Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸
صفحه ۷۰-۶۳

بررسی اثرات ژنوتیپ و سیتوکینین‌ها بر تولید کالوس جنین‌زا در نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.)

آتوسا دانیایی[۱]، امیر موسوی[۲]*، فرح فراهانی[۳]، بهاره دهسرا[۴]، محمد ضعیفی‌زاده[۵]

۱،۲،۳،۴و۵- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، استادیار، کارشناس و دانشجوی دکتری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m-amir@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۲۱)

چکیده

به منظور بهینه‌سازی مراحل تولید جنین رویشی در نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.)، بافت‌های جوان و مریستمی جدا شده از پاجوش‌های ۳-۲ ساله سه ژنوتیپ شامل ارقام زاهدی، کبکاب و دیری در ۱۰ سطح هورمون شامل ۵ سطح زآتین (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم درلیتر) و ۵ سطح تی‌دیازورون (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/٤ و ۰/٦ میلی‌گرم درلیتر) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی در ۳ تکرار بر روی محیط پایه موراشیگ و اسکوگ حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر توفوردی‌کلروفنوکسی‌استیک اسید، ۳ گرم در لیتر زغال فعال و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز کشت شدند. نمونه‌ها در شرایط کنترل‌شده با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. بافت‌های کشت شده در تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت، کالوس اولیه تولید کردند و پس از انجام واکشت‌هایی در همان محیط‌ها در مدت ۸-٦ هفته کالوس جنین‌زا به‌دست آمد. ارقام زاهدی و کبکاب به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر زآتین و رقم دیری در ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تی‌دیازورون، بیشترین میانگین کالوس جنین‌زا را داشتند. هم‌چنین ارقام کبکاب، زاهدی و دیری به‌ترتیب کوتاه‌ترین زمان کالوس‌زایی را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی

خرما،
رویان‌زایی رویشی،
کالوس،
کشت بافت

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کشور ایران با تنوع وسیع آب و هوایی، در پاره‌ای از مناطق آن در زمینه تولید برخی از محصولات کشاورزی و باغی نظیر خرما، از مزایای قابل توجهی برخوردار است. از گذشته دور، خرما یکی از محصولات مهم و استراتژیک کشور بوده و با توجه به ارزش غذایی بالا، تنوع تولید و مرغوبیت خاص برخی اقلام آن، از نظر مصارف داخلی و صادرات بسیار حائز اهمیت می‌باشد. کشورهای مصر، ایران، عربستان و پاکستان عمده‌ترین کشورهای تولید کننده و هم چنین استان‌های هرمزگان، کرمان و خوزستان نیز از مراکز مهم گسترش نخلستان‌ها به شمار می‌آیند. بر اساس آخرین اطلاعات موجود، سطح زیر کشت خرما در ایران در سال زراعی ۸۷-۱۳۸٦ برابر با ۲٤۳ هزار هکتار بوده که بیشترین سطح بارور خرما با ۱۸/۰٤ ٪ به استان هرمزگان تعلق دارد.

گونه نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) از گیاهان تک‌لپه و دوپایه بوده که از سطح هتروزیگوتی[1] بالایی برخوردار می‌باشد. این خصوصیات، تکثیر نخل به طریق بذر را به دلیل تفرق زیاد خصوصیات ژنتیکی غیراقتصادی ساخته، لذا، استفاده از روش کشت بافت جهت تکثیر و تولید انبوه نهال های یکسان و محافظت ژرم پلاسم مورد توجه قرار گرفته است. بدین جهت محققینی از جمله Tisserat (۱۸)، Zaid و Tisserat (۲۲)، Mater (۱۳) و Ross و همکاران (۱۶) مطالعه و بررسی در این زمینه را آغاز کرده و تولید کالوس‌های جنین‌زا و تکامل جنین‌ها به گیاهک را گزارش نموده‌اند و این تحقیقات همچنان ادامه دارد (۴،۸،۱۰و۲۱).

درحال حاضر، فن آوری های کشت بافت گیاهی به عنوان یک ابزار قوی جهت مطالعه مشکلات اساسی و کاربردی زیست‌شناسی گیاهی درآمده است. مهم‌ترین موارد استفاده از کشت بافت و سلول‌های گیاهی شامل تکثیر انبوه و سریع گیاهان، اصلاح ارقام، تولید گیاهان عاری از بیماری و تهیه ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش‌های محیطی می‌باشد.

یکی از پدیده‌های بسیار باارزش که باززایی گیاهان از ریزنمونه‌های مختلف به‌وسیله آن به‌راحتی انجام می‌پذیرد، جنین‌زایی سوماتیکی است. جنین‌زایی سوماتیکی از جمله موضوعات باارزش و برجسته در کشت بافت گیاهی بوده و مفهوم آن تولید جنین از سلول‌ها، بافت‌ها و یا اندام‌های سوماتیکی و به‌طورکلی از ریزنمونه‌های سوماتیکی می‌باشد. در خرما، بافت‌های مختلف می‌توانند برای تولید کالوس مورد استفاده قرار گیرند (۲۲). پیرو بررسی‌های انجام شده قسمت‌های مختلف پاجوش، گل‌آذین جوان، میوه نارس و جنین بذر از قابلیت تولید کالوس جنین‌زا برخوردار بوده‌اند. با توجه به خصوصیت رشدی این گیاه مبنی بر عدم تولید شاخه‌های فرعی در نخل خرما، یک نقطه رشد پایه وجود داشته که در زمان کوتاهی از دوره زندگی خود پاجوش تولید می‌کند. بنابراین تعدادی پاجوش و در نتیجه تعدادی مریستم به‌عنوان ریزنمونه تولید می‌شود که معمولاً این تعداد نیز کم می‌باشد (حداکثر بین ۳۰-۰) (۶و۱۹).

استفاده از روش‌های نوین زیست‌فناوری از جمله کشت بافت و باززایی گیاه و به‌ویژه توسعه روش‌های انتقال ژن و تراریختی در گیاهان چوبی، در کنار روش‌های اصلاحی متداول، به یک ابزار ضروری برای اصلاح گیاهان تبدیل شده است. با درنظرگرفتن این نکته و توجه به تنوع بالای ژرم پلاسم ارقام ایرانی، هنوز اطلاعات جامعی در زمینه بهینه‌سازی کشت بافت و تولید کالوس جنین‌زا در کلیه ارقام تجاری کشورمان دردسترس نمی‌باشد. لذا، با توجه به اهمیت موضوع و در همین راستا، بهینه‌سازی تولید کالوس و جنین‌زایی رویشی حاصل از آن در برخی ژنوتیپ های مهم خرمای ایرانی با استفاده از هورمون‌های سیتوکینین به همراه یک نوع اکسین برای اولین بار مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. البته تاکنون ترکیبات مختلفی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها با غلظت‌های متفاوت جهت تولید کالوس‌های رویان‌زا در ارقام مختلف خرما توسط پژوهشگران به‌کار رفته است (۲،۱۵و۱۷). اما با عنایت به تنوع ژرم پلاسم و اهمیت جهانی محصولات خرما، مطالعه در زمینه بهینه‌سازی کشت بافت آن در ارقام برتر ایرانی موفقیت قابل توجهی را در امر تولید و صادرات به همراه خواهد داشت.

[1] Heterozygote

Archive of SID

مواد و روش‌ها

۱- تهیه نمونه گیاهی

در این آزمایش از سه ژنوتیپ خرمای ایرانی (*Phoenix dactylifera* L.) به نام‌های زاهدی، کبکاب و دیری که از مناطق خرماخیز کشور از جمله اهواز و بهبهان در استان خوزستان تهیه شده بودند، استفاده شد. به این منظور بعد از انتخاب پایه‌های مادری مناسب و سالم، پاجوش‌های ۳-۲ ساله آن‌ها به طول ۹۰-۷۰ سانتی‌متر و قطر ۴۰-۲۵ سانتی‌متر جدا گشتند. به‌طورکلی، عمل جداسازی پاجوش از پایه مادری جهت حفظ پاجوش از گرما و سرمای بیش از حد در فصول بهار و پاییز صورت گرفت. این پاجوش‌ها، بعد از جداسازی و قطع شاخ و برگ و ریشه‌های اضافی در محلول‌های ۵ در هزار قارچ‌کش (بنومیل[1]) و حشره‌کش (مالاتیون[2])، به‌ترتیب به‌مدت زمان ۱۰ و ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از ضدعفونی، پاجوش‌ها درون گونی‌های چتایی پیچانده شده و به محیط آزمایشگاه انتقال یافتند. در آزمایشگاه بخش کوچکی از پاجوش‌ها حاوی جوانه انتهایی، بافت‌های مریستمی و پریموردیای برگی جدا گردیده و به مدت ۴-۳ ساعت در محلول ترکیبی آنتی‌اکسیدان (اسیدسیتریک[3] و اسیداسکوربیک[4] به‌ترتیب ۱۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در یخچال نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به‌وسیله الکل ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم[5] ۵۰٪ حاوی چند قطره توین ۲۰[6]، به‌ترتیب به‌مدت زمان ۳۰ ثانیه و ۲۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. بعد از چهار بار شست‌وشو با آب مقطر استریل، بخش مورد نظر به ریزنمونه‌های ۴-۳ میلی‌متری خرد شده و در محیط کشت تولید کالوس به‌مدت ۶-۴ هفته قرار گرفتند.

۲- محیط کشت

برای تولید کالوس از محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (۱۳) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و غلظت‌های مختلفی از سیتوکینین‌های زآتین و تی‌دیازورون طبق جدول ۱ استفاده شد. علاوه بر ترکیبات فوق، ۰/۳٪ زغال فعال، ۳٪ ساکارز و ۰/۷٪ آگار اضافه گردید و pH محیط حدود ۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه‌ها در شرایط کنترل شده با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری و هر ٦-٤ هفته یک بار واکشت شدند. در طی دوره رشد تورم بافت‌ها و خصوصیات ظاهری کالوس‌ها از نظر شکل، سفتی و نرمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- سطوح مختلف هورمونی در محیط کشت برحسب میلی‌گرم در لیتر.

تیمار هورمونی در محیط کشت	زآتین	تی‌دیازورون
Z_1	۰/۵	–
Z_2	۱	–
Z_3	۱/۵	–
Z_4	۲	–
Z_5	۳	–
T_1	–	۰/۱
T_2	–	۰/۲
T_3	–	۰/۳
T_4	–	۰/٤
T_5	–	۰/٦

۳- تجزیه آماری

در محیط کشت پایه حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر توفوردی آزمایشی با ده تیمار هورمونی شامل پنج غلظت از زآتین و پنج غلظت از تی‌دیازورون (جدول۱) بر روی سه ژنوتیپ خرمای زاهدی، کبکاب و دیری به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی به مدت ۸-۲ هفته اندازه‌گیری گردید. آزمون نرمال

[1] Benomyl
[2] Malathion
[3] Citric acid
[4] Ascorbic acid
[5] Sodium hypochlorite
[6] Tween 20

www.SID.ir

Archive of SID

بودن داده‌ها به روش چولوگی[1] و کشیدگی[2] انجام گردید. پس از نرمال کردن داده‌های مربوط به جنین‌زایی با استفاده از (log (۰/۵ +x)، تجزیه واریانس (ANOVA) با نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن[3] در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت و نتایج برحسب داده‌های واقعی ارائه گردید.

نتایج و بحث

بافت‌های مریستمی و جوان پس از دو بار واکشت روی محیط‌های مذکور تولید کالوس نمودند. بافت‌های متورم و شفاف بر روی ریزنمونه‌ها و پس از آن کالوس‌های شفاف و روشن در زیر استریومیکروسکوپ دیده شدند که به دنبال آن مراحل اولیه القای کالوس‌های جنین‌زا نیز در برخی از کالوس‌های با ظاهری متراکم، زرد رنگ و دانه‌دار مشاهده گردید. کالوس‌های جنین‌زا سفت و دانه‌ای و به رنگ‌های سفید و زرد کم‌رنگ بودند. بررسی میکروسکوپی جنین‌های غیرجنسی، اشکال کروی، قلبی و کشیده را نشان داد.

میزان رشد کالوس بسته به نوع محیط غذایی و نوع ژنوتیپ متفاوت بود. به طوری که در تیمار تی‌دیازورون، رقم زاهدی در محیط‌های حاوی ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر تی‌دیازورون، رقم کبکاب در محیط‌های حاوی ۰/۲،۰/۴ و ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر تی‌دیازورون، رقم دیری در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر تی‌دیازورون رشد بیشتری از خود نشان دادند. درحالی‌که در تیمار زآتین، رقم زاهدی در محیط‌های حاوی ۰/۵ و۱ میلی‌گرم در لیتر زآتین، رقم کبکاب در محیط‌های حاوی ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر زآتین و رقم دیری در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر زآتین دارای رشد کالوس و نمو بعدی مناسب‌تر بودند. این موضوع از روی مشاهده افزایش حجم کالوس‌ها نیز کاملاً مشهود بود (شکل۱). درصد تولید کالوس جنین‌زا نیز در مقایسه با غلظت‌های بهینه شده برای تولید کالوس، مورد بررسی قرارگرفت. به‌طورکلی، کوتاه‌تر شدن مدت زمان تولید کالوس و تشکیل کالوس جنین‌زا (شکل۲) در سه ژنوتیپ مورد آزمایش نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر توفوردی) مشهود بود (داده‌ها و نتایج ارائه نشده است.).

نتایج تجزیه واریانس برای درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در جدول ۲ آمده است. بین ژنوتیپ ها از لحاظ کالوس‌زایی و جنین‌زایی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد. بدین‌معنی‌که ارقام از لحاظ کالوس‌زایی و جنین‌زایی با هم تفاوت داشتند.

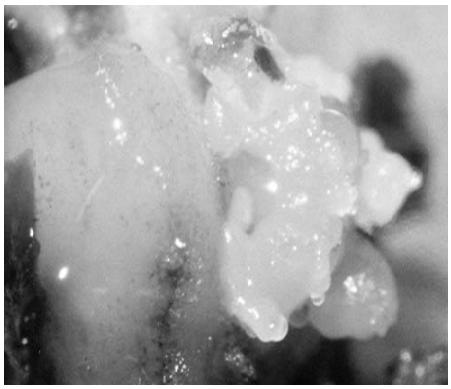
[1] Skewneses
[2] Kourtises
[3] Dunkan's test

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس برای درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد در ژنوتیپ های خرما.

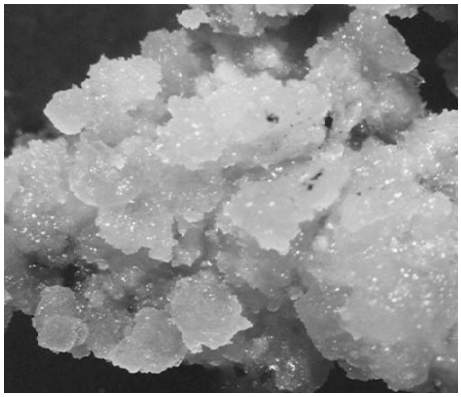
منابع تغییر	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	
		کالوس‌زایی	جنین‌زایی
ژنوتیپ	۲	۱۲۹۱/۲۶**	۶/۲۹**
هورمون	۹	۱۷۸/۰۳**	۰/۴۳ns
هورمون × ژنوتیپ	۱۸	۶۲۸/۴۱**	۲/۷۴**
اشتباه آزمایش	۶۹	۵۳/۳	۰/۳۰۳

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.
n.s: غیر معنی‌دار.

Archive of SID



شکل۱- القا و تولید کالوس در رقم زاهدی در غلظت‌های بهینه‌شده تی‌دیازورون.



شکل۲- تولید کالوس جنین‌زا در خرمای رقم کبکاب.

بین ۱۰ سطح هورمونی (۵ سطح زآتین و ۵ سطح تی‌دیازورون)، از لحاظ کالوس‌زایی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت، ولی از لحاظ جنین‌زایی تفاوت معنی‌دار نبود. بنابراین تأثیر هورمون‌ها بر روی کالوس‌زایی متفاوت بود اما بر روی جنین‌زایی این تفاوت معنی‌دار نبود. اثر متقابل هورمون و نوع ژنوتیپ برای هر دو صفت معنی‌دار بود ($P\leq$۱٪). بدین معنی که ژنوتیپ ها در سطوح هورمون‌ها عکس العمل یکسان نداشتند.

چون ژنوتیپ های مورد بررسی از لحاظ هر دو صفت درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (جدول۲)، بنابراین مقایسه میانگین آنها برای صفات فوق به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد که نتایج مربوطه در جدول ۳ آمده است. بدین ترتیب رقم کبکاب بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشت هر چند که با رقم زاهدی تفاوتی معنی‌داری نداشت و کمترین درصد کالوس‌زایی در رقم دیری مشاهده گردید. از لحاظ جنین‌زایی بیشترین درصد جنین‌زایی در رقم کبکاب دیده شد که با میانگین (۳۲/۷۷ درصد) در کلاس a به طور جداگانه قرار گرفت. بعد از آن رقم زاهدی در کلاس b و رقم دیری با حداقل میانگین جنین‌زایی در کلاس c گروه‌بندی شده بودند. بدین ترتیب روندی منطقی بین درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در ارقام دیده شد.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها از لحاظ درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی به روش دانکن.

ژنوتیپ	درصد کالوس‌زایی	جنین‌زایی
زاهدی	^{a}۱۸/۶۷	^{b}۱۸/٤٦
کبکاب	^{a}۱۹/٦۷	^{a}۳۲/۷۷
دیری	^{b}۸	^{c}٦

* حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪.

جدول ٤- نتایج مقایسه میانگین تیمارهای مختلف هورمونی از لحاظ درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی (در سطح احتمال ۵٪).

تیمار	درصد کالوس‌زایی	درصد جنین‌زایی
$Z1^{+}$	۲۰/۰۰ab*	۲۳/۱۵a
Z2	۱۳/۳۳dc	۱۵/۷۶a
Z3	۸/۸۹d	۱۲/۹۶a
Z4	۱۴/۶۷bcd	۱۹/۳۳a
Z5	۱۲/۲۲d	۲۴/۶۳a
$TDZ1^{++}$	۲۲/۲۲a	۲۰/۰۰a
TDZ2	۱۹/۰۵bc	۲۰/۲۴a
TDZ3	۲۰/۰۰ab	۲۵/۶۱a
TDZ4	۱۱/۶۷d	۱۱/۶۷a
TDZ5	۱۳/۳۳cd	۱۷/۵۷a

* حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪.

$^{+}$ Z1 تا Z5 به ترتیب تیمار هورمونی زاتین در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر.

$^{++}$ TDZ1 تا TDZ5 به ترتیب تیمار هورمونی تیدیازرون در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/٤ و ۰/٦ میلی گرم در لیتر.

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین تیمارهای هورمونی برای درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی (جدول۴) انجام گردید. بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به هورمون تی‌دیازورون با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر بود. هرچندکه با هورمون زآتین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و تی‌دیازورون با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین درصد کالوس‌زایی در زآتین (۱/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و تی‌دیازورون (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) بود.

با توجه به نتایج می توان اظهار نمود که با افزایش غلظت زآتین و نیز تی‌دیازورون روند کالوس‌زایی کاهشی بوده است اما به دلیل وجود اثر متقابل معنی‌دار بین ژنوتیپ در سطوح هورمون باید با دقت بیشتر در هر سطح از هورمون و ارقام به طور جداگانه بررسی شود.

اثر متقابل ژنوتیپ در سطح هورمون‌ها معنی‌دار بود. نتایج تأثیر هورمون‌های مورد مطالعه بر روی کالوس‌زایی و جنین‌زایی در ژنوتیپ های مختلف در شکل های ۳ و ۴ آمده است. بیشترین درصد کالوس زایی در رقم زاهدی در سطح هورمون تی‌دیازورون (۰/۳ میلی‌گرم در لیتر)، در رقم کبکاب مربوط به سطح هورمون تی‌دیازورون (۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) و زآتین (۵ میلی‌گرم در لیتر) و در رقم دیری در سطح هورمون تی‌دیازورون (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بوده است. در رقم زاهدی، استفاده از زآتین (۳ میلی‌گرم در لیتر) و تی‌دیازورون (۰/۶ میلی‌گرم در لیتر)، کالوس‌زایی حداقل را به همراه داشت. به‌نظر می‌رسد با افزایش سطح غلظت زآتین روند کالوس‌زایی در رقم زاهدی کاهش داشته ولی با افزایش غلظت تی‌دیازورون تا سطح ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر افزایش کالوس‌زایی و بعد از آن کاهش کالوس‌زایی به طور معنی‌دار اتفاق افتاده است اما این روند در رقم کبکاب متفاوت بود.

با افزایش غلظت زآتین و تی‌دیازورون، میزان کالوس‌زایی در رقم کبکاب افزایش یافته است، به‌گونه‌ای که در این رقم، در غلظت‌های پایین حداقل کالوس‌زایی و در غلظت‌های بالا حداکثر کالوس‌زایی اتفاق افتاد. در رقم دیری نیز روند کاهش کالوس‌زایی با افزایش غلظت زآتین و تی‌دیازورون مشاهده شد. از سطح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر زآتین به بعد و نیز از سطح ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر تی‌دیازورون، کالوس‌زایی در این رقم متوقف شده است. تأثیر هورمون‌ها بر روی ژنوتیپ های مورد مطالعه متفاوت بود. بیشترین درصد جنین‌زایی در رقم کبکاب در سطح هورمون زآتین ۳ میلی‌گرم در لیتر به میزان ۷۳/۸٪ مشاهده شد. رقم کبکاب در تی‌دیازورون ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر با میزان ۵۲/۷٪ و رقم زاهدی در تی‌دیازورون ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر با میزان ۴۹/۵٪ ، رقم کبکاب در زآتین ۲ میلی‌گرم در لیتر با میزان ۴۸/۳٪ و رقم زاهدی در زآتین ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر با میزان ۴۷/۷٪ و کبکاب در تی‌دیازورون ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر با میزان ۴۶/۷٪ در رتبه بعدی گروه‌بندی شدند. به طورکلی در رقم زاهدی با افزایش غلظت زآتین جنین زایی کاهش یافت و در غلظت بیش از یک میلی‌گرم در لیتر میزان جنین‌زایی متوقف گردید. اما با افزایش غلظت تی‌دیازورون روند جنین‌زایی تا سطح ۰/۳ میلی‌گرم‌در لیتر افزایش ولی از آن به بعد جنین زایی متوقف شد. در رقم کبکاب هم با افزایش غلظت زآتین و هم تی‌دیازورون جنین‌زایی افزایش چشم‌گیری نشان داد. بیشترین جنین‌زایی در حداکثر غلظت زآتین و تی‌دیازورون روی داد. اما در رقم دیری فقط در سطح زآتین ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و تی‌دیازورون ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر جنین‌زایی اتفاق افتاد، ولی در بقیه سطوح کاملاً متوقف شد.

این تحقیق بیانگر تأثیر نوع ژنوتیپ بر درصد القای کالوس و تشکیل کالوس جنین‌زا بوده و هم چنین تأثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در تولید کالوس و تسریع تشکیل کالوس جنین‌زا را نشان می‌دهد.

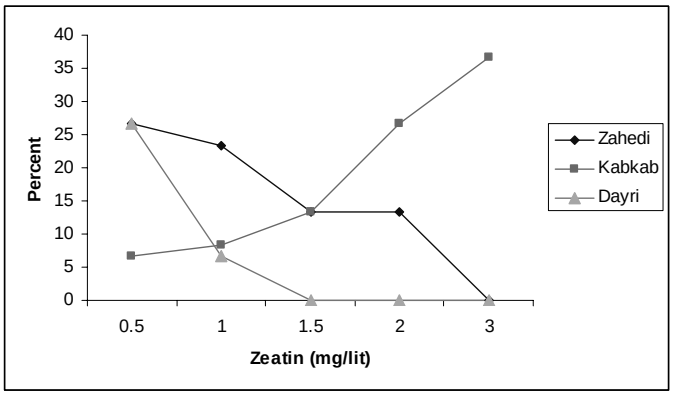
شاید بتوان گفت که تا به حال یک محیط بهینه نسبی برای کشت بافت خرما با استفاده از هورمون تی‌دیازورون (به عنوان یک سیتوکینین جدید و با مکانیسم اثر متفاوت) و نیز هورمون زآتین به همراه توفوردی به خصوص در ژنوتیپ های استفاده شده در این تحقیق، معرفی نشده (۹) و ترکیب محیط کشت و زمان تشکیل کالوس و در نتیجه تولید جنین رویشی در ژنوتیپ های مختلف، متفاوت است (۵،۳و۲۰). در این آزمایش، بافت‌های مریستمی پاجوش، قابلیت کالوس‌زایی و تولید کالوس جنین‌زا را نشان دادند. همچنین مشخص شد که میزان تولید کالوس جنین‌زا تحت تأثیر هر دو فاکتور ترکیبات محیط کشت از جمله نوع و غلظت هورمون ها و رقم یا ژنوتیپ قرار دارد. مطالعه در این زمینه برای روشن شدن مکانیسم اثر این

Archive of SID

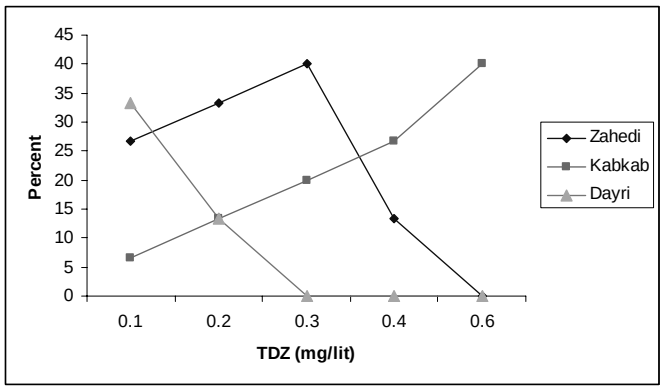
عوامل و نیز تاثیر نوع بافت کشت شده ادامه دارد.

در این بررسی از اکسین توفوردی به طور ثابت و سیتوکینین‌های تی‌دیازورون و زآتین برای جنین‌زایی استفاده شد. غلظت مناسب برای رشد و تکامل جنین‌زایی بسته به نوع، غلظت و ترکیب هورمون ها متفاوت می باشد. کاربرد سیتوکینین‌ها در ترکیب با اکسین ها در تسریع القای کالوس و تشکیل کالوس جنین‌زا در خرما و بسیاری از گیاهان شناخته شده است (۷،۱۱و۱۲). در غلظت‌های پایین اکسین عموماً رشد بافت و تولید اندام‌های ریشه و برگ را موجب می‌شود، ولی غلظت‌های بالاتر باعث تشکیل کالوس می‌گردد (۱). گرچه ترکیبات مختلف قادر به ایجاد کالوس و جنین‌زایی هستند، اما لازم است که اثرات آن‌ها در مراحل بعدی رشد گیاهانی که از این جنین‌ها به دست می‌آیند نیز، مدنظر قرار گیرند. البته کاربرد جنین‌زایی رویشی محدود به ازدیاد انبوه نخل خرما نبوده، بلکه به عنوان ابزار با اهمیتی در تولید مواد اولیه لازم در مهندسی ژنتیک و اصلاح ارقام موجود از طریق انتقال ژن و نیز فرآیندهای بیولوژیکی به شمار می‌رود.

با در نظرگرفتن نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت که کاربرد هورمون‌های سیتوکینینی در کنار توفوردی باعث بهبود کالوس‌زایی در بافت‌های مختلف مورد بررسی شده و در کاهش این دوره در نخل خرما که نیازمند زمان طولانی و نیز مشکل قهوه‌ای شدن بافت‌ها است، مؤثر می باشد. در عین حال، ارقام مختلف دارای پتانسیل‌های متفاوتی در جهت تولید کالوس بوده و عامل ژنوتیپ در پروژه‌های کشت بافت همواره باید مد نظر قرار گیرد. البته ژنوتیپ های مختلف توانایی متفاوتی در تشکیل کالوس نشان دادند و نوع و غلظت‌های متفاوت هورمون‌ها نیز تاثیرات مهمی در کم نمودن دوره زمانی کالوس‌زایی ابراز داشتند. در نهایت، این پروتکل می تواند به منظور تولید بهینه کالوس مناسب به عنوان پیش‌نیاز ریزازدیادی و نیز تراریختی در گونه نخل خرما مورد بهره‌برداری قرار گیرد.



شکل۳- اثر غلظت‌های مختلف زآتین بر درصد کالوس‌زایی سه ژنوتیپ خرما.



شکل۴- اثر غلظت‌های مختلف تی‌دیازورون بر درصد کالوس‌زایی سه ژنوتیپ خرما.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز بین المللی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (ICGEB) بابت تامین منابع مادی این مطالعه (گرانت CRP/ IRA03-02(b)) و نیز حمایت های دریافت شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (طرح ۲۱۶) قدردانی و سپاسگزاری می نمایند.

منابع

۱- ناظری، س.، خوشکام، ص.، افشاری، م.، مدیری، م.، شکیب، ع.، و مجیدی، ا. (۱۳۷۱) تولید جنین رویشی در ارقام خرمای استعمران و کبکاب در شرایط کنترل شده، مجله تحقیقات کشاورزی «نهال و بذر»، ج ۸، ش ۳ و ۴ : ۲۰-۱۶.

2. Alkhateeb, A. (2008).Comparison Effects of Sucrose and Date Palm Syrup on Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L). American Journal of Biotechnology and Biochemistry 4 (1): 19-23.

3. Al-Khayri, J. M. (2001). Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). In Vitro Cell, Dev. Biol-Plant. 37(4): 453-456.

4. Asemota, O., Eke R.C. and Odewale, O.J. (2007). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen African Journal of Biotechnology Vol. 6 (20), pp. 2353-2357.

5. Bajaja, Y. (1992). Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micro propagation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 18: 471-492.

6. Beacuchesne, G. (1982). Vegetative propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by in vitro culture, proceeding of the first symposium on date palm. King. Facial University Saudi Arabia. 698-699.

7. Dolendro singh, N., Sahoo, L., Sarin, N. B. and Jaiwal, P. K. (2003). The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeon pea (Cajanus cajan L. Mill sp). J. of Plant science. 164: 341-347.

8. Eke, R. C., Akomeah, P. and Asemota, O. (2005). Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (3), pp. 244-246.

9. Eshraghi, P., Zarghami, R., Ofoghi, H. and Mirabdulbaghi, M. (2005). Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. African J. Biotech. 4 (11): 1309-1312.

10. Gorst, J.R. 2002. Plant tissue culture- its importance in biology. In: The Importance of Plant Tissue Culture and Biotechnology in Plant Sciences. Eds, Taji, A. and Williams, J.R. University of New England Publications Unit. Australia. pp. 41-53.

11. Huan Le, van Tuong, Takamura T. and Tanaka M. (2004). Callus Formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in cymbidium orchid. J. of Plant science. 166: 1443-1449.

12. Kackar, N. L., Solanki, K. R. and Joshi, S. P. (1989). Micro propagation of date palm cv. Khadrawy using Tissue culture Technique. Ann. Of Arid Zone. 28(182):137-191.

13. Mater, A. A. (1983). Plant Regeneration from callus culture of (*Phoenix dactylifera* L.). Date palm J. 1 (2): 57-77.

14. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473–497.

15. Reynolds, J. F. and Murashige, T. (1979). Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. In Vitro. 15: 383-387.

16. Ross, A.H., Manners, J.M. and Birch, R.G. (1995). Embryogenic Callus Production, Plant Regeneration and Transient Gene Expression Following Particle Bombardment in the Pasture Grass, Cenchrus ciliaris (Gramineae). Australian Journal of Botany 43(2) 193 – 199.

17. Tisserat, B. (1979). Propagation of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. J. Expe. Bot. 30 (119):1275-1283.

18. Tisserat, B. and Demason, D.A. (1980). A Histological study of Development of Adventive's Embryos in organ culture of *Phoenix dactylifera* L.. Ann. Bot. 46:465-472.

19. Veramendi, J. and Navarro, L. (1996). Influence of physical conditions of nutrient medium and sucrose on somatic embryogenesis of date palm. Plant Cell, Tissue and Organ culture. 45:159-164.

20. Veramendi, J. and Navarro, L. (1997). Influence of explants sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. J. Hort. Sci. 72: 665-671.

21. Williams, J.R. (2002). Plant tissue culture- its importance to agriculture and horticulture. In: The Importance of Plant Tissue Culture and Biotechnology in Plant Sciences. Eds, Taji, A. and Williams, J.R., University of New England Publications Unit. Australia. pp. 91-103.

22. Zaid, A. and Tisserat, B. (1983). Morphogenetic Responses obtained from a variety of somatic explants Tissue of Date Palm. Bot. Mag. 96: 67-73.