ازدیاد گیاهچه‌های حاصل از کشت درون شیشه‌ای رویان در رقم خرمای مضافتی(*Phoneix dactylifera* L.)

رزا عرب[1]، علی جعفری مفیدآبادی[2]، احمد مجد[1] و یحیی دهقانی شورکی[2]

چکیده

به منظور ارزیابی توان باززایی درون شیشه‌ای خرما (رقم مضافتی)، جنین بالغ از میوه‌های نارس جداسازی و در محیطهای کشت شامل MS حاوی هورمونهای رشد گیاهی (2,4-D)، 1/2-MS و MS فاقد هورمون کشت گردیدند. بیشترین درصد جوانه‌زنی جنین در محیط کشت 1/2-MS فاقد هورمونهای رشد مشاهده شد (٦٩/٢٤ %). جهت تحریک سلولهای مریستمی در ایجاد جوانه‌های نابه‌جا، ساقه نهالهای درون شیشه‌ای در منطقه یقه قطع و پس از تقسیم آنها به جدا کشتهای ۱ الی ۳ سانتیمتری به‌صورت عمودی در محیط کشت MS حاوی ۰/٤ میلی‌گرم در لیتر Thiamine HCl، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اینوزیتول، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز، ۸۰ میلی‌گرم در لیتر آدنین سولفات همراه هورمون 2ip در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کشت گردیدند. محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip مناسبترین محیط کشت جهت ایجاد تحریک مریستمها و تولید شاخسارهای جدید بود. شاخه‌های باززایی شده جهت ازدیاد به‌صورت مکرر از منطقه یقه قطع و پس از تهیه جدا کشتها به محیط کشت شاخه‌زایی منتقل شد و تعدادی نیز جهت تولید نهال در محیطهای کشت ریشه‌زایی کشت گردیدند. بیشترین بازده

۱- دانشگاه آزاد واحد شمال - تهران

۲- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران صندوق پستی ۱۳۱۸۵-۱۱٦

Email: ajafari @ rifr-ac.ir and dehghani @ rifr-ac.ir

ریشه‌زایی (بیش از ۸۰٪) پایه‌های حاصل در محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IAA مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: خرما (رقم مضافتی)، ریزازدیادی، کشت جنین، دست ورزی ژنتیکی و کشت بافت.

مقدمه

مطالعات اصلاح ژنتیکی خرما جهت افزایش میزان کمی و کیفی صفات اقتصادی به دلیل طولانی بودن دوره رویشی گیاه نیازمند بررسی واکنش این گیاه به روشهای درون شیشه‌ای از قبیل روش باززایی مستقیم (رویان‌زایی: ایجاد گیاه به‌واسطه تشکیل و جوانه‌زنی رویانهای سوماتیکی) و روش غیر مستقیم (اندام زایی: تشکیل سری ریشه و ساقه و یا بر عکس) تولید جنینهای نابه‌جا بر روی جنین زایگوت کشت شده می‌باشد. روشهای درون شیشه‌ای اصلاح نظیر گزینش درون شیشه‌ای سلولهای موتانت، تنوع‌زایی سوماکلونالی و گامتوکلونالی و روشهای مستقیم و غیر مستقیم انتقال ژن به جنینهای زایگوت کشت شده و ازدیاد گیاه حاصل از کشت جنین زایگوت به منظور تولید کلونهای جنینی و غیره در گرو ارزیابی توان باززایی این گیاه می‌باشد. روش ریز ازدیادی به دلیل اهمیت تکثیر انبوه این گیاه نسبت به سایر روشهای بیوتکنولوژی گیاهی پیشرفت قابل توجهی کرده است.

اگرچه روش بکار گرفته شده به شیوه باززایی غیرمستقیم بوده و امکان ظهور تنوعهای ژنتیکی در آن می‌رود، لیکن به دلیل مزیت این شیوه نسبت به تکثیر غیر جنسی سنتی از طریق پاجوش با توجه به محدودیت تعداد پاجوش (حداکثر بین ۰-۳۰) و توان استقرار پایین پاجوشها در نهالکاری و غیره، این روش از اهمیت تجاری زیادی برخوردار شده است (Beauchesne، ۱۹۸۲ و Veramendi و Navarro، ۱۹۹۷).

کالوسهای رویانزا حاصل از کشت جنینهای زایگوتیک (Reuveni، ۱۹۷۹) و از مریستمهای مرکزی و جانبی جدا شده از پاجوش انجام شد.Mater، ۱۹۸۳، Sharma و همکاران، ۱۹۸۰، ۱۹۸٤، ۱۹۸٦ و ۱۹۹۰، Tisserat، ۱۹۷۹، ۱۹۸۲، ۱۹۹۰، Zaid و Tisserat ۱۹۸۳و Al-Marri. و همکاران، ۱۹۸۹).

این مطالعه به منظور بررسی امکان ازدیاد درون شیشهای و ارزیابی توان باززایی گیاه حاصل از کشت جنین در خرما رقم مضافتی انجام شد.

مواد و روشها

میوههای نارس خرمای مضافتی از استان کرمان جمعآوری شد. میوههای نارس سبز رنگ خرما چسبیده به محور خوشه جدا شد و به کمک محلول هیپوکلرایت کلسیم ۲۵ درصد (به مدت ۱۲ دقیقه) و انجام سه بار شستشوی ۵ دقیقهای با آب مقطر ا سترپل مورد ضد عفونی سطحی قرار گرفتند. جنین ایزوله شده از هسته میوه خرمای نارس جهت جوانهزنی به محیطهای کشت جامد MS (Murashige و Skoog ۱۹٦۲) حاوی غلظتهای متفاوتی از هورمونهای رشد گیاهی 2,4-D (۵۰ الی ۱۰۰ میلیگرم در لیتر). محیط کشت MS و1/2-MS فاقد هورمونهای رشد گیاهی در ظرف پتریدیش (۱۵mm×۱۰۰mm) انتقال داده شدند. به منظور ارزیابی توان جوانهزنی جنین در محیطهای کشت فوق طرح آزمایشی بلوکهای کامل تصادفی با چهار تیمار محیط کشت فوق و در سطح پنج تکرار به اجرا درآمد. هر واحد آزمایشی شامل پنج عدد جنین ایزوله شده در پتری دیش (۱۵mm×۱۰۰mm) حاوی محیطهای کشت جامد فوق تشکیل شد. کشتها در اطاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و با شدت نوری ٤۰۰۰ الی ۵۰۰۰ لوکس فراهم شده به وسیله لامپهای فلورسنس سفید رنگ معمولی و آفتابی نگهداری شدند. ازدیاد (ازدیاد) نهالهای درون شیشهای با قطع متوالی هیپوکوتیل رشد یافته (٦-۷ سانتیمتر) در منطقه یقه و تقسیم آن به قطعات ۲ الی ۳ سانتیمتری به عنوان

جداکشتهای جدید و کشت آنها به‌صورت عمودی در محیط کشت MS حاوی هورمونهای رشد گیاهی 2ip و NAA با ترکیب و غلظتهای مختلف همراه ذغال فعال (۰٪) انجام شد.

نتایج و بحث

سه الی ٤ هفته پس از کشت جنینهای ایزوله شده در محیطهای کشت، جوانه‌زنی جنین شروع شد. تجزیه داده‌های حاصل از درصد جوانه‌زنی بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ میان محیطهای کشت بوده است (جدول شماره۱). مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی جنین محیطهای کشت به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که محیط کشتهای MS و 1/2-MS با توان جوانه‌زنی (به‌ترتیب ٥٩/٦٤ و ٦٩/٢٤٪) دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با محیطهای کشت MS حاوی هورمونهای رشد 2,4-D می‌باشد (جدول شماره ۲). به‌رغم عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین MS و 1/2-MS بیشترین درصد جوانه‌زنی در محیط کشت 1/2-MS هورمونهای رشد گیاهی (٦٩/٢٤٪) اتفاق افتاد. جنینهای کشت شده در محیط کشت MS حاوی هورمون رشد 2,4-D در هر دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پس از متورم شدن تولید گیاهچه‌های با رشد رویشی غیر طبیعی تولید نمودند. گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی جنین در ارتفاع ۱۰ سانتیمتری در منطقه یقه قطع و اقدام به تهیه جداکشت از تقسیم هیپوکوتیل گردید.

پس از گذشت ۳۰ الی ٤۰ روز، اندازه آنها به ٦ الی ۱۰ سانتیمتر در محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip و ٦ الی ۷ سانتیمتر در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA رسید. جهت انجام ازدیاد درون شیشه‌ای نهالهای رشد یافته مجددا پس از قطع در منطقه یقه و تهیه قطعات شاخه در اندازه ۱ الی ۳ سانتیمتری به محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip منتقل شدند. تمامی

محیطهای کشت جهت انجام ازدیاد حاوی ۵٪ ذغال فعال بود. تعدادی از نهالهای حاصل از مرحله ازدیاد جهت تکرار چرخه تکثیر و یا جهت ریشه‌دار شدن آنها در محیط کشت MS فاقد هورمونهای رشد به گلخانه منتقل شدند. اثر هورمونهای رشد و اندازه جداکشت در میزان ازدیاد مورد مطالعه قرار گرفت. مقایسه میانگین اثرات محیطهای کشت و اندازه جدا کشت به روش کی‌اسکوئر بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ بین آنها است (جدول شماره ۳). بیشترین مقدار ازدیاد (۷۷/۵٪) در محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip اتفاق افتاد و دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ نسبت به محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بوده است. جدا کشت ۳ سانتیمتری بیشترین مقدار ازدیاد را نسبت به قطعات ۱ سانتیمتری از خود نشان داد (جدول شماره ۳). در هر چرخه ازدیاد قسمت بالایی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای جدا و جهت ریشه‌زنی و تولید نهال در محیط کشت MS حاوی ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2ip همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IAA کشت شد و پس از ریشه‌زایی به‌صورت نهال کامل به گلخانه منتقل گردید (شکل شماره ۱). این روش مشابه روش تکثیر درون شیشه‌ای آناناس (*Ananas comosus* L.) می‌باشد (Kiss و همکاران ۱۹۹٤). تنها اختلاف این روش با روش ارائه شده در بافت اولیه، تامین جدا کشتها برای انجام ازدیاد می‌باشد. برای آناناس گیاهچه درون شیشه‌ای حاصل از کشت مریستم منبع اولیه جدا کشت بود، در حالی‌که در روش مورد مطالعه منبع اولیه تامین جدا کشتها گیاهچه‌های حاصل از جوانه‌زنی جنین زایگوت در محیط کشت 1/2-MS بود. اولین بار کشت جنین بر روی گیاه نارگیل توسط Cutter و Wilisan (۱۹٥٤) انجام شد و پس از آن گزارشهای متعددی در خصوص کشت جنین بر روی نخلهای تجاری خرما و نخلهای روغنی منتشر شد (Tisserat و Demason ۱۹۸۰). Zaid و Tisserat (۱۹۸۳) روشی را که برای اولین بار در مورد خرما (Date palm) بکار گرفتند برای گونه‌های دیگر خرما جهت انجام موضوعهای مورد نظر بکار رفت. تعدادی از این

روشها به منظور مطالعه واکنش مورفوژنتیکی خرما در برابر عوامل مختلف بود. به منظور تعیین رفتارهای مورفوژنتیکی، کشت جنین بالغ در محیط کشت MS پایه فاقد هورمونهای رشد گیاهی حاوی ۳٪ ذغال فعال انجام شد. نتایج حاصل از کشت جنین بالغ در محیط کشت پایه بدون هورمون مشابه نتایج ما در کشت جنین خرمای مضافتی بر روی همان محیط کشت بود. تلاشهای زیادی در ارزیابی توان باززایی خرما بر اساس اندام زایی و رویان‌زایی سوماتیکی انجام شده است. اندام‌زایی در خرما به‌دلیل محدودیت جدا کشتهای مناسب کشت درون شیشه‌ای و مدت زمان طولانی تشکیل کالوس، از بازده کمی برخوردار است (Reynolds، ۱۹۷۹ و Beauchesne، ۱۹۸۲).

جدول شماره ۱- تجزیه واریانس روی داده های حاصل از جوانه‌زنی جنین در خرما رقم مضافتی

منبع تغییرات	درجه آزادی	MS	F
تکرار	٤	٦۲/٦۸۰	
محیطهای کشت	۳	۱۷۸۳/۲۰	۱۱/۷۱٥*
خطا	۱۲	۱٥۲/۲۰٤	
کل	۱۹	۷٤۲٦/۸۰٦	

* اختلاف معنی‌دار در سطح پنج در صد

جدول شماره ۲- مقایسه اثرات متوسط محیطهای کشت بر روی جوانه‌زنی جنین در خرمای مضافتی

محیطهای کشت	متوسط جوانه‌زنی جنین بر حسب درصد
MS	a ٥۹/۶۴
Half-MS	a ۶۹/۲۴
MS+100 mg/l 2,4-D	b۳۰/٤۲
MS+ 50 mg/l 2,4-D	b ۳٤/۷٦

میانگین‌ها با حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ٥ درصد می باشند

جدول شماره ۳- اثرات متوسط محیطهای کشت و اندازه قطعات جداکشت در ایجاد نهال درون شیشه‌ای

عوامل موثر در ایجاد نهال	در صد تولید نهال و اختلافات معنی‌دار آنها
MS +10 mg/l 2ip	۷۷/۵**
MS + 0.1 mg/l NAA	٤٥
اندازه ۳ سانتیمتری جدا کشت ها	۷۳/۵**
اندازه ۱ سانتیمتری جدا کشت ها	٤۹

** اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد با استفاده از آزمون کی اسکوئر

شکل شماره ۱- رشد یک ماهه نهالهای درون شیشه‌ای تکثیر شده خرما

منابع

- Al-Marri, K., Bautista, C.M. and Al-Ghamdi, A.S., 1989. Micropropagation of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L) cultivar "Hillaly": Factors effecting root formation in vitro. Hort. Dep. College of Agri. Sciences, King Faisal University. pp. 173-191.
- Beauchesne, G., 1982. Vegetative propagation of data palm (*Phoenix dactylifera* L.) by in vitro culture. Proceeding of the First Symposium on date palm. King. Faisal University Saudia Arabia 698-9.
- Cutter, V.M. and Wilson, K.S., 1954. Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development in vitro of embryos of Cocos nucifera. Botanical Gazette 115:234-240.
- Kiss, E., Kiss J., Gyulai, G. and Heszky, L.E., 1994. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. Acta. Bio. Hungarica 12:32-41.
- Murashige, T. and Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.
- Mater, A.A., 1983. Plant regeneration from callus cultures of *Phoenix dactylifera L.* Date plam Journal 2:57-77.
- Reuveni, O., 1979. Embryogenesis and plantlet growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) derived from callus tissue. Plant Physiolgy suppl. 63.138.
- Reynolds, J.F., 1979. Morphogenesis of palms in vitro. In vitro 15:210
- Sharma, D.R., Chowdury, J.B., Neelman, R.Y. and Chowdury, V.K., 1990. *In vitro* multiplication of female date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Bulletin de la Socieie Botanique de France. 137:15-53.
- Sharma, D.R., Deepak S. and Chowdury J. 1986. Regeneration of plantlets from somatic tisssues of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Indian J. of Experimantal Biology. 24:763-766.
- Sharma, D.R., Dawra S. and Chowdury J.B. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm. Throgh tissue culture. Indian J. of Experimental Biology. 22:596-8.
- Sharma, D.R., Kumar, R., and Chowdury, J.B. 1980. *In vitro* culture of Female date palm tissues. Euphytica 29:169-174.

- Tisserat, B., 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. J. Of Experimental Botany. 30: 1275-83.
- Tisserat, B., 1982. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. Euphytica. 31.201-214 .
- Tisserat, B., 1990. Clonall propagation of palms . In . Plant Tissue Culture Manual C2. (Lindesy K. Ed). Kluver Acadaemic Publishers, Netherlands. 1-14.
- Tisserat, B. and Demason, D.A., 1980. A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. Date palm Journal 2:163-82.
- Veramendi, J. and Navarro, L., 1997. Influence of explant sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. J. of Horticultural Science 72:665-671.
- Zaid, A. and Tisserat, B., 1983. Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explant tissues of date palms. Botanical Magazine 96:67-73.