بررسی تکثیر خرما (رقم برهی) از طریق جنین های غیر جنسی و تکوین کالوس های جنین زا و معمولی

سیروان بختیاری (١)، رضا ضرغامی (٢)، سعید آیریان (٣)،احمد مجد (٤)، علی حاجی محمّدی (٥و٦)، علیمردان رستمی(٦)

١- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت معلم تهران.٢- استادیار مؤسسه بیوتکنولوژی کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی. ٣و٤- دانشیار و استاد گروه علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران. ٥- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین(پیشوا) وعضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین (پیشوا).٦- بخش کشت بافت، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی.

خرما یکی از محصولات مهم صادراتی ایران می باشد تکثیر محصولات خرما به دلیل چرخه زندگی طولانی و نبود روش های مناسب تکثیر رویشی به کندی صورت می گیرد در حالت معمولی تکثیر اکثر گونه های خرما از طریق جنسی یا بذر صورت می گیرد اما امروزه برای ریزازدیادی از کشت بافت استفاده می شود که در آن ریز نمونه (مریستم) بر روی محیط های پایه MS با ترکیبات هورمونی متفاوت قرار می گیرد. در این تحقیق آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور هورمونی با غلظت های مختلف انجام گردید. بعد از ۸ ماه بیشترین میزان ایجاد کالوس بر روی محیط ۱۰۰ میلی گرم 2,4-D+ ۵ میلی گرم BAP حاصل گردید و بعد ۱۲ ماه بیشترین میزان تولید کالوس جنین زا بر روی محیط ۵ میلی گرم BAP + ۱ میلی گرم Kinetin + ۰/۱ میلی گرم NAA حاصل گردید. تکوین کالوس های جنین زا نشان داد که ابتدا پیش جنین های کروی←جنین کروی←جنین قلبی←جنین اژدری و سپس به گیاهچه تبدیل می شود.

کلمات کلیدی: نخل خرما، جنین زایی غیرجنسی، گیاهچه.

مقدمه:

نخل خرما ، date palm ، با نام علمی .*Phoenix dactylifera* L (2n= 36) یکی از اعضا خانواده تک لپه ای ها ، *Aracaceae*، است که حدود ۲۲۵ جنس و۲۶۰۰ گونه دارد. این خانواده را *Palmaceae* نیز می نامند. (الخیری ۲۰۰۱)خرما با سطح زیر کشت ۲۱۸ هزار هکتار و تولید ۹۱۸ هزار تن و تنوع فراوان ارقام (حدود ٤۰۰رقم) جایگاه ویژهای در کشور دارد واز نظر سطح زیر کشت پنجمین محصول مهم باغبانی کشور از نظر تولید باغبانی کشور را بخود اختصاص داده است (الهام پور و همکاران ۱۹۹۰)علاوه بر موارد فوق خرما بدلیل ویژگی های منحصر بفرد نظیر مقاومت به خشکی و کم آبی ، تحمل شرایط نا مساعد آب و خاک در زمره معدود گونه های گیاهی است که توانسته گسترش واسکان انسان در سرزمین های گرم و لم یزرع دنیای قدیم را امکان پذیر سازد. تکثیر خرما از طریق بذر و پاجوش بنابه دلایل زیاد هم هزینه بر وهم مقرون به صرفه نمی باشد امروزه برای ریز ازدیادی از فن کشت بافت استفاده می شود هدف از این تحقیق دست یابی به محیط کشتی مناسب جهت ریزازدیادی رقم خرمای برهی می باشد. ..AL-Khayri J.M در سال ۲۰۰۳ نیز اثر غلظت اکسین و نمکهای محیط MS را بر روی تکامل جنین های غیر جنسی مورد مطالعه قرار داد و در نهایت به این نتیجه رسید که وجود IBA در مقایسه با NAA در محیط کشت منجر به تشکیل درصد بیشتری گیاهچه کامل می شود و بهترین ترکیب را محیط کشت حاوی نصف نمکهای محیط MS و ۰/۲ تا ۰/٤ میلی گرم در لیتر IBA معرفی کرد .

مواد و روش‌ها:

جهت انجام این طرح تحقیقات پاجوش های ٤-۳ ساله دو رقم نخل خرمای جنوب ایران برهی و مجول در فصل زمستان (دی ماه) جمع آوری شدند و به تهران انتقال یافتند. قبل از انتقال پاجوشها به آزمایشگاه، در محیط گلخانه برگهای آن بطور کامل جدا شدند و در نهایت ناحیه انتهایی ساقه به همراه برگهای اولیه جهت انجام مراحل استریلیزاسیون و کشت به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا قسمت جدا شده از ناحیه انتهایی ساقه پاجوش ها را به مدت ۳۰ دقیقه با آب جاری شستشو داده، سپس ۱ دقیقه در الکل ۷۰٪ غوطه ور خواهند شد. بعد از این مرحله قطعه جدا شده را به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲.٦٪ به همراه Tween 20 ۱ ml/l قرار گرفته و در نهایت ٤ یا ۵ بار نمونه با آب مقطر استریل آبکشی می شود. از مرحله قرار دادن نمونه در محلول هیپوکلریت سدیم به بعد در زیر لامینار انجام می شود.بعد از اتمام مرحله استریلیزاسیون نوبت به برش و کشت ریزنمونه ها (جدا کشتها) در محیط کشت مورد نظر می رسد .ریز نمونه های حاصله جهت ایجاد کالوس وتولید کالوس های جنین زا بر روی تیمار های هورومونی متفاوتی فرار گرفت تیمارهای هورومونی جهت القای کالوس:

۱- (۱۰ میلی گرم 2,4-D+۱ میلی گرم BAP) ۲- (۱۰ میلی گرم 2,4-D+۲میلی گرم BAP) ۳- (۱۰ میلی گرم 2,4-D+۵میلی گرم BAP) ٤-(۵۰میلی گرم 2,4-D+۱ میلی گرم BAP)۵-(۵۰میلی گرم 2,4-D+۲میلی گرم BAP)٦-(۵۰ میلی گرم 2,4-D+۵ میلی گرم BAP)۷-(۱۰۰ میلی گرم 2,4-D+۱ میلی گرم BAP)۸-(۱۰۰ میلی گرم 2,4-D+۲ میلی گرم BAP) ۹-(۱۰۰ میلی گرم 2,4-D+۵ میلی گرم BAP)

تیمارهای هورومونی جهت ایجاد کالوس جنین زا:

۱- (بدون هورمون) ۲-(۱۰ میلی گرم 2,4-D) ۳-(۱۰ میلی گرم 2,4-D +۳میلی گرم 2ip) ٤-(۵ میلی گرم BAP+۱ میلی گرم Kinetin+ ۱/ میلی گرم NAA)

ریزنمونه ها (مریستم) مربوط به ارقام برهی و مجول بر روی تیمارهای هورمونی به مدت ۱۰ هفته در تاریکی کامل در دمای ۲۷درجه قرار می گیرند سپس ریز نمونه ها مورد بررسی قرار گرفت و میزان زنده ماندنی وتورم وایجاد کالوس ثبت گردیدآزمایش در قالب کاملا تصادفی می باشد که هر تیمار حاوی ٤ تکرار و هر تکرار حاوی ٤ ریز نمونه می باشد. آنالیز داده ها بااستفاده از نرم افزار MSTAT-C وSPSS انجام شد.در این تحقیق نیز مراحل اولیه تکوین کالوس جنین زا با استفاده از روش های هیستولوژیکی مشاهده گردید.

نتایج وبحث:

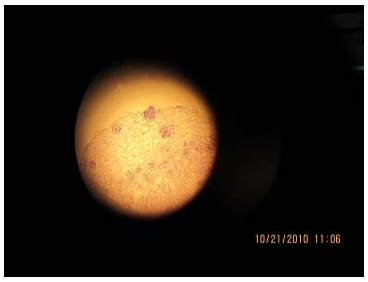
جدول۱- تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده (رقم برهی)

منابع تغییرات	درجه آزادی	زنده ماندنی	متورم شدن	ایجاد کالوس
فاکتورA	۲	۲/٥۲۸*	۱۹/۱۹٤**	٥/۰۲۸**
فاکتور B	٤	۱/۰۲۸Ns	۱/۱۹٤Ns	۰/٥۲۸Ns
اثر متقابل دو فاکتور(A×B)	٤	۰/۱۹٤Ns	۰/۳۱۹Ns	۰/۲۷۸Ns
خطای آزمایش	۲۷	۰/٦٥۷	۱/۰٤٦	۰/٤۷۲

فاکتورA= هورمون 2,4-D و فاکتورB= هورمون BAP

* و**و^{ns}: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ٥ درصد و۱ درصد و بی معنی می باشند.

نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس (جدول۱) نشان داد که اثر هورمون 2,4-D بر روی صفت های زنده ماندنی در سطح ٥ درصد وبرای تورم وایجاد کالوس در سطح یک در صد معنی دار بود و همچنین اثر هورمون BAP و برای هر سه صفت معنی دار نبوده است همچنین نتایج نشان می دهد که بیشترین میزان تولید ایجاد کالوس بروی محیطMS حاوی ۱۰۰ میلی گرم 2,4-D+٥ میلی گرم BAP و بیشترین میزان تولید کالوس جنین زا بر روی محیط MS حاوی ٥ میلی گرم BAP+۱ میلی گرم Kinetin+ ۱/ میلی گرم NAA بدست آمده است تکوین کالوس های جنین زا بدین صورت می باشد که ابتدا پیش جنین های کروی←جنین کروی←جنین قلبی←جنین اژدری و سپس به گیاهچه تبدیل می شود.



شکل۱: پیش جنین های کروی

شکل۲: جنین های کروی

منابع:

AL-Khalifah N.S., (2000). In vitro Culture Studies on Date Palm (Phoenix dactylifera L.) cv. Mosaifah and Nabtat Sultan. Plant Tissue Cult. 10(1): 1-8.

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

AL-Khayri J.M., 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.

Omar M.S., Novak F.J., (1990). In vitro plant regeneration and ethylmethanesulphonate (EMS) uptake in somatic embryos of date palm (Phoenix dactylifera L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 20: 185-190.

AL-Khayri J.M., (2003). In vitro germination of somatic embryos in date palm: Effect of auxin concentration and strength of MS salts. Current Science. Vol. 84 No. 5: 680-683.

A Study on the propagation of date palm (Berhi) using somatic embryogenesis and the development of normal and embryogenic calli.

Bakhtiari, S.[1], R. Zarghami[2] , S. Irian[3],A. Majd[4], A. Haji Mohammadi[5,6], A. Rostami[6]
1.MSc student, Department of Biology, Faculty of Science - Tarbiat Moallem University, Tehran-Iran.
2. Member of scientific board of Agricultral Biotechnology Research Institute of Karaj, Iran.
3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science - Tarbiat Moallem University, Tehran-Iran.
4. Professor, Department of Biology, Faculty of Science - Tarbiat Moallem University, Tehran-Iran.
5. MSc in agronomy, Young Researchers club of Islamic Azad University, Varamin - Pishva Branch, Iran.
6. Department of tissue culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Karaj, Iran

Abstract

Palm date is one of the most important export products of Iran. Palm date propagation has been a slow process, mainly due to its long life cycle and the lack of appropriate propagation techniques. Multiplication of most palm date species is normally done through sexual or seed propagation. Nowadays micropropagation is done through tissue culturing techniques, in which explants (mersitem) is placed in MS medium, containing different mixtures of phytohormones. This investigation was done through a factorial experimental design with a completely randomized design using two hormones with different concentration. The highest amount of callus was formed after 8 months in a medium containing 100 mg 2,4-D and 5 mg BAP, while the highest amount of emryogenic callus was formed after 12 months in a medium containing 5 mg BAP , 1 mg Kinetin and 1 mg NAA. The embryogenic callus development showed a sequence of spherical pre-embryo to spherical embryo to heart embryo to torpedo embryo and finally to seedlings.

Keywords: palm date, somatic embryogenesis, seedling.