Callus and somatic embryo induction in date palm cv. Khazravi using leaves, immature fruit and endosperm explants

Fateme Farhadi Kolahkaj, Payam Pour Mohammadi*, Mohammad Farkhari, Khalil Alami Saied
Department of Plant Production and Genetic, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Khuzestan, Iran

Abstract
The purpose of this study was to check the possibility of callus and somatic embryogenesis in date palm cv. Khazravi using different explants including leaves, green fruit, immature seed, endosperm and green fruit pericarp. In the culture of leaves in the medium contains different plant growth regulators including 2,4-D, BAP and TDZ, highest callus induction was achieved in medium supplemented with, 5 mg.L-1 2,4-D, 2 mg.L-1 BAP and 4 mg.L-1 TDZ, and in treatment with 5 mg.L-1 2,4-D, 1 mg.L-1 BAP and 4 mg.L-1 TDZ. By using explant of immature fruit, found that when two growths regulative, TDZ and 2, 4-D in amount of 5 mg.L-1 are in the culture medium callugenesis and embryogenesis was achieved. The endosperm cultivation with pericarp and embryo in the same medium showed that the presence of two growth regulators 2,4-D and TDZ have been useful for callus production. Also in endosperm with zygotic embryo culture, embryo development and the root and shoot were formed after three months. Endosperm culture, in the culture medium containing various auxins and pericarp culture showed no any reactions. In general, these results showed that in date palm cv. Khazravi, treating the explants of leave and immature fruits with appropriate concentrations of plant growth regulators auxin and cytokinin, can induce callus and embryo.

Keywords: Date palm; auxin; cytokinin; callogenesis; somatic embryogenesis.

* Corresponding Author: Mohammadi@ramin.ac.ir

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دهم، شمارهٔ سی و ششم، تابستان ۱۳۹۷، صفحهٔ ۸۹-۱۰۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۲۴
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۰۳/۲۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۷/۰۷

القای کالوس و جنین سوماتیک در کشت درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های برگ، میوهٔ نارس و آندوسپرم نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) رقم خضراوی

فاطمه فرهادی کلاه کج، پیام پورمحمدی*، محمد فرخاری، خلیل عالمی سعید
گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، امکان کالوس‌زایی و جنین‌زایی سوماتیک در نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) رقم خضراوی از ریزنمونهٔ برگ بالغ و نارس، میوهٔ نارس، بذر نارس، آندوسپرم و پریکارپ میوهٔ نارس بررسی شد. در کشت برگ، کالوس در محیط‌کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد با ترکیب تیماری ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین (BAP) با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون (TDZ) با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر در لبهٔ خارجی ریزنمونه‌های برگی؛ با ترکیب تیماری 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر در لبهٔ خارجی ریزنمونه‌های برگی و با ترکیب تیماری 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم در کناره‌های رگبرگ ریزنمونه تشکیل شد. با ریزنمونهٔ میوهٔ نارس در محیط‌کشت مشابه، زمانی‌که دو تنظیم‌کنندهٔ رشد تیدیازورون و 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط‌کشت موجود باشند، کالوس‌زایی و جنین‌زایی رخ می‌دهد. کشت ریزنمونه‌های آندوسپرم با جنین و پریکارپ رقم خضراوی در محیط‌کشت مشابه نیز نشان داد وجود 2,4-D و تیدیازورون با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر برای کالوس‌زایی مفید است. همچنین در کشت آندوسپرم با جنین، جنین‌ها رشد یافتند و ابتدا ریشه‌چه و پس از سه ماه ساقه‌چه مشاهده شد؛ اما در کشت آندوسپرم و کشت پریکارپ میوه در این محیط‌کشت هیچ واکنشی مشاهده نشد. درمجموع، نتایج نشان دادند با کشت ریزنمونه‌های برگ و میوهٔ نارس و نیز استفاده از مقدار مناسب تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی و سیتوکینینی، کالوس و جنین سوماتیک نخل خرما رقم خضراوی به دست می‌آیند.

واژه‌های کلیدی: اکسین، جنین‌زایی سوماتیک، سیتوکینین، کالوس‌زایی، نخل خرما

* نگارندهٔ مسئول: نشانی پست الکترونیک: Mohammadi@ramin.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۶۱۳۶۵۲۲۴۲۴

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) به‌دلیل سازگاری و تحمل طبیعی زیاد با شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی، شوری و درجه حرارت زیاد نقش اقتصادی و اجتماعی مهمی در مناطق بیابانی خاورمیانه و شمال آفریقا دارد (Bakheet *et al*, 2008)؛ به‌طوری‌که تقریباً ۹۵ درصد از خرمای جهان در خاورمیانه تولید می‌شود (Aslam *et al*., 2011). تکثیر خرما با روش‌های جنسی و رویشی است که تکثیر رویشی با پاجوش و تکثیر جنسی آن با بذر انجام می‌شود. در گیاهان تکثیرشده با روش رویشی، بیماری‌های متعددی مانند بیماری‌های باکتریایی، قارچی، ویروسی و مایکوپلاسمایی تجمع می‌یابد که بهره‌وری را کاهش می‌دهد (Al-Khayri, 2001). همچنین هر درخت تعداد بسیار کمی پاجوش (۳ تا ۸ عدد) در مدت زندگی خود تولید می‌کند و برخی از ژنوتیپ‌ها پاجوش تولید نمی‌کنند و پاجوش‌ها مشکلاتی مانند تشکیل‌نشدن ریشه خواهند داشت. تکثیر با بذر نیز محدودیت‌هایی مانند سرعت کم جوانه‌زنی، تنوع در نتاج تولیدی، نیاز به چندین سال برای رسیدن به مرحلهٔ باردهی و تمایزنیافتن درختان نر و ماده از هم تقریباً تا ۵ سال پس از کشت دارد (Chand *et al*, 2004). برای غلبه بر مشکلات تکثیری، حل مشکلات مربوط به هیبریداسیون و حفظ ژرم‌پلاسم، ریزازدیادی در شرایط آزمایشگاهی (جنین‌زایی سوماتیک یا اندام‌زایی) روشی موفقیت‌آمیز است که تکثیر سریع برای تولید تجاری ارقام برگزیده، تکثیر گیاهان باکیفیت و یکسان از لحاظ ژنتیکی، تکثیر در مقیاس وسیع، ذخیره‌کردن طولانی‌مدت (انجماد)، بسته‌بندی، صادرات آسان و سریع، دست‌کاری ژنتیکی، کاهش مدت‌زمان تولید نهال، تولید خارج از فصل و گیاهچه‌های عاری از آلودگی را فراهم می‌کند (Eke, 2005). در کشت‌بافت خرما انتخاب منبع ریزنمونه حساس‌ترین تصمیم است. در پژوهش‌های گذشته علاوه‌بر مریستم رأس ساقه، ریزنمونه‌های مختلفی ازجمله برگ‌های آغازین (Hegazy *et al*., 2009)، برگ‌های جوان پاجوش (Fki *et al*., 2003; Othmani *et al*., 2009)، جوانهٔ جانبی (Sharma *et al*., 1984)، ریشه (Zaid and Tisserat, 1983) و گل‌آذین ماده (Hegazy, 2008) برای کشت‌بافت خرما استفاده شده‌اند. در بسیاری از آزمایشگاه‌های تجاری، نخل خرما با جنین‌زایی از ریزنمونهٔ رأس ساقه تولید می‌شود.

علاوه‌بر نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد به‌ویژه اکسین‌ها و سیتوکنین‌ها برای رشدونمو در شرایط کنترل‌شده بسیار حائز اهمیت هستند. بین تنظیم‌کننده‌های رشد، ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) با غلظت ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌تنهایی یا در ترکیب با سیتوکینین (Kin و 2IP) به محیط کشت‌بافت نخل خرما اضافه می‌شود. در بعضی مواقع 2,4-D با نفتالن استیک اسید (NAA) جایگزین می‌شود (Jain, 2007). استفاده از ریزنمونهٔ مریستم انتهایی و محیط‌کشت‌های با اکسین زیاد بسیاری از مشکلات تکنیکی را ازجمله آلودگی‌های درون‌زای باکتریایی، قهوه‌ای‌شدن، تنوع سوماکلونال و مدت‌زمان طولانی (حدود ۳ سال) برای تولید باعث

می‌شود و این در صورتی انجام‌پذیر است که دستورالعمل شناخته‌شده‌ای وجود داشته باشد (Abul-Soad, 2011).

هدف پژوهش حاضر، تعیین تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف و نوع ریزنمونه بر جنین‌زایی سوماتیک در خرما است. باتوجه‌به اطلاعات نگارندگان تاکنون هیچ مقاله‌ای دربارهٔ کشت میوهٔ نارس و بالغ در نخل خرما گزارش نشده است و نتایج پژوهش حاضر برای نخستین بار گزارش می‌شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ریزنمونه‌ها: در پژوهش حاضر، ریزنمونه‌های مختلف مانند ریزنمونه‌های برگ، میوهٔ نارس و آندوسپرم *P. dactylifera* رقم خضراوی موجود در منبع نگهداری نخل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده شد.

برای تهیهٔ ریزنمونه، برگ‌های سبز درحال‌رشد در مرکز پاجوش از ساقه‌چه جدا و استفاده شدند (شکل ۱- A)؛ سپس ۱ سانتی‌متر از ابتدا و انتهای برگچه‌ها برش داده شد و در اندازهٔ ۱ تا ۲ سانتی‌متر قطعه‌قطعه شدند (شکل۱- B). ریزنمونه‌ها قبل از استریل‌شدن با آب جاری، با چند قطره مایع شوینده به‌مدت ۳۰ دقیقه شستشو و سپس با اتانول ۷۰ درصد اسپری شدند و زیر هود لامینار انتقال یافتند. برای استریل‌کردن ریزنمونه‌ها قطعات برگی در سدیم هیپوکلریت ۵/۲۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از آن ۳ بار به‌مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر اتوکلاوشده شستشو داده شدند؛ سپس برای حذف سلول‌های مرده دوباره ابتدا و انتهای هر قطعه برش داده و در محیط‌کشت‌های تهیه‌شده قرار داده شدند (شکل ۱- C). برگچه‌های نخل از محل رگبرگ میانی خود تا می‌خورند که قبل از کشت باز شدند. ریزنمونه‌ها به‌صورت افقی و همه از سمت پشت برگچه در سه تکرار کشت شدند. در هر تکرار ۲ تا ۳ ریزنمونه کشت شدند و درب شیشه‌های کشت‌شده با پارافیلم مسدود شد تا احتمال آلودگی کاهش یابد و کشت‌ها به اتاق رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و تاریکی مطلق منتقل شدند. در هر تکرار در هفتهٔ یازدهم پس از کشت، تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس تولید کرده بودند یادداشت شدند.

شکل۱- تهیهٔ برگ *P. dactylifera* رقم خضراوی از پاجوش (A)، برش برگ‌ها به قطعاتی با طول ۱ تا ۲ سانتی متر (B) و کشت آنها در محیط‌کشت (C)

در بخش دیگر، آزمایش در دو مرحله با کشت ریزنمونهٔ میوهٔ نارس که مراحل رشد مختلفی داشتند انجام شد. در بخش اول، گل‌آذین مادهٔ تازه لقاح‌یافته برداشت و به قطعاتی با ۲ تا ۳ میوهٔ ریز تقسیم شد (شکل ۳- A) و شستشو به‌مدت ۲۰ دقیقه با آب شهری و با چند قطره مایع شوینده انجام شد؛ سپس میوه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در سدیم هیپوکلریت ۵/۲۵ درصد قرار داده و پس از آن ۳ بار با آب مقطر، استریل و هربار به‌مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. برای بررسی واکنش ریزنمونه‌ها روی محیط‌کشت، آنها روی محیط‌کشت با تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول ۱) قرار گرفتند (شکل ۳- B).

جدول ۱- ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)، بنزیل آمینوپورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) در محیط‌کشت ریزنمونه‌های *P. dactylifera* رقم خضراوی

شمارهٔ تیمار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
2,4-D (mg/L)	۰	۵	۱۰	۰	۵	۱۰	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۵	۱۰
BAP (mg/L)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲	۰	۱	۲	۰	۱	۲	۰	۱	۲	۰	۰
TDZ (mg/L)	۵	۵	۵	۱۰	۱۰	۱۰	۲	۲	۲	۴	۴	۴	۲	۲	۲	۴	۴	۴	۰	۰

در بخش دوم، میوهٔ نارس پس از گذشت یک ماه از زمان نمونه‌برداری اول برداشت (شکل ۵- A) و پس از ضدعفونی‌کردن سطحی با روش ذکرشده، آندوسپرم با جنین در شرایط استریل جدا (شکل ۵- B) و در محیط‌کشت با تنظیم‌کننده‌های رشد (جدول ۱) کشت شدند. در هر تکرار تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس تولید کرده بودند، در هفتهٔ چهارم پس از کشت ریزنمونهٔ میوه و آندوسپرم، یادداشت شدند.

محیط‌کشت و ترکیبات تیماری: محیط‌کشت پایهٔ MS (Murashige and Skoog, 1962) با ترکیب مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)، بنزیل آمینوپورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) (براساس جدول ۱)؛ زغال فعال با غلظت ۱ گرم بر لیتر و آگار با غلظت ۸ گرم بر لیتر تهیه شد. نوع محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد براساس پژوهش‌های Othmani و همکاران (۲۰۰۹) و Al-Khayri و Al-Bahrany (۲۰۰۴) انتخاب شدند. pH محیط‌های کشت با سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید در حدود ۵/۷ تنظیم شد؛ سپس محیط‌های کشت به‌مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد با اتوکلاو (مدل A ۱۲۱، شرکت ایران تولید، ایران) استریل شدند. در محیط‌کشت اولیه برای مقابله با ترکیبات فنلی، آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربیک اسید و سیتریک اسید هریک با غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر به محیط‌کشت اضافه شدند (Khan and Bi Bi, 2012). ازآنجاکه تیدیازورون و آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت به حرارت حساس هستند با فیلتر با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند و پس از اتوکلاو به

محیط‌های کشت اضافه شدند.

تحلیل آماری: همهٔ آزمایش‌ها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی (CRD) در سه تکرار انجام شدند. پس از انجام چندین واکشت در هر آزمایش، نتایج به‌دست‌آمده بررسی شدند. تغییرات مشاهده‌شده به‌صورت تعداد ریزنمونهٔ واکنش‌داده به تعداد کل ریزنمونه‌ها برای هر تکرار از ترکیبات تیماری ثبت شدند و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسهٔ میانگین داده‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن (LSR) در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام شد و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

بین همهٔ ریزنمونه‌های استفاده‌شده تنها کالوس‌زایی از ریزنمونهٔ برگ و ریزنمونهٔ میوهٔ نارس مشاهده شد. در ریزنمونهٔ برگ، تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از تعداد ریزنمونه‌هایی که کالوس تولید کرده بودند در هر تکرار نشان داد بین تیمارهای مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P\leq ۰/۰۵$) (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیهٔ واریانس تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D، تیدیازورون و بنزیل آمینوپورین در کالوس‌زایی از ریزنمونهٔ برگ *P. dactylifera* رقم خضراوی

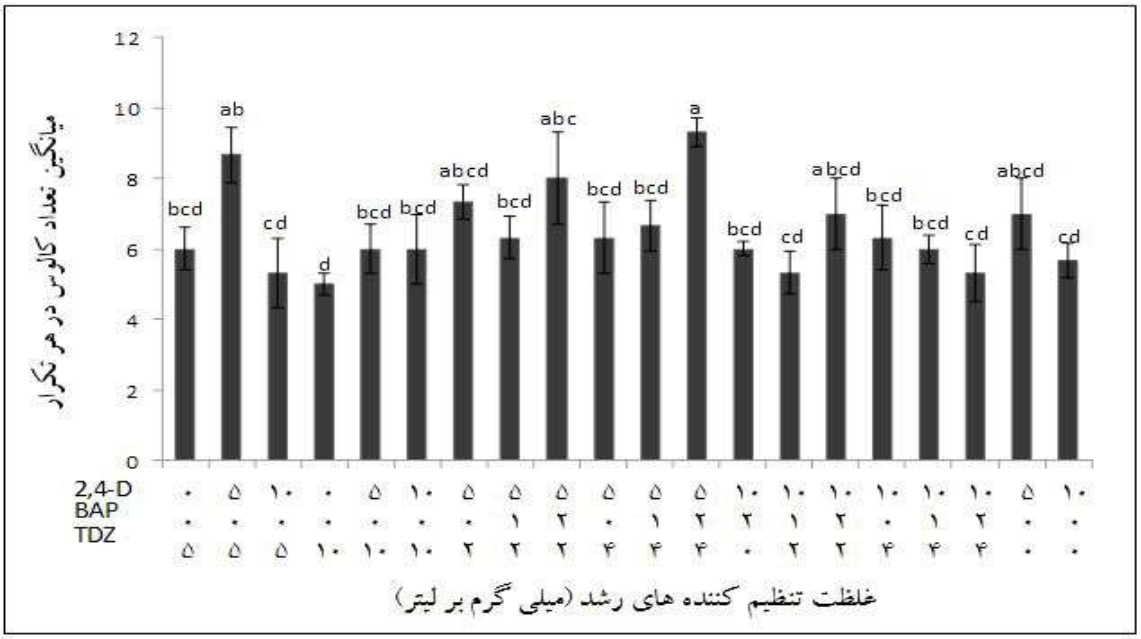
منبع تغییر	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات (MS)
تنظیم‌کنندهٔ رشد	۱۹	۳/۸۷۶*
خطای آزمایش	۴۰	۱/۹۳۳
ضریب تغییرات (درصد)	-	۳۲

* بیان‌کنندهٔ معنی‌داری در سطح $P\leq ۰/۰۵$ است.

مقایسهٔ میانگین (شکل ۲) با آزمون دانکن (Duncan, 1955) در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد بین غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D، بنزیل آمینوپورین و تیدیازورون اختلاف معنی‌داری وجود دارد و با افزایش 2,4-D تا غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر تولید کالوس از ریزنمونهٔ برگی افزایش ولی با افزایش غلظت به ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر دوباره کاهش یافت. همچنین میزان کالوس‌زایی در غلظت صفر 2,4-D کاهش معنی‌داری در مقایسه با سایر غلظت‌ها نشان داد. علاوه‌براین هنگامی‌که غلظت متوسطی از هردو سیتوکینین تیدیازورون و بنزیل آمینوپورین در محیط‌کشت وجود داشت میزان کالوس‌زایی تقویت شد.

در ترکیب تیماری 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر و بنزیل آمینوپورین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر که بیشترین میزان کالوس‌زایی به دست آمد و تودهٔ کالوس زردرنگ و مشخصی تشکیل شد، کالوس‌زایی به‌صورت تورم‌هایی در لبهٔ خارجی ریزنمونه‌ها پدیدار شد. همچنین همهٔ ریزنمونه‌های ترکیب تیماری 2,4-D باغلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر ، تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر و بنزیل آمینوپورین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر، کالوس‌های واضحی در کناره‌های رگبرگ مرکزی ریزنمونهٔ برگی تولید کردند.

در آزمایش تأثیر تیمار تنظیم‌کنندهٔ رشد برکالوس‌زایی میوهٔ نارس نخل خرما ۴ ترکیب تیماری به‌دلیل آلودگی حذف شدند که عبارتند از: ۱- تیدیازورون با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر؛ ۲-



شکل ۲- تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)، بنزیل آمینوپورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) در کالوس‌زایی از ریزنمونهٔ برگ *P. dactylifera* رقم خضراوی- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤۰/۰۵ با آزمون دانکن هستند.

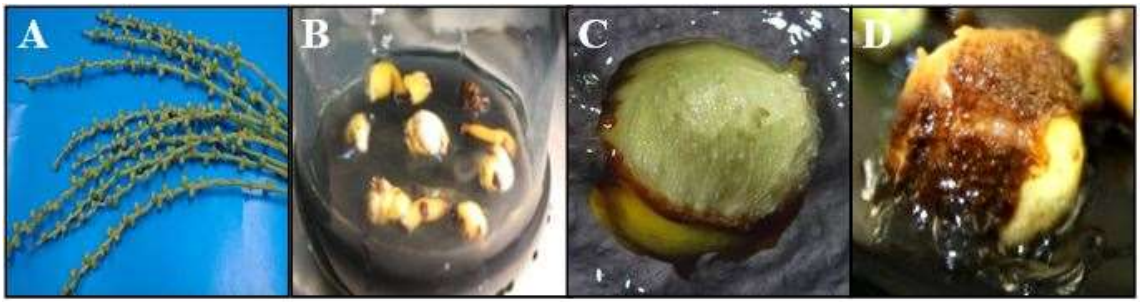
2,4-D با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر؛ ۳- 2,4-D با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر با تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر و ۴- 2,4-D با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر. داده‌های تیمارهای باقیمانده تحلیل شدند. تجزیهٔ واریانس (جدول ۳) داده‌های به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان دادند بین ترکیبات تیماری مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد تفاوت بسیار معنی‌داری وجود دارد.

همچنین براساس مقایسهٔ میانگین انجام‌شده بهترین ترکیب تیماری شامل 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر بود که در آن سه هفته پس از کشت میوه‌های نارس، کالوس مشاهده شد (شکل ۳- C). جنین‌زایی مستقیم روی میوهٔ نارس (شکل ۳- D) نیز در ترکیب تیماری ۱۲ شامل 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۴).

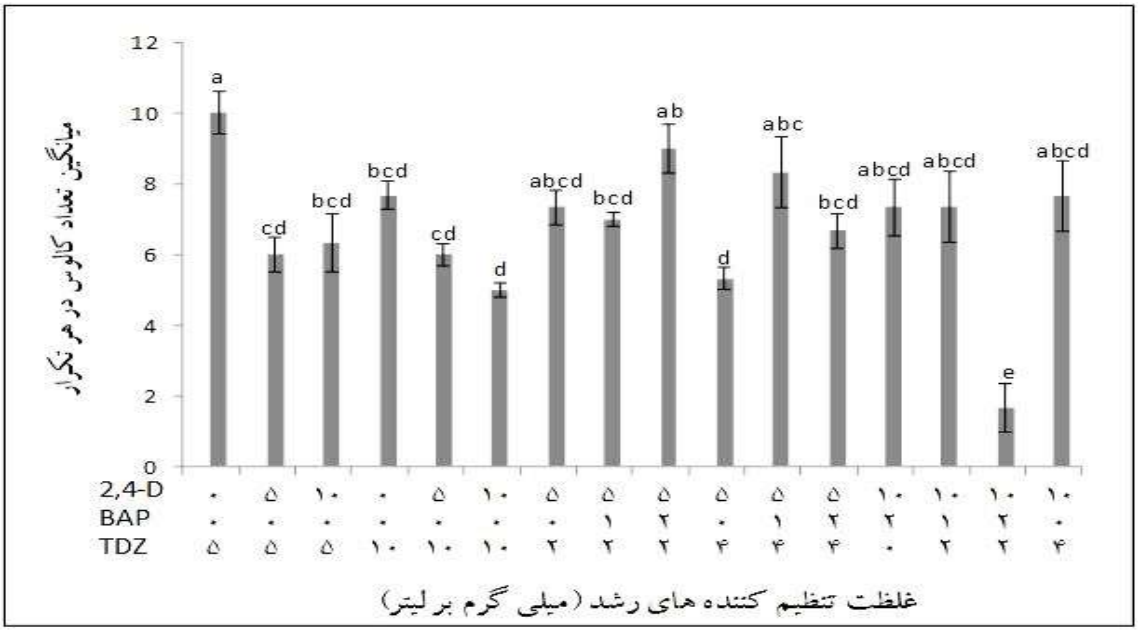
جدول ۳- تجزیهٔ واریانس تأثیر تیمار تنظیم‌کنندهٔ رشد برکالوس‌زایی میوهٔ نارس *P. dactylifera* رقم خضراوی

منبع تغییر	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات (MS)
تنظیم‌کنندهٔ رشد	۱۵	۱۰/۶۱۷**
خطای آزمایش	۳۲	۲/۰۸۳
ضریب تغییرات (درصد)	–	۳۶

** بیان‌کنندهٔ معنی‌داری در سطح P≤ ۰/۰۱ است.



شکل ۳- جداکردن خوشهٔ میوهٔ نارس *P. dactylifera* رقم خضراوی (A)، کشت میوه‌های نارس (B)، افزایش حجم کالوس در محیط‌کشت حاوی 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون با غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر (C)، تشکیل جنین در محیط‌کشت حاوی تیدیازورون با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر (D)



شکل ۴- تأثیر تیمارهای تنظیم‌کنندهٔ رشد ۲ و ۴ دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)، بنزیل آمینوپورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) در کالوس‌زایی میوهٔ نارس *P. dactylifera* رقم خضراوی- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤ ۰/۰۱ با آزمون دانکن هستند.

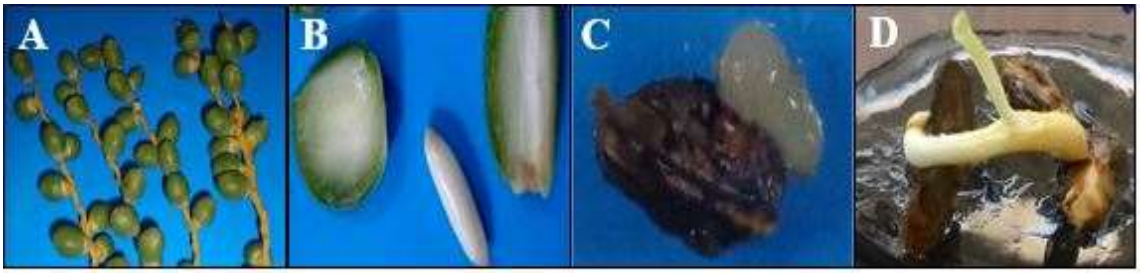
در بخش دیگری از این آزمایش، میوهٔ نارس پس از گذشت یک ماه از زمان نمونه‌برداری اول برداشت شد و آندوسپرم با جنین، جدا و در محیط‌کشت MS با تنظیم‌کننده‌های رشد کشت شد. تجزیهٔ واریانس (جدول ۴) نشان داد بین ترکیبات تیماری مختلف تنظیم‌کنندهٔ رشد تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

جدول ۴- تجزیهٔ واریانس تأثیر تیمارهای تنظیم‌کنندهٔ رشد برکالوس‌زایی آندوسپرم *P. dactylifera* رقم خضراوی

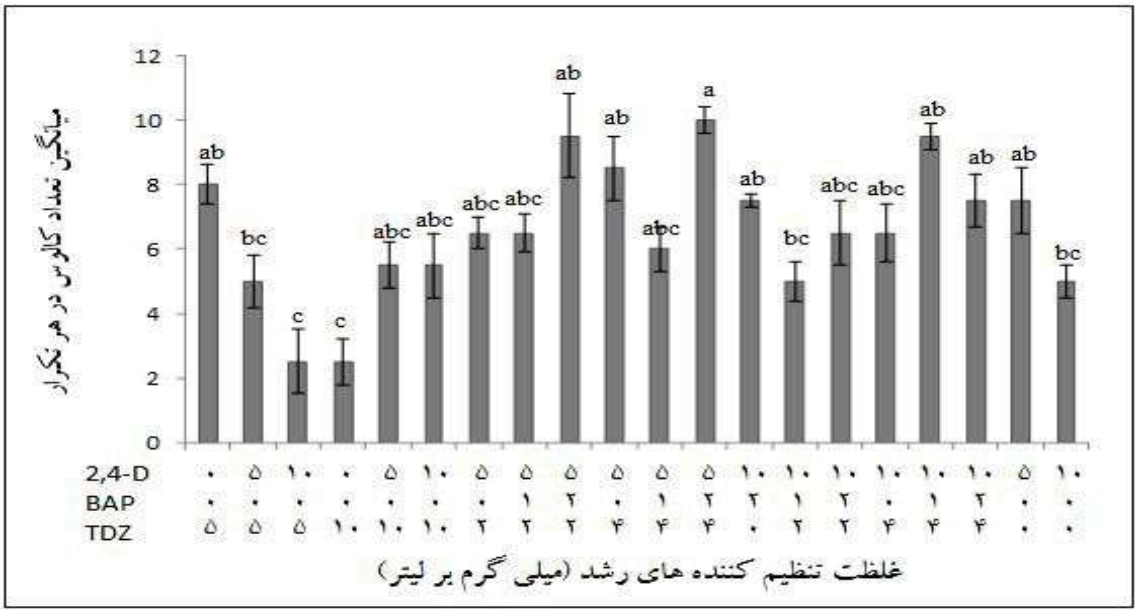
منبع تغییر	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات (MS)
تنظیم‌کنندهٔ رشد	۱۹	۸/۴۶۸*
خطای آزمایش	۲۰	۳/۹۵
ضریب تغییرات (درصد)	–	۴۹

* بیان‌کنندهٔ معنی‌داری در سطح P≤۰/۰۵ است.

نتایج مقایسهٔ میانگین نشان دادند برای کالوس‌زایی از آندوسپرم خرما (شکل ۵- D) باید حداقل سیتوکینین با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر با 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر وجود داشته باشد (شکل ۶). همچنین تشکیل ریشه‌چه و ساقه‌چه (شکل ۵- D) در ترکیب تیماری ۱۲ شامل 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر؛ ترکیب تیماری ۱۰ شامل 2,4-D با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر و ترکیب تیماری ۱۷ شامل 2,4-D با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، بنزیل آمینوپورین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر و تیدیازورون با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۵- جداکردن خوشهٔ میوهٔ نارس *P. dactylifera* رقم خضراوی (A)، آندوسپرم جداشده از پریکارپ میوه (B)، تشکیل کالوس از کشت آندوسپرم (C) تشکیل ساقه‌چه (D)



شکل ۶- تأثیر تیمارهای تنظیم‌کننده‌های رشد ۲ و ۴- دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D)، بنزیل آمینوپورین (BAP) و تیدیازورون (TDZ) در کالوس‌زایی آندوسپرم *P. dactylifera* رقم خضراوی- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیارند. حروف متفاوت، بیان‌کنندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح P≤ ۰/۰۵ با آزمون دانکن هستند.

بحث

در آزمایش حاضر مشخص شد برای کالوس‌زایی مناسب در ریزنمونه‌های برگ، میوهٔ نارس و آندوسپرم خرما نیاز به مقدار متوسطی از تنظیم‌کنندهٔ رشد 2,4-D (۵ میلی‌گرم بر لیتر) است. بین اکسین‌ها 2,4-D به‌طور گسترده در کشت‌بافت خرما استفاده می‌شود؛ به‌طوری‌که مؤثرترین اکسین در کشت‌بافت خرما است. در کشت‌بافت ارقام نخل خرمای امسکشی (Sane *et al.*, 2006)، جیحل و بوستامی‌نویر (Zouine and El Hadrami, 2007)، دگلت‌نور (Fki *et al.*, 2003) و دگلت‌بی (Othmani *et al.*, 2009) مشخص شد 2,4-D برای القای جنین‌زایی سوماتیک از ریزنمونهٔ برگ لازم است؛ اما غلظت 2,4-D لازم برای ارقام مختلف خرما متفاوت است. El Hadrami و Baziz (۱۹۹۵) گزارش کردند 2,4-D آثار مفیدی در القای ظرفیت جنین‌زایی کالوس دارد. دقیقاً مشخص نشده است 2,4-D چگونه کالوس‌زایی نخل خرما را تقویت می‌کند؛ اما به‌دلیل سرکوب تجمع مواد سمی فنلی و همچنین تکمیل کمبود اکسین درون‌زا، در کالوس‌زایی مؤثر است (Smith and Street, 1974).

همچنین در بررسی حاضر مشخص شد علاوه‌بر اکسین 2,4-D که حضور آن در محیط‌کشت برای کالوس‌زایی ضروری است، وجود تنظیم‌کنندهٔ‌های رشد سیتوکینینی نیز برای بهبود کالوس‌زایی ضروری هستند. سیتوکینین‌ها بیشتر برای تحریک رشدونمو در بافت‌های کشت‌شده به کار می‌روند. این هورمون‌ها به‌ویژه اگر با یک اکسین اضافه شوند، تقسیم سلولی را تحریک می‌کنند (Bohm, 1961). اثر سیتوکینین‌ها گاهی شبیه اثر نور است و جذب پتاسیم را تحریک می‌کند (Green and Muir, 1979). اکسین‌ها در سلول، تنظیم‌کنندهٔ پدیده‌هایی هستند که به نسخه‌برداری از DNA منجر می‌شوند؛ درحالی‌که سیتوکینین‌ها تنظیم‌کنندهٔ پدیده‌هایی هستند که تقسیم میتوز را موجب می‌شوند؛ درنتیجه در حضور اکسین نسخه برداری از DNA انجام می‌شود؛ ولی سلول‌ها تقسیم نمی‌شوند، مگر اینکه سیتوکینین هم اضافه شود. به‌همین‌دلیل، در حضور سیتوکینین، تنها سلول‌هایی تقسیم می‌شوند که قبلاً DNA آنها نسخه‌برداری شده است (Jouanneau and Tandeau de Marsac, 1973). برای تشکیل کالوس و نیز تقسیم سلولی به سیتوکینین‌ها نیاز است؛ اما کاربرد مقادیر متعادلی از دو تنظیم‌کنندهٔ رشد اکسین و سیتوکینین تشکیل کالوس را باعث می‌شود (Rout, 2004). بنزیل آمینوپورین فعال‌ترین، ارزان‌ترین و تنها سیتوکینینی است که اتوکلاوشدنی است؛ بنابراین در ریزازدیادی تجاری که هزینه و سادگی کار اهمیت دارد بیشترین کاربرد را دارد (Thomas and Blakesley, 1987) و گزارش‌های متعددی وجود دارند که نشان می‌دهند در ترکیب با اکسین بر جنین‌زایی سوماتیک در تعداد زیادی از گیاهان مؤثر است (Junaid *et al.*, 2007). Eshraghi و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند اثر تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D و بنزیل آمینوپورین در القای کالوس و جنین سوماتیک به رقم بستگی دارد. درواقع در رقم خنیزی، کالوس‌های جنین‌زا روی محیط‌کشت

حاوی بنزیل آمینوپورین با غلظت ۴/۶ میلی‌گرم بر لیتر و 2,4-D با غلظت ۳/۴ میلی‌گرم بر لیتر تشکیل شدند؛ درمقابل در رقم مردار سنگ، غلظت‌های بیشتر 2,4-D (۱۵۴ میلی‌گرم بر لیتر) برای القای کالوس‌های جنین‌زا ضروری هستند (Eshraghi *et al*., 2005).

نتایج نشان دادند در کشت میوهٔ نارس، تنظیم‌کنندهٔ رشد تیدیازورون با 2,4-D به تشکیل ساختارهای جنین‌مانند منجر می‌شوند. براساس پژوهش‌های Cupelle و همکاران (۱۹۸۳) تیدیازورون با افزایش انباشتگی و سنتز سیتوکینین‌های پورینی، تبدیل آدنین را به آدنوزین افزایش می‌دهد (Cupelle *et al*., 1983). بررسی‌های Victor و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند تیدیازورون کارکرد دوگانه‌ای در القای جنین سوماتیک دارد؛ فعالیت شبه‌سیتوکینینی آن تقسیم سلولی را افزایش می‌دهد؛ اندکی فعالیت شبه‌اکسینی دارد که به نظر می‌رسد برای القای جنین بسیار مهم است (Victor *et al*., 1999).؛ باززایی مستقیم جنین‌های سوماتیک را از ریزنمونهٔ رأس ساقه تحریک می‌کند و در القای جنین‌زایی سوماتیک در ریزنمونه‌ها یا گیاهچه‌های بذری در انواع گونه‌های گیاهی سرسخت مؤثر است (Sidky and Zaid, 2011)؛ بااین‌حال برای باززایی جنین‌های سوماتیک در نخل روغنی زیان‌آور است (Rajesh *et al*., 2003). در پژوهش‌های Sidky و Zaid (۲۰۱۱) کاربرد غلظت‌های مساوی از تنظیم‌کننده‌های رشد تیدیازورون و 2,4-D و همچنین غلظت دو برابر 2,4-D نسبت به تیدیازورون به بیشترین کالوس‌زایی در ریزنمونهٔ مریستم انتهایی نخل خرما منجر شد. 2,4-D تنها در مرحلهٔ انگیزش جنین‌زایی لازم است و گاهی 2,4-D و دیگر اکسین‌ها از جنین‌زایی سوماتیک ممانعت می‌کنند (Norgaard and Krogstrup, 1991). در سایر بررسی‌ها بیشترین تولید جنین سوماتیک در نخل خرما در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر تیدیازورون (Aslam *et al*., 2011) و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D (Othmani *et al*., 2009) مشاهده شد.

در بیشتر پژوهش‌های مربوط به کشت‌بافت خرما از ریزنمونهٔ مریستم انتهایی استفاده می‌شود که جداکردن آن بسیار سخت و زمان‌بر است و به ازبین‌رفتن درخت منجر می‌شود. ریزنمونه‌های استفاده‌شده در آزمایش حاضر به‌دلیل ازبین‌نرفتن کامل گیاه و سهولت کشت نسبت به مریستم انتهایی برتری دارند. در نخستین بررسی، Zaid در سال ۱۹۸۱ با ریزنمونه‌های برگ درختان بالغ خرما، پاجوش‌ها، گیاهچه‌های بذری و گیاهچه‌های غیرجنسی نشان داد تنها کالوس‌های به‌دست‌آمده از واکشت برگ از گیاهچه‌های بذری و گیاهچه‌های غیرجنسی کشت‌داده‌شده ریشه تولید می‌کنند وکالوس از برگ‌های جوان ۴ تا ۸ ماهه تشکیل می‌شود. Othmani و همکاران (۲۰۰۹) از برگ‌های جوان رأس پاجوش رقم دگلت‌بی، با ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D در مدت ۸ ماه سوسپانسیون جنین‌زا به‌دست آوردند. Gueye و همکاران (۲۰۰۹) قطعات برگ به طول ۵ سانتی‌متر را از گیاهچه‌های

بذری رقم احمر برای کالوس‌زایی در محیط حاوی ۵۴ میکرومول نفتالن استیک اسید کشت کردند. بررسی تغییرات سیتولوژیک کالوس‌های تولیدشده در مدت ۶۳ روز نشان داد پس از ۵ روز تغییراتی در سلول‌های مزوفیل پهنک برگ رخ دادند و سلول‌هایی با هسته‌های حجیم تولید شدند. این سلول‌های تمایزنیافته توانایی زیادی برای تقسیم داشتند و در روز نهم، خوشه‌ای از سلول‌ها تشکیل دادند که پس از ۱۲ تا ۱۴ روز مشخص شد کالوس هستند (Gueye *et al*., 2009).

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بابت فراهم‌کردن امکانات پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Abul-Soad, A. A. (2011) Micropropagation of date palm using inflorescence explants. In: Date Palm Biotechnology (Eds. Jain, S. M., Al-Khayri, J. M. and Johnson, D. V.) 91-118. Springer, Dordrecht.

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

Al-Khayri, J. M. and Al-Bahrany, A. M. (2004) Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate. Scientia Horticulturae 99: 153-162.

Aslam, J., Ahmad Khan, S., Cheruth, A. J., Mujib, A., Sharm, 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.) cultivars. Saudi Journal of Biological Sciences 18: 369-380.

Bakheet, S. A., Taha, H. S., Hanafy, M. S. and Solliman, M. E. (2008) Morphogenesis of sexual embryos of date palm cultured *in vitro* and early identification of sex type. Journal of Applied Science Research 4: 345-352.

Bohm, H. (1961) The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures. International Review of Cytology 11: 183-208.

Chand, S. and Singh, A. J. (2004) *In vitro* shoot regeneration from cotyledonary node explants of a multipurpose leguminous tree, *Pterocarpus marsupium* roxb. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant 40: 167-170.

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 N^6-(Δ^2-isopentenyl) [18-C^{14}] adenosine in callus tissues of *phaseolus* L. Plant Physiology 73: 696-802.

Duncan, D. B. (1955) Multiple range and multiple F test. Biometrics 11: 1-42.

Eke, C. R., Akomeah, O. and Asemota, P. (2005) Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'Zebia' and 'Loko' landraces. African Journal of Biotechnology 42: 244-246.

El Hadrami, I. and Baaziz, M. (1995) Somatic embryogenesis and analysis of peroxidases in *Phoenix dactylifera* L. Biologia Plantarum 37(2): 197-203.

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

Fki, L., Drira, M. R. and Rival, A. N. (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv Deglet Nour. Plant Cell Reports 21: 517-524.

Green, J. F. and Muir, R. M. (1979) Analysis of the role of potassium in the growth effects of cytokinin, light and abscisic acid on cotyledon expansion. Physiologia Plantarum 56: 19-24.

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.

Hegazy, A. E. (2008) Micropropagation of Egyptian date palm cv. Selmy through floral buds culture. Journal of Agricultural Sciences 33(4): 2803-2815.

Hegazy, A. E., Nasr, M. I., Ibrahim, I. A. and El-Bastawissy, H. H. (2009) Micropropagation of date palm cv. Malakaby through embryogenesis: 3- Effect of tryptone, yeast extract, casein hydrolysate and pineapple extract. Journal of Agricultural Sciences 34: 1561-1576.

Jain, S. M. (2007) Recent advances in date palm tissue culture and mutagenesis. Acta Horticulturae 736: 205-211.

Jouanneau, J. P. and Tandeau de Marsac, N. (1973) Stepwise effects of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially synchronized tobacco cells. Experimental Cell Research 77: 167-174.

Junaid, A., Mujib, A., Sharma, M. P. and Tang, W. (2007) Growth regulators affect primary and secondary somatic embryogenesis in Madagaskar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) at morphological and biochemical levels. Plant Growth Regulation 51(3): 271-281.

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.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantrum 15: 473-497.

Norgaard, J. V. and Krogstrup, P. (1991) Cytokinin induced somatic embryogensis from immature embryos of *Abies nordmaniana* Lk. Plant Cell Reports 9: 509-513.

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.

Rajesh, M. K., Radha, E., Karun, A. and Parthasarathy, V. A. (2003) Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm-the effect of exogenous polyamines. Plant Cell Tissue and Organ Culture 75: 41-47.

Rout, G. R. (2004) Effect of cytokinins and auxin on micropropagation of *Clitoria ternatea* L. Biology Letters 41(1): 21-26.

Sane, D., Aberlenc-Bertossi, F., Gassama-Dia, Y. K., Sagna, M., Trouslot, M. F., Duval, Y. and Borgel, A. (2006) Histological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis on cell suspension of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Annals of Botany 98: 301-308.

Sharma, D. R., Sunita, D. and Chowdhury, J. R. (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. 'Khadravi' through tissue culture. Indian Journal of Experimental Biology 22: 596-598.

Sidky, R. A. and Zaid, Z. E. (2011) Direct production of somatic embryos and plant regenartion using TDZ and CPPU of date palm (*Phoenix dactylifere* L.).

International Journal of Academic Research 3(2): 792-796.

Smith, S. and Street, H. E. (1974) The decline of embryogenic potential as callus and suspension cells of carrot (*Daucas carota* L.) were serially subcultured. Annals of Botany 38: 223-241.

Thomas, T. H. and Blakesley, D. (1987) Practical and potential uses of cytokinins in agriculture and horticulture. Plant Growth Regulators 14: 69-83.

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 Regulators 28(1): 9-15.

Zaid, A. (1981) Rapid propagation of the date palm through tissue culture. MSc thesis, Date and Citrus Station, Indio, California, U. S. A.

Zaid, A. and Tisserat, B. (1983) Morphogenetic responses obtained from a variety of somatic explant tissues of date palm. The Botanical Magazine 96: 67-73.

Zouine, J. and El Hadrami, I. (2007) Effect of 2,4-D, glutamin and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticulturae 112: 221-226.