بهینه سازی دستورالعمل رویانزایی رویشی در خرما (*Phoenix dactylifera* L.) در رقم استعمران

الهه بهاران[۱]، پیام پورمحمدی[۱*] و احسان شهبازی[۲]

[۱] اهواز، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، دانشکده کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی

[۲] شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۷

چکیده

تولید نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) در ایران طی دهه ۱۳۷۰ افزایش چشمگیری داشت، اما به دلایلی همانند قدیمی بودن نخلستان‌ها، استفاده از روش‌های سنتی کاشت پاجوش‌های مادری و برداشت خرما، امکان خروج ایران از چرخه بازار جهانی وجود دارد. این پژوهش، در راستای بومی سازی دستور تجاری تکثیر کشت بافتی خرما، به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی، بر روی ریزنمونه رأس ساقه خرما رقم استعمران در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد تیدیازورون (TDZ) و ۴،۲.دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4.D)، هر یک با دو غلظت (۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر) در ۳ تکرار انجام شد. در تیمار (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۵ TDZ تولید کالوس به نسبت بالا و با کیفیت، برای جنین‌زایی مشاهده شد. حداکثر القاء جنین و تمایززایی به جنین کوتیلدونی، در محیط کشت MS و با کاهش مقدار منبع کربن به (gl^{-1}) ۲۰، در تیمار تنظیم‌کننده رشد (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4.D همراه با (mgl^{-1}) ۵ TDZ رخ داد. در این پژوهش مدت زمان القاء تا تشکیل کالوس به دو هفته کاهش یافت و در هفته چهارم جنین‌های سوماتیکی متمایز شدند. نتایج شاهدی بر بهینه سازی دستورالعمل ریزازدیادی خرما در جهت کاهش مدت زمان جنین‌زایی و با استفاده از حداقل مصرف تنظیم‌کنندهای رشد 2,4.D و TDZ بود که منجر به کاهش تنوع سوماکلونال شد.

واژه‌های کلیدی: نخل خرما، مریستم رأس ساقه، رویانزایی رویشی، کالوس‌زایی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۱۳۶۵۲۲۰۰۱ پست الکترونیکی: Mohammadi@ramin.ac.ir

مقدمه

گونهٔ نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) درختی همیشه سبز و تک‌لپه، سازگار با شرایط آب و هوایی خشک و نیمه خشک است. ۵۳٪ از خاک ایران استعداد کشت خرما را دارد. طی دهه ۱۳۷۰ تولید و صادرات خرما افزایش چشمگیری داشت و ایران از جمله تولیدکنندگان (بعد از مصر در مقام دوم) و صادرکنندگان مهم جهانی خرما بشمار می‌آمد، اما به دلایلی همانند قدیمی بودن نخلستان‌ها، استفاده از روش‌های سنتی کاشت پاجوش‌های مادری و برداشت خرما، کمبود امکانات حمل و نقل و نبود صنایع فراوری مناسب خرما، امکان خروج ایران از چرخه بازار جهانی وجود دارد (۲). یک راه قابل دسترس برای حل این معضل، بومی سازی دستور تجاری تکثیر کشت بافتی خرما می‌باشد. استفاده از روش کشت بافت برای تکثیر و تولید انبوه نهال‌های یکسان و محافظت از ژرم‌پلاسم خرما مورد توجه قرار گرفته است. بدین جهت محققانی ازجمله Tisserat و Damason (۱۹۸۰)، Zaid و Tisserat (۱۹۸۳)، Mater (۱۹۸۳)، Ross و همکاران (۱۹۹۵)، مطالعه و بررسی در این زمینه را آغاز کرده و تولید کالوس

جنین‌زا و تکامل جنین‌ها به گیاهک را گزارش نمودند (۳۹، ۴۴، ۲۴، ۳۲). تکثیر درون شیشهٔ خرما اغلب از طریق جنین‌زایی سوماتیکی انجام شده است (۳۰، ۳۱، ۳۶، ۱۰، ۳۴، ۱۴، ۲۱، ۱۷، ۸، ۲۹). در این روش به دلیل تولید جنین از سلول‌ها، بافت‌ها و یا اندام‌های پیکری، کلون‌های نامحدودی با خصوصیات انتخابی تولید خواهد شد (۹).

در ایران نیز مطالعاتی در این راستا انجام شده است. ناظری و همکاران (۱۳۷۱)، اولین گزارش از تولید جنین سوماتیکی را در ارقام استعمران و کبکاب منتشر کردند (۶). Eshraghi و همکاران (۲۰۰۵) تولید جنین‌های سوماتیکی را در ارقام خنیزی و مردارسنگ بررسی کردند (۱۶). مطالعه روی ارقام کبکاب، استعمران، پیارم، برحی (۱)، زاهدی، کبکاب و دیری (۴) انجام شده است. در تمامی این پژوهش‌ها از غلظت‌های بالای تنظیم کنندهٔ رشد ۲، ۴- دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (به عنوان مثال، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در مطالعه حبشی و همکاران (۱۳۸۵)) (۱)، به همراه غلظت‌های پایین از تنظیم کننده-های رشد سیتوکینین استفاده شده بود که این امر منجر به بروز تنوع سوماکلونال خواهد شد (۲۵). در ضمن در اغلب آزمایشهای ریزازدیادی خرما به ۱۶ تا ۴۸ هفته زمان از شروع کشت تا تولید کالوس جنین‌زا نیاز دارد. به‌عنوان مثال پژوهش Al-Khateeb (۲۰۰۶) در ۲۸ هفته و پژوهش Hassanو Taha (۲۰۱۲) در مدت ۴۸ هفته به نتیجه رسیده است (۷، ۱۹). رقم انتخابی در این پژوهش استعمران می-باشد که بیش از ۶۵ درصد محصول خرمای خوزستان و ۴۰ درصد از تولید کل خرمای ایران را شامل می‌شود. ازجمله مشخصات این رقم داشتن درصد قند و ریزمغذی-های بالا، همراه با فیبر کم است. این خرما نیمه خشک بوده و رطوبت کمتر از ۱۷ درصد دارد، بنابراین می‌توان آن را در انبارهای معمولی و بدون سردخانه برای بیش از یکسال نگهداری کرد (۲۶)، به همین دلیل این رقم برای بهینه سازی انتخاب گردید. در این پژوهش، با توجه به گسترهٔ پژوهش‌ها و دستورالعمل‌های ارائه شده در زمینه کشت بافت نخل خرما، سعی شده دستورالعملی ارائه شود که با استفاده از حداقل تنظیم کننده‌های رشد که منجر به کاهش تنوع سوماکلونال خواهد شد، جنین‌زایی در کمترین زمان ممکن و با کاهش هزینه‌ها انجام شود.

مواد و روشها

پاجوش‌های استعمران به وزن ۲/۵ کیلوگرم، ارتفاع ۱۸۰ سانتی‌متر (از محل جدا شدن پاجوش از درخت مادری تا انتهای بلندترین برگ) و دارای ۶ برگ بالغ، از خزانه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان جدا شدند. بعد از قطع شاخ و برگ اضافی، رأس ساقه‌ها به مدت ۱ ساعت با آب شهری به همراه چند قطره شوینده شسته شدند. برش رأس ساقه در زیر هود لامینار انجام شد و مریستم رأسی که حدود ۳ سانتی‌متر ارتفاع دارد (شکل۱) برای سترون سازی، به‌مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۵/۲۵ درصد غوطه‌ور شده و بعد ۳ مرتبه با آب مقطر سترون و هر بار ۱۰ دقیقه آب‌کشی شد.

بعد از برش ریزنمونه‌ها به صورت طولی، قطعات ۱-۲ سانتی‌متری در محیط پایه Murashige (MS) و Skoog (۱۹۶۲) همراه با (gl^{-1}) ۴۰ ساکارز، (gl^{-1}) ۰/۳ زغال فعال، (gl^{-1}) ۸ آگار-آگار و آنتی‌اکسیدانت‌های آسکوربیک اسید و سیتریک اسید به نسبت (mgl^{-1}) ۷۵ :۷۵ و ۴ تیمار تنظیم کنندهٔ رشد (جدول ۱) بر اساس بررسی‌های Sidky و Zaid (۲۰۱۱)، برای القاء کالوس جنین‌زا کشت شدند (۲۷، ۳۵). pH محیط‌های کشت با استفاده از ۰/۱NaOH نرمال یا HCl ۰/۱ نرمال روی ۵/۷ تنظیم شده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در فشار۱۵ psi برای ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید.

دو واکشت اول به فاصله ۳ هفته بود و کشت‌ها در شرایط تاریکی۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکشت-های بعدی با فاصله ۴ هفته انجام شد و کشت‌ها به شرایط دوره روشنایی ۸/۱۶ ساعت (روشنایی/تاریکی) منتقل

شدند (۲۳). ۸ هفته بعد از کشت و پس از محاسبه درصد کالوس‌زایی هر تیمار، کالوس‌ها به محیط القای جنین، شامل محیط کشت پایه MS همراه با ساکارز (gl^{-1}) ۴۰ و زغال فعال (mgl^{-1}) ۰/۳ منتقل شد. ۸ هفته بعد از جابه-جایی به محیط کشت پایه MS، جنین‌ها بر روی کالوس-های جنین‌زا کاملا قابل مشاهده و بررسی بودند. پس از این مرحله جنین ها به محیط کشت پایه MS همراه با (gl^{-1}) ۲۰ [1] ساکارز انتقال پیدا کردند.

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی (CRD) با ۳ تکرار اجرا شد (جدول ۱).

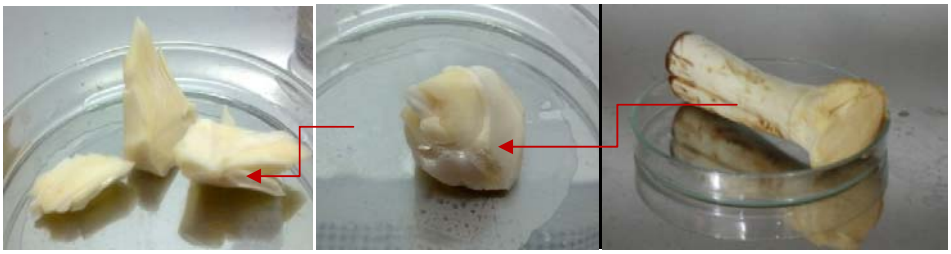
فاکتور اول تنظیم کنندهٔ رشد 2,4-D در دو سطح و فاکتور دوم تنظیم کنندهٔ رشد TDZ در دو سطح بود (۳۵). تجزیهٔ واریانس (ANOVA) داده‌های بدست آمده با نرم‌افزار SPSS انجام شد و مقایسهٔ میانگین‌ها به روش آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

جدول۱- سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌ی رشد بر حسب میلی گرم بر لیتر

شماره تیمار تنظیم کننده رشد	2,4-D	TDZ
۱	۵	۵
۲	۱۰	۵
۳	۵	۱۰
۴	۱۰	۱۰

نتایج

اولین نشانه‌های تمایززدایی به سمت تولید کالوس، به صورت تورم‌هایی به رنگ زرد روی سطح ریزنمونه‌ها، ۱۰ روز بعد از کشت و نگهداری در شرایط تاریکی اولیه مشاهده شد، که به مرور زمان بعد از ۲ تا ۸ هفته به کالوس‌های سفید مایل به زرد روشن و شفافی تمایز یافت.



شکل ۱- محدوده رأس ساقه، مریستم رأسی و برش طولی آن در نخل خرما، رقم استعمران.

تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده از این آزمایش (جدول ۲) نشان داد که بین دو سطح اکسین 2,4-D (mgl^{-1}) ۱۰[1] و ۵ (mgl^{-1}) و نیز دو سطح سیتوکینین TDZ (mgl^{-1}) ۱۰[1] و ۵ (mgl^{-1}) تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، اما اثر متقابل مورد بررسی معنی‌دار بود ($P\leq$۰/۰۵).

مقایسه میانگین داده‌های کالوس‌زایی با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ (جدول ۲ و شکل ۲) نشان داد که بالاترین میزان کالوس‌زایی، اما با کیفیت کم (از لحاظ خصوصیات تعریف شده برای کالوس‌های جنین‌زا) در تیمار (۵ (mgl^{-1}) 2,4-D + ۱۰ (mgl^{-1}) TDZ که سیتوکینین دو برابر اکسین بود به‌دست آمد (شکل ۳- الف). در تیمار اکسین دو برابر سیتوکینین (۱۰(mgl^{-1}) 2,4-D + ۵ (mgl^{-1}) TDZ تولید کالوس به نسبت بالا و با کیفیت، برای جنین-زایی (سفید رنگ با سطح صاف) مشاهده شد (شکل ۳- ب).

پس از انتقال به محیط کشت القاء جنین، پاسخ‌دهی ابتدا با دانه دانه شدن سطح کالوس، سپس متراکم و فشرده شدن سلول‌ها و در نهایت تولید جنین کروی شکل پدیدار شد. طی ۴ هفته بعد از انتقال به محیط القاء جنین (۱۰ تا ۱۲ هفته بعد از کشت اولیه)، مراحل تکامل به سمت جنین

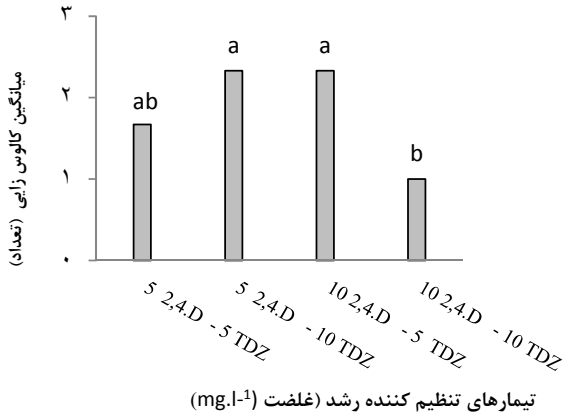
قلبی و کوتیلدونی در زیر استریومیکروسکوپ قابل شناسایی و بررسی بود.

کالوس‌های حاصل از برخی تیمارها مانند (mgl^{-1}) ۵ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۱۰ TDZ و (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۱۰ TDZ با انتقال به محیط کشت القاء جنین، قهوه‌ای شدند (شکل ۴- الف و ب)، اما تیمارهای دیگر، مانند کالوس-های حاصل از (mgl^{-1}) ۵ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۵ TDZ با تغییر رنگ کالوس به زرد روشن، کالوس جنین‌زا تولید نمودند اما مراحل تکامل جنین را طی نکردند (شکل ۴- پ).

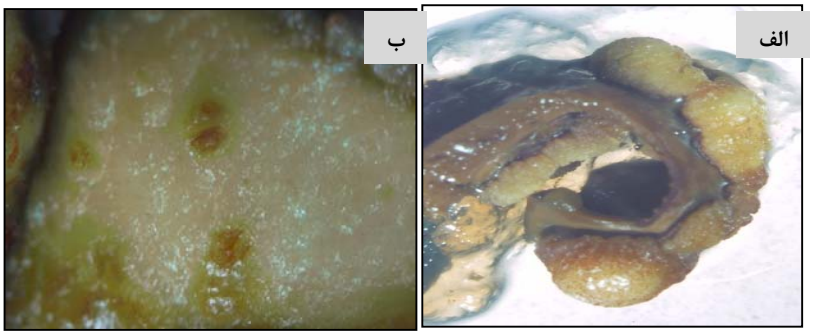
جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر 2,4-D و TDZ بر روی کالوس‌زایی در کشت مریستم رأسی نخل خرما، رقم استعمران.

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
		کالوس‌زایی
(a)2,4-D	۱	۰/۳۳۳^{ns}
(b)TDZ	۱	۰/۳۳۳ ^{ns}
(b × a) TDZ ×2,4-D	۱	۳/۰۰۰ *
خطای آزمایش	۸	۰/۵۰۰
ضریب تغییرات (درصد)		۳۸/۵

*- معنی دار در سطح احتمال ۵٪



شکل ۲- مقایسه‌ی میانگین تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده‌ی رشد 2,4-D و TDZ بر کالوس‌زایی مریستم رأسی نخل خرما، رقم استعمران با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۳- تأثیر تنظیم کننده‌های رشد2,4-D و TDZ، بر القاء کالوس در مریستم رأسی نخل خرما، رقم استعمران. الف، تشکیل کالوس جنین‌زا با کیفیت کم در تیمار (mgl^{-1}) ۵ 2,4-D +(mgl^{-1})۱۰ TDZ . ب، تشکیل کالوس جنین‌زا با کیفیت بالا در تیمار (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۵ TDZ.

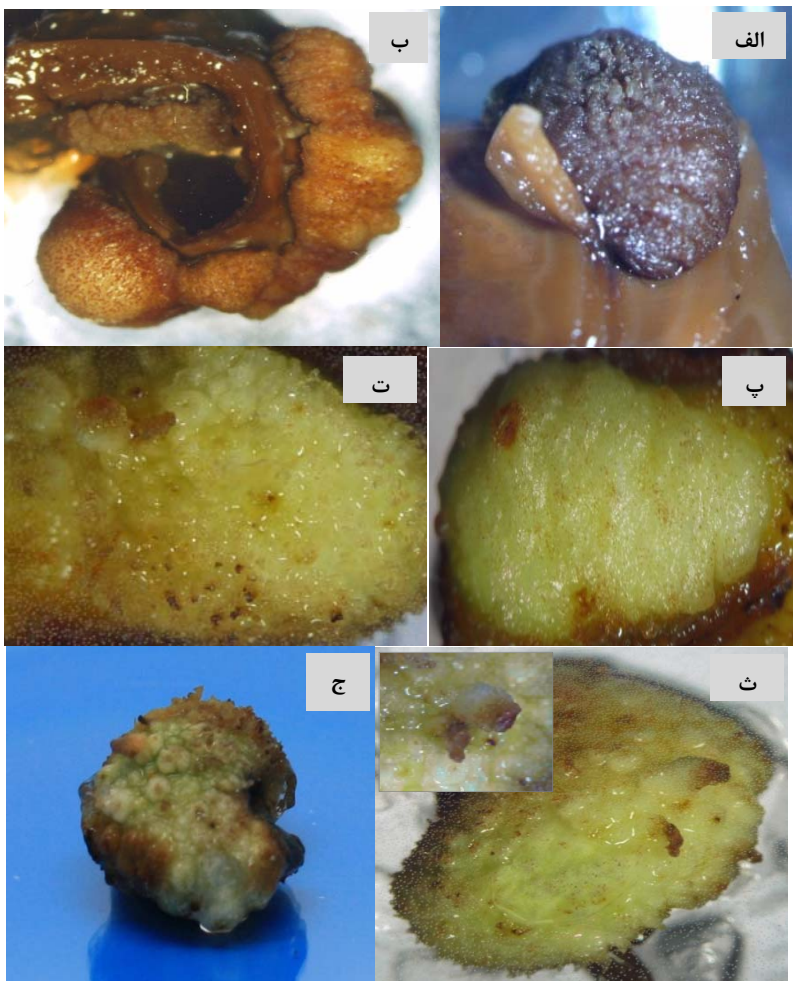
بر اساس این مشاهدات، کالوس‌هایی که تحت تیمار (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۵ TDZ تشکیل شده بودند، دارای بهترین جنین‌زایی بودند (شکل ۴- ت).

جدول ۳- تیمارهای محیط القاء کالوس (mgl^{-1}) و کیفیت تولید کالوس جنین‌زا، از مریستم رأسی نخل خرما، رقم استعمران.

2,4-D	۵	۱۰	۵	۱۰
TDZ	۵	۵	۱۰	۱۰
کیفیت کالوس‌زایی	۳	۴	۱	۲

رتبه بندی کیفیت تولید کالوس جنین‌زا: ۱- ضعیف، ۲- خوب، ۳- متوسط، ۴- عالی (۳۵).

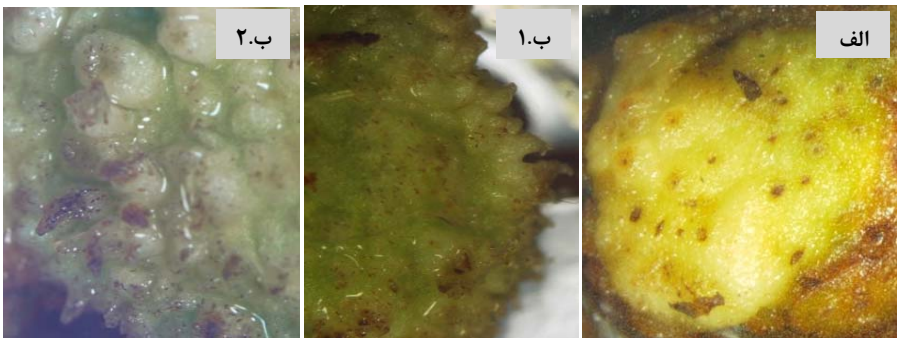
به‌طورکلی دو نوع کالوس قابل تشخیص است: کالوس جنین‌زا که دارای ساختاری گره دار و فشرده هستند و دارای رشد آهسته‌تر بوده و توانایی ایجاد جنین تحت شرایط مناسب را دارند وکالوس غیرجنین‌زا که ساختاری کلوخه‌ای و ترد و شکننده دارند و اندازه آنها بسیار بزرگتر از کالوس های جنین‌زا می‌باشد و قادر به ایجاد جنین رویشی نمی‌باشند (۵).



شکل ۴- چگونگی جنین‌زایی در محیط کشت پایه MS، حاصل از کالوس‌های مریستم رأسی نخل خرما، رقم استعمران. الف و ب، قهوه‌ای شدن کالوس در تیمار (mgl^{-1}) ۵ 2,4-D +(mgl^{-1}) ۱۰ TDZ و (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۱۰ TDZ. پ، تولید کالوس جنین‌زا در تیمار (mgl^{-1}) ۵ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۵ TDZ. ت، القاء و تشکیل جنین در تیمار (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۵ TDZ. ث، تکامل جنین‌ها تا مرحله کتیلدونی در محیط کشت پایه MS دارای (mgl^{-1}) ۲۰ ساکارز بعد از دو ماه. ج، قهوه‌ای شدن جنین‌ها با ادامه واکشت در محیط کشت پایه MS دارای (mgl^{-1}) ۲۰ ساکارز بعد از ۳ ماه.

در این آزمایش از این لحاظ هر دو نوع کالوس مشاهده شد. کالوس غیر جنین‌زا در تیماری با دو برابر غلظت سیتوکینین به اکسین و کالوس جنین‌زا در تیمار اکسین دو برابر سیتوکینین (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۵ TDZ که کالوسی سفید رنگ با سطح صاف همچنین با حداکثر میزان پاسخ‌دهی بود، مشاهده شد.

پس از انتقال کالوس‌های تولیدی به محیط کشت القاء جنین، دو نوع جنین سوماتیکی از لحاظ مورفولوژی تمایز یافت. در برخی از تیمارها (مانند تیمار (mgl^{-1}) ۵ 2,4-D +(mgl^{-1}) ۵ TDZ، شکل ۴- پ)، تورم‌های کروی دارای مراکز قهوه‌ای رنگ، روی سطح کالوس تولید کردند، این جنین‌ها در مرحله کروی باقی ماندند و به‌تدریج از بین رفتند (شکل ۵- الف). در تعدادی از تیمارها (مانند تیمار (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4-D + (mgl^{-1}) ۵ TDZ، شکل ۴- ت)، کالوس‌های حاصل با انتقال به محیط جنین‌زایی تورم‌های شاخی شکل تولید کردند، که پس از چندی از انتها به فرم کروی، قلبی و کوتیلدونی (اژدری) تکامل یافتند (شکل ۵- ب).



شکل ۵- کیفیت جنین‌های تولید شده در محیط کشت پایه MS، حاصل از کالوس‌های مریستم رأسی نخل خرما، رقم استعمران. الف، القاء تورم‌های کروی با مراکز قهوه‌ای رنگ، که مراحل تکامل جنین را طی نکردند. ب ۱. و ب ۲، القاء تورم‌های شاخی شکل، که جنین سوماتیکی تولید کردند.

جنین‌های تولید شده بعد از یک ماه، پرورش در محیط کشت پایه MS حاوی (gl^{-1}) ۴۰ ساکارز به محیط کشت پایه MS دارای (gl^{-1}) ۲۰ ساکارز منتقل شدند. کاهش مقدار ساکارز در ابتدا منجر به تکامل بیشتر جنین‌های سوماتیکی تا مرحله کوتیلدونی شد و بعد از ۲ ماه اندکی تغییر رنگ به سبز روشن مشاهده شد (شکل ۴- ث)، اما با ادامه واکشت در محیط کشت با ساکارز (gl^{-1}) ۲۰ جنین‌ها قهوه‌ای شده و ۳ ماه بعد از جابه‌جایی از بین رفتند (شکل ۴- ج).

بحث

بعد از قرار دادن ریزنمونه‌ها روی محیط کشت، قهوه‌ای شدن و خروج ممانعت کننده‌های رشدی از آنها به محیط کشت مشاهده می‌شود. قهوه‌ای شدن بافت در مجاورت محیط کشت، به علت اکسیداسیون پلی‌فنول‌ها و تشکیل کوئینین‌ها می‌باشد، که برای ریزنمونه‌ها کشنده است (۴۳). مشخص شده که سیتریک اسید، آسکوربیک اسید و زغال فعال در تعامل مثبت با هم بوده و اثر مثبت بر زنده ماندن ریزنمونه‌ها دارند. آسکوربیک اسید به‌عنوان ممانعت کننده از اکسیداسیون فنول‌ها عمل کرده و کوئینین تشکیل شده را خارج می‌کند (۳) . احتمالا سیتریک اسید به‌عنوان عامل کلاته کننده عمل کرده و تخریب آسکوربیک اسید را به تأخیر می‌اندازد (۲۳). اثرات مثبت زغال فعال، در از بین بردن ترکیبات مهارکننده است، همچنین باعث کاهش شدید اکسیداسیون فنول‌ها می‌شود. استفاده از (gl^{-1})۰/۳ زغال فعال باعث افزایش قدرت زیست ریزنمونه‌ها در برگ نابالغ خرما (۲۹) و افزایش اثر اکسین در محیط و تغییر خواص محیط در جهت کاهش جذب تنظیم‌کننده-

های رشد و دیگر ترکیبات می‌شود (۲۲). در مطالعه دیگری کاربرد (gl^{-1}) ۳ زغال فعال در محیط کشت، فقط منجر به کاهش اکسیداسیون فنول‌ها شد (۳۴). در این مطالعه نیز استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانت و زغال فعال منجر به سالم ماندن مریستم ها و عدم ترشح ترکیبات فنولیک در آنها شد.

اولین نشانه‌های تمایززایی به سمت تولید کالوس، به صورت نواحی تیره‌تر، ۱۰ روز بعد از کشت اولیه مشاهده شد، که به مرور زمان بعد از ۲ هفته به کالوس‌های سفید و شفافی تمایز یافت. پس از انتقال به محیط القاء جنین، کالوس‌ها ظاهری دانه دانه پیدا کرده و سلول‌های آن متراکم، فشرده و به رنگ زرد متمایل شدند. ۴ هفته بعد مراحل اولیه جنین‌زایی به‌صورت تورم‌های کروی با مراکز قهوه‌ای نمایان شد. از ۱۲ تا ۱۶ هفته بعد از کشت اولیه، مراحل تکامل به سمت جنین قلبی و اژدری در زیر بینوکولر قابل شناسایی و بررسی بود. در مطالعه روی رأس ساقه خرما رقم Dhakki، بعد از ۱ هفته بافت متورم شده و بعد از ۲ هفته افزایش اندازه پیدا کرد. القاء کالوس از هفته ۳ شروع و در هفته ۵ تکمیل شد (۲۳). در مطالعات دیگری روی برگ‌های جوان، نتایج مشابهی به‌دست آمد (رقم Ahmar در مطالعات Gueye و همکاران (۲۰۰۹) و رقم DegletBey در پژوهش‌های Fki و همکاران (۲۰۰۳) (۱۸، ۱۷). در این پژوهش مدت زمان القاء تا تشکیل کالوس به ۲ هفته کاهش یافته است و در هفته چهارم از کشت جنین‌های سوماتیکی متمایز شدند. دلیل این کاهش مدت زمان پاسخ‌دهی، علاوه بر تفاوت‌های ژنتیکی ناشی از نوع رقم، به تنظیم‌کنندهای رشدی استفاده شده در این پژوهش نیز وابسته است. TDZ باعث افزایش انباشتگی و سنتز سیتوکینین‌های پورینی شده و تبدیل آدنین به آدنوزین را افزایش می‌دهد (۱۳). مشخص شد که TDZ ظرفیت دوگانه‌ای در القاء جنین سوماتیکی دارد، فعالیت شبه سیتوکینی آن تقسیم سلولی را افزایش می‌دهد و کمی فعالیت شبه اکسینی دارد، که به‌نظر می‌رسد برای القاء جنین بسیار مهم است (۴۲).

طبق بررسی‌های انجام شده، استفاده از TDZ با غلظت (mgl^{-1}) ۱۰ در هر دو سطح 2,4-D، کیفیت تولید کالوس جنین‌زا را کاهش داد، همچنین کالوس‌های تولید شده در این تیمارها با انتقال به محیط جنین‌زایی در اثر افزایش ترشحات فنولیک از بین رفتند. تولید حداکثری کالوس با استفاده از غلظت دو برابری 2,4-D نسبت به TDZ و کاهش آن همراه با افزایش غلظت بکار رفته از TDZ در مطالعات Sidky و Zaid (۲۰۱۱) نیز همانند این پژوهش مشاهده شده است (۳۵). اکسین 2,4-D (در غلظت‌های (mgl^{-1}) ۵ یا بیشتر) مناسبترین تنظیم کنندهٔ رشد برای انگیزش کالوس‌زایی در نخل خرماست (۱۵، ۳۶).

از اکسین‌ها به تنهایی یا همراه با سایر سیتوکینین‌ها در القای جنین‌زایی در خرما استفاده شده است (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۳۷، ۴۱، ۴۵). به نظر می‌رسد سطوح کمتر 2,4-D استفاده شده در محیط کالوس‌زایی، به القای جنین در کالوس‌ها کمک کرده است (۳۶). بر اساس مطالعات Norgaard و Krogstrup (۱۹۹۱)، 2,4-D فقط در مرحله انگیزش جنین‌زایی لازم است و در بعضی موارد، 2,4-D و دیگر اکسین‌ها مانع از جنین‌زایی سوماتیکی خواهند شد (۲۸). همچنین McClintock (۱۹۸۴) گزارش داد که افزایش غلظت 2,4-D در محیط کشت، باعث افزوده شدن تنوع سوماکلونال در انگور (*Vice versa*) می‌شود (۲۵). از آنجا که یکی از مشکلات تکثیر کشت بافتی خرما، بروز تنوع سوماکلونال در گیاهچه‌های حاصل می‌باشد (۳۳)، پس در این پژوهش محیط کشت کالوس‌زایی حاوی حداقل اکسین و سیتوکینین بکار رفت و محیط کشت القای جنین فاقد تنظیم کنندهٔ رشد بود، تا از اثرات منفی حضور اکسین فنوکسی 2,4-D که محرکی قوی در القاء کالوس می‌باشد، جلوگیری شده و احتمال ایجاد تنوع سوماکلونال در نتاج کشت بافتی خرما کاهش یابد.

نوع منابع کربوهیدرات و همچنین غلظت آنها روی توانایی سلول‌ها برای القای جنین‌زایی سوماتیکی و تکامل آنها مؤثر است (۴۰، ۲۰). مطابق نتایج بدست آمده از کاهش مقدار ساکارز مصرفی برای تکامل جنین‌های تولیدی، به نظر می‌رسد در محیط القای جنین، وجود فشار اسمزی ناشی از غلظت بالای ساکارز، ابتدا باعث افزایش غلظت مواد درون سلولی و بهبود جنین‌زایی شده است، اما در ادامه به علت تجمع مواد قندی زیاد در سلول‌ها و جذب آب بیشتر، توانایی جنین‌زایی کاهش یافته است. Veramendi و Novarro (۱۹۹۶) در مطالعات خود روی تأثیر شرایط فیزیکی محیط کشت و غلظت ساکارز بر جنین‌زایی سوماتیکی نخل خرما، با اذعان بر اینکه شرایط فیزیکی محیط کشت، غلظت و گرسنگی ساکارز از عوامل مهم در تکامل جنین است، نتیجه گرفتند که بهترین شرایط برای تکامل جنین در محیط کشت مایع (تکان در rpm ۱۰۰ برای ۲ هفته) و بدون ساکارز می‌باشد (۴۱). در نتیجه برای تکامل جنین‌ها از کاهش مقدار ساکارز مصرفی استفاده شد، که تنها در تمایز جنین‌ها تا مرحله کوتیلدونی مؤثر بود. لذا پیشنهاد می‌شود که با استفاده از مواد اسمزا مانند سوربیتول این روند را حفظ نمود و جنین‌زایی در کالوس‌ها را افزایش داد، همان طور که Hassan و Taha (۲۰۱۲) نشان دادند در طول مرحله تکثیر و جوانه‌زنی جنین سوماتیکی حاصل از مریستم رأسی نخل خرما، بالاترین تعداد جنین‌های جوانه‌زده با استفاده از (gl^{-1}) ۱۹/۲ ساکارز + (gl^{-1}) ۳۸/۴ سوربیتول به دست می‌آید (۱۹).

نتایج این تحقیق بیانگر تأثیر غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در القاء کالوس، تشکیل کالوس جنین‌زا از مریستم رأس ساقه پاجوش استعمران و تسریع تشکیل کالوس جنین‌زا بود و بهترین ترکیب (mgl^{-1}) ۱۰ 2,4.D همراه با (mgl^{-1}) ۵ TDZ برای جنین زایی در این رقم بود. همچنین مشخص شد که میزان تولید کالوس جنین‌زا و مدت زمان لازم برای سپری شدن این فرایند تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت شامل مقدار زغال فعال، حضور آسکوربیک و سیتریک اسید و همچنین نوع تنظیم‌کننده‌های رشدی اضافه شده می‌باشد. برای القای جنین‌زایی و ایجاد تمایز به جنین کوتیلدونی می‌توان از محیط کشت فاقد تنظیم‌کنندهٔ رشد و نیز کاهش مقدار منبع کربن استفاده کرد.

منابع

۱- حبشی، ع. الف.، موسوی، الف.، کاویانی، م.، خوشکام، ص. و رستمی، ع.، ۱۳۸۵. ریزازدیادی خرما از طریق جنین‌زایی رویشی. مجله‌ی علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۲ (۴۶): ۷.

۲- حسینی، م.، هوتن، ت.، ۱۳۸۶. مطالعه بازار جهانی خرما و بازارهای هدف خرمای صادراتی ایران. مجله اقتصاد کشاورزی و توسعه، ویژهٔ بازارهای کشاورزی، ۱۵(۵۷).

۳- دانشمند، ف.، ۱۳۹۳. تاثیر آسکوربیک اسید در کاهش تنش اکسیداتیو حاصل از تنش شوری در سیب زمینی. مجله پژوهش های گیاهی، دوره ۲۷ (۳)، ۴۲۶-۴۱۷.

۴- دانایی، الف.، موسوی، الف.، فراهانی، ف.، دهسرا، ب. و ضعیفی‌زاده، م.، ۱۳۸۸. بررسی اثرات ژنوتیپ و سیتوکینین‌ها بر تولید کالوس جنین‌زا در نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.). مجله‌ی ژنتیک نوین، ۴ (۳): ۷۰-۶۳.

۵- گردکانه م. ارجی ع.، ۱۳۹۳ اثر NAA و ریزنمونه اندام های مختلف بر جنین زائی ثانویه توت فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch.). مجله پژوهش های گیاهی، ۲۷ (۳) ، ۵۱۰-۵۰۱.

۶- ناظری، س.، خوشکام، ص.، افشاری، م.، مدیری، م.، شکیب، ع. و مجیدی، الف.، ۱۳۷۱. تولید جنین رویشی در ارقام خرمای استعمران و کبکاب در شرایط کنترل شده. مجله‌ی تحقیقات کشاورزی نهال و بذر، ۸ (۳ و ۴): ۲۰-۱۶.

7- Al-khateeb, A. A., 2006. Role of cytokinin and auxin on the multiplication stage of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Sukry. Biotechnology, 5: 349-352.

8- Al-Khateeb, A., 2008. Comparison effects of sucrose and date palm syrup on somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). American Journal of BiochemistryandBiotechnology,4: 19-23.

9- Aslam, J., Khan, S. A., Cheruth, A. J., Mujib, A., Sharma, M. P., and Srivastava, P. S., 2011. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar. Saudi Journal of Biological Sciences, 18: 369–380.

10- Beauchesne, G., 1983. Vegetative propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by *in vitro* culture. In: Proc of first symposium on date palm, Hofuf, Saudi Arabia: 698–699.

11- Beauchesne, G., Zaid, A., and Rhiss, A.,1986. Meristimatic potentialities of bottom of young leaves to rapidly propagate date palm. Second Symposium. Date Palm, 3-6 March, Saudi Arabia.

12- Bhargava, S. C., Saxena, S. N., and Sharma, R., 2003. *In vitro* multiplication of *Phoenix dactylifera* L. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 12: 43-47.

13- Cupelle, S. C., Mor, D. W. S., Kirschnet, S. C., and Mok, M. C., 1983. Effect of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N6-(A2-isopentenyl) [18-c14) adensine incallus tissues of *Phascolus* L. Plant Physiology, 73: 696-802.

14- Daquin, F., Letouze, R., 1988. Regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by somatic embryogenesis, improved effectiveness by dipping in a stirred liquid medium. Fruits, 43:191–194.

15- El-Hadrami, I. and Baaziz, M., 1995. Somatic embryogenesis and analysis of peroxydases in *Phoenix dactilifera* L. Biology Plant, 37: 179-203.

16- Eshraghi, P., Zarghami, R., Mirabdulbaghi, M., 2005. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. African Journal of Biotechnology, 4 (11): 1309-1312.

17- Fki, L., Masmoudi, R. Drira, N., and Rival, A., 2003. An optimized protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. DegletNour. Plant Cell Reports, 21: 517-524.

18- Gueye, B., Morcillo, F., Collin, M., Gargani, D., Overvoorde, P., Bertossi, F. A., Taranbargar, T. J., Sane, D., Tregear, J. W., Borgell, A., and Verdeil, J. L., 2009. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 99: 35-45.

19- Hassan, M. M., and Taha, R. A., 2012. Callogensis, somatic embryogenesis and regeneration of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cultivars affected by carbohydrate sourees. International Journal of Agricultural Research, 7(5): 23- 242.

20- Iraqui, D. and Tremblay, F. M., 2001. The role of sucrose during maturation of black spruce (*Piceamariana*) and white spruce (*Piceaglauca*) somatic embryos. Physiology Plant, 111: 381-388.

21- Junaid, A., Khan, S. A., 2009. *In vitro* micropropagation of Khalasah date palm (*Phoenix dactylifera* L.). An important fruit plant. Journal of Fruitand Ornamental Plant Research, 17: 5–17.

22- Khan, S., Saeed, B., and Kauser, N., 2011. Establishment of genetic fidelity of *in vitro* raised banana plantlets. Pakistan Journal of Botany, 43(1): 233-242.

23- Khan, S., and Bi Bi, T., 2012. Direct shoot regeneration system for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) CV. Dhakki as a means of micropropagation. Pakistan Journal of Botany, 44: 1965-1971.

24- Mater, A. A., 1983. Plant regeneration from callus culture of (*Phoenix dactylifera* L.). Date Palm Journal, 1 (2): 57-77.

25- McClintock, B., 1984. The significance of responses of the genome to challenge. Science, 226: 792–801.

26- Mohseni, Y., 2012. Characteristics and types of dates in Khuzestan. Available at http://www.abadandates.com/post/8, Accessed Sep 7, 2012.

27- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15: 473-497.

28- Norgaard, J. V., and Krogstrup, P., 1991. Cytokinin induced somatic embryogensis from immature embryos of *Abies nord maniana* LK. Plant Cell Reports,9: 509-513.

29- Othmani, A., Bayoudh, C., Drira, N., and Trifi, M., 2009. *In vitro* cloning of date palm *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Bey by using embryogenic suspension and temporary

immersion bioreactor (TIB). Journal of Biotechnology and Biotechnological Equipment, 23: 1181-1185.

30- Rashid, H., and Quraishi. A., 1994. Micropropagation of date palm through tissue culture. Pakistan Journal of Agricultural Research,15: 1-7.

31- Rhiss, A., Poulain, C., Beauchesne, G., 1979. La culture *in vitro* appliqué ala multiplication vegetative du palmierdattier (*Phoenix dactylifera* L.). Fruits, 34: 551–554.

32- 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.

33- Saker, M., Adawy, S., Mohamed, A., and El-Itriby, H., 2006. Monitoring of cultivar identity in tissue culture-derived date palms using RAPD and AFLP analysis. Biology Plant, 50: 198-204.

34- Sharma, D. R., Dawra, S., and Chowdhury, J. B., 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm cv. Khadrawy through tissue culture. Ind. The Journal of Experimental Biology, 22: 596-598.

35- Sidky, R. A., and Zaid, Z. E., 2011. Direct production of somatic embryos and plant regeneration using TDZ and CPPU of date palm (*Phoenix dactylifere L.*). International Journal of Academic Research, 3:792.

36- Tisserat, B., 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. Journal of Experimental Botany, 30:1275–1283.

37- Tisserat, B., 1982. Factors involved in the production of plantlets from date palm callus cultures. Kluwer Academic Pub., Dordrecht, Euphytica, 31: 201-214.

38- Tissert, B., 1984. Propagation of date palm by shoot tip cultures. Horticultural Science, 19: 230-231.

39- Tisserat, B., and Demason, D. A., 1980. A histological study of development of adventive's embryos in organ culture of *Phoenix dactylifera* L. Annals of Botany, 46:465-472.

40- Tokuhara, K., and Mii, M., 2003. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybeen somatic embryo germination and conversion. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 64: 55-62.

41- 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.

42- Victor, J. M. R., Murch, S. J., Krishna, R. S., and Saxena, P. K., 1999. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N.6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. Plant Growth Regulator, 28(1): 9-15.

43- Zaid, A., 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm culture-a review. Acta Horticultural Culture, 212: 561-566.

44- Zaid, A. and Tisserat, B., 1983. Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explants tissue of date palm. Botanical Magazine, 96: 67-73

45- Zouine, J., and Hadrami, I., 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. Biotechnology, 3(2): 114-118.

The optimizedprotocol for somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) CV. Estameran

Baharan E.[1], Mohammadi P.P.[1] and Shahbazi E.[2]

[1] Plant Production and Genetics Dept., Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Ahwaz, I.R. of Iran

[2] Plant Breeding and Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Shahre-kord University, Shahre-kord, I.R. of Iran

Abstract

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) production was increased impressively in Iran during 1990 decade. But for some reasons, there are possibility of withdrawing from the world market cycle, such as old groves and use of traditional methods of planting and harvest dates. This study, in order to localize commercial tissue culture propagation dates, on shoot tip explants in Murashige and Skoog (1962) culture medium, supplemented with plant growth regulators including of thidiazuron (TDZ) and 2.4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4.D), at 2 concentrations (5 and 10 mgl^{-1}), via factorial completely randomized design in 3 replicates. In treatment with 5 (mgl^{-1}) TDZ and 2,4-D 10 (mgl^{-1}) were observed the highest levels of embryogenic callus. Maximum embryo induction and differentiation to somatic embryos was occurred in MS medium with decreased carbon source to 20 mgl^{-1} in 10 (mgl^{-1}) 2,4-D with 5 (mgl^{-1}) TDZ, treatment. In this study, the time of induction up to formation of callus, was reduced in two weeks and in the fourth week were distinct somatic embryos. Result suggested that a low content of 2,4-D and TDZ plant growth regulators in the medium had a positive effect to reduce the duration of embryogenesity and may decrease somalonal variation in date palm micropropagation.

Key words: Date palm, Shoot tip, Somatic embryogenesis, Callugenesis.