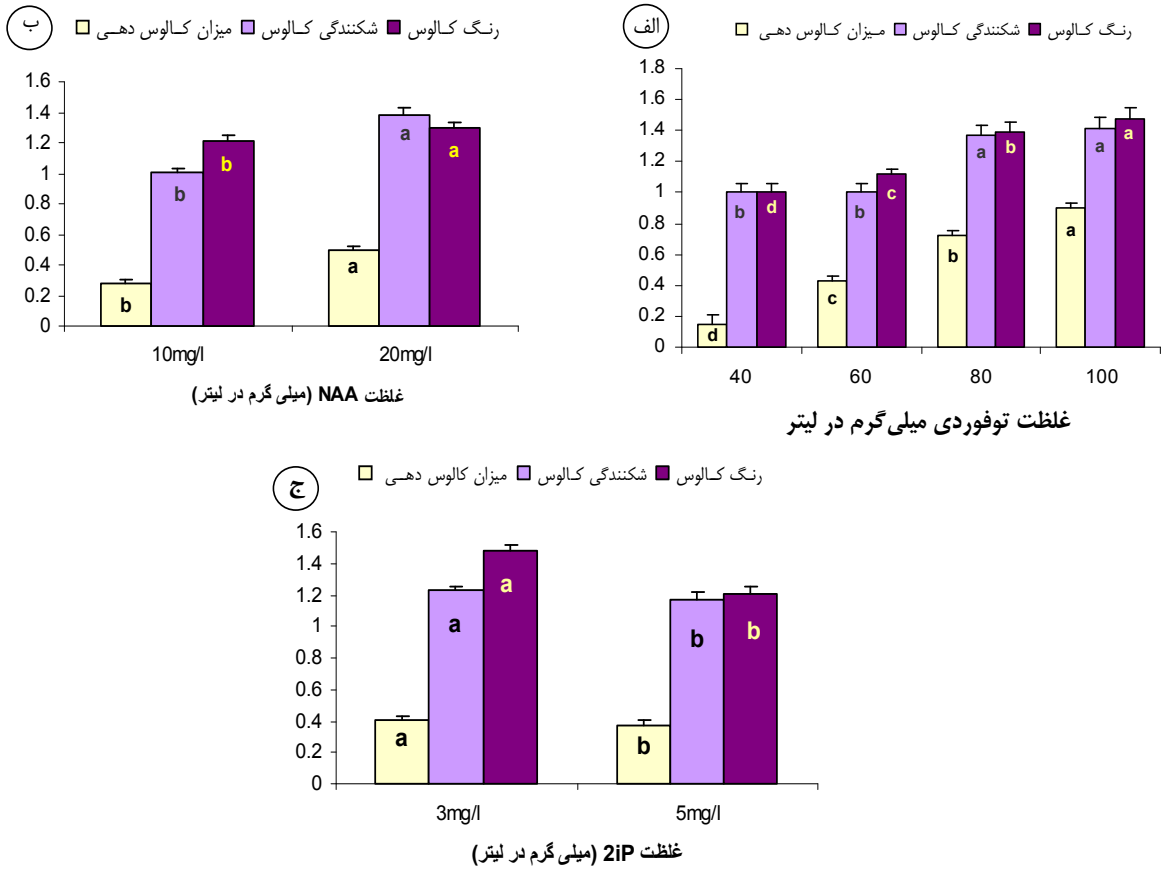
رقم	درصد تشکیل کالوس	شکنندگی کالوس	رنگ
کبکاب	۸۷/۲۵ a	۱/۲۷ a	۱/۳۵ a
استعمران	۷۰/۳۲ b	۱/۲۵ a	۱/۳۱ a
پیارم	۶۰/۲۵ c	۱/۱۵ b	۱/۱۹ b
برحی	۴۰/۳۵ d	۱/۱۳ b	۱/۱۵ c

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 خرمای کشت بافتی کاشته شده در گلدان آماده انتقال به گلخانه (ب)

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.33.7]



نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف الف) 2,4-D، ب) NAA، ج) 2ip روی میزان کالوس‌دهی*، شکنندگی و رنگ کالوس در خرما. (*میزان کالوس‌دهی×۱۰۰= درصد کالوس‌دهی)

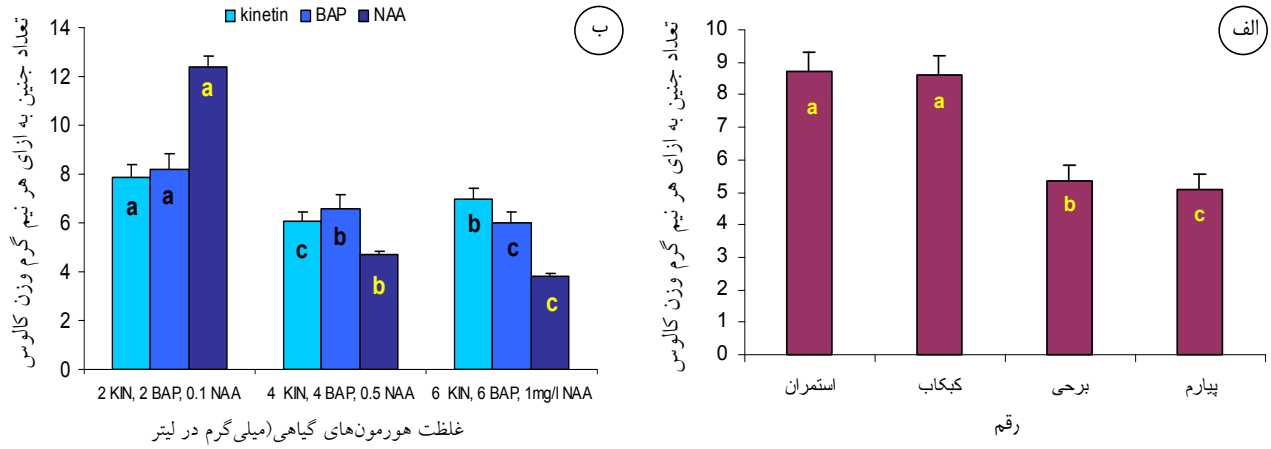
در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر 2ip واکنش بهتری از نظر کالوس‌زایی، شکنندگی و رنگ کالوس نسبت به محیط حاوی ۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip از خود نشان دادند. این نتایج نمایانگر این موضوع هستند که برای القای کالوس در مریستم‌های خرما به مقادیر زیادی از اکسین‌ها مانند 2,4-D و NAA نیاز است. از مقادیر بالای اکسین به تنهایی یا همراه با سیتوکینین در القای کالوس زایی در خرما استفاده شده است (۲، ۳، ۴، ۵، ۱۴،۱۶ 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 شدند (شکل ۱، ب). کالوس‌ها بعد از ازدیاد وارد محیط‌های مختلف جنین‌زایی شده و بعد از یک واکشت 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 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 معنی داری با هم نداشتند و ارقام برحی و پیارم در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (نمودار۲، الف). همان طور که در نمودار۲ ب مشاهده می‌شود، بهترین جنین‌زایی در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر کاینیتین، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۱میلی‌گرم در لیتر NAA به دست آمد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.33.7]



نمودار ۲. الف) مقایسه میانگین میزان جنین‌زایی در ۴ رقم مختلف خرما،
ب) اثر غلظت‌های مختلف کاینیتین،BAP و NAA روی جنین‌زایی در خرما

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

منابع مورد استفاده

1. 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.
2. 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.
3. Beaucchesne, G., A. Zaid and A. Rhiss. 1986. Meristimatic potentialities of bottom of young leaves to rapidly propagate date palm. Second Symp. Date Palm, 3-6 March, King Saudi Arabia.
4. Bhargava, S.C., S.N. Saxena and R. Sharma. 2003. In vitro multiplication of *Phoenix dactylifera* L. J. Plant Bioch. Biotech. 12:43-47.
5. Daguin, F. and R. Letouze. 1988. Régenération du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par embryogenése somatique: amé1ioration de l'efficacite par passage au milieu liquide agit6. Fruits 43:191-194.
6. 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.
7. El, M.I. and M. Baaziz. 1995. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactilyfera* L. Biologica Plantarum 37(2): 197-203.
8. 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.
9. Iraqui, D. and F.M. Trembly. 2001. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2025-04-05]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.33.7]

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 Forestery, 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. Chowdury. 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, sugers, phenolics and peroxidases activities during the embryogenic cell suspension culture. Biotechnol. 3(2):114-118.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2025-04-05]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1387.12.46.33.7]