بررسی تکثیر خرما (رقم مجول) 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 به عنوان غذای دوران بحران نظیر غذای اصلی قشر فقیر در مناطق محروم و بویژه در کشورهای جهان سوم که با مشکلات سوء تغذیه و گرسنگی مواجه هستند نقش مهمی را ایفا می کند 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) بروی 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 ٨ ماه بیشترین میزان ایجاد کالوس بر روی محیط ١٠٠ میلی گرم 2,4-D+ ٥ میلی گرم BAP حاصل گردید و بعد١٢ ماه بیشترین میزان تولید کالوس جنین زا بر روی محیط ٥ میلی گرم BAP + ١ میلی گرم Kinetin + ٠/١ میلی گرم NAA حاصل گردید.

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

مقدمه:

جنین غیرجنسی یک تکنیک فراگیر برای ریزازدیادی گونه های گیاهی است. انواع زیادی از گیاهان تک لپه و دولپه از این طریق باززایی شده اند، مانند: Albizzia lebbeck, Ammi majus, Brassica oleracea, Zea mays, Oriza sativa.

این روش مزایای زیادی را در پی دارد از آن جمله عبارتند از:

١. تکثیر سریع از طریق تولید جنین های غیرجنسی در کشتهای سلول و استفاده از بیوراکتورها در تکنولوژی تولید انبوه، ٢. وجود ساختارهای دوقطبی در یک واحد (حضور ریشه و ساقه، هر دو) که باعث اجتناب از مرحله ریشه زایی بطور مجزا در اندام زایی می شود.،٣. جنین های غیرجنسی چون بطور مجزا رشد می کنند سیستم آسانی را جهت دست ورزی ایجاد می کنند (واکشت کردن) و باعث پیشرفت روشهای تولید انبوه می شوند،٤.القا دوره خواب و نگهداری کشت برای مدت طولانی را امکان پذیر می کنند،٥. یک منبع مهم برای آنالیز رخدادهای مولکولی و بیوشیمیایی که در حین القا و بلوغ جنین اتفاق می افتد، فراهم می کند، ٦. جداسازی پروتیین های ذخیره ای خاص را امکان پذیر می سازد،٧. دوره تکثیر و پرورش درختان را کوتاه می کند (*Ramawat K.G., 2003*). نخل خرما، با نام علمی *Phoenix dactylifera* L. (2n= 36) یکی از اعضا خانواده تک لپه ای ها است که حدود ٢٢٥ جنس و٢٦٠٠ گونه دارد. این خانواده را *Palmaceae* نیز می نامند.(الخیری ٢٠٠١)خرما با سطح زیر کشت ٢١٨ هزار هکتار و تولید ٩١٨ هزار تن و تنوع فراوان ارقام (حدود ٤٠٠رقم) 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 ١٩٩٠)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. امروزه برای ریز ازدیادی از فن کشت بافت و جنین زائی غیر جنسی استفاده می شود هدف از این تحقیق دست یابی به محیط کشتی مناسب جهت تولید جنین های غیر جنسی مجول می باشد..

مواد و روش‌ها:

نمونه های جداشده 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 یک میلی لیتر در لیتر Tween 20 قرار گرفته و در نهایت ٤ یا ٥ 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+٥میلی گرم BAP) ٤-(٥۰میلی گرم 2,4-D+۱ میلی گرم BAP)٥-(٥۰میلی گرم 2,4-D+۲میلی گرم BAP)٦-(٥۰ میلی گرم 2,4-D+٥ 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+٥ میلی گرم BAP)

تیمارهای هورومونی جهت ایجاد کالوس جنین زا عبارت بودند از:

۱- (بدون هورمون) ۲-(۱۰ میلی گرم 2,4-D) ۳-(۱۰ میلی گرم 2,4-D +۳میلی گرم 2ip) ٤-(٥ میلی گرم BAP+۱ میلی گرم Kinetin+ ۰/۱ 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 گردید آزمایش در قالب طرح کاملاً 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 و EXCELL وSPSS انجام شد.در این تحقیق نیز مقایسه کالوسهای معمولی و جنین زا با استفاده از روش های هیستولوژیکی صورت گرفت.

نتایج وبحث:

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

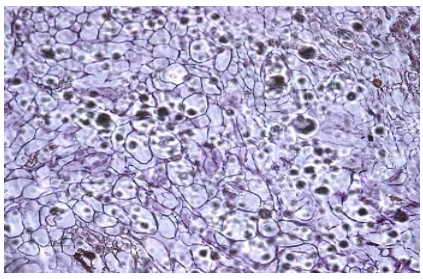
منابع تغییرات	درجه آزادی df	زنده مانی survival	متورم شدن swilling	ایجاد کالوس initiation
فاکتورA	۲	۱.۷۰**	۲۸/۰۰۰**	۱۱/۵۸۳**
فاکتور B	٤	۰/۵۸۳*	۰/۳۳۳Ns	۱/۵۸۳**
اثر متقابل دو فاکتور(A×B)	٤	۰/۳۳۳Ns	۰/۳۳۳Ns	۰/۲۹۲Ns
خطای آزمایش	۲۷	۰/۱٤۸	۰/۲۲۲	۰/۳٤۳

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

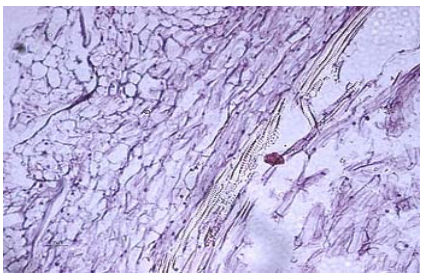
* و**و^{ns} : به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ درصد و۱ درصد و بی معنی می باشند.

نتایج بدست آمده ار تجزیه واریانس صفات (جدول۱) نشان داد که اثر هورمون 2,4-D بر روی صفت های زنده ماندنی و تورم وایجاد کالوس در سطح بک در صد معنی دار بود و همچنین اثر هورمون BAP تنها بر روی صفت ایجاد کالوس در سطح یک در صد معنی دار بود بطوریکه برای صفت زنده ماندنی در سطح پنج درصد معنی دار و برای صفت تورم بی معنی بودو همچنین نتایج نشان می دهد که بیشترین میزان تولید ایجاد کالوس بروی محیطMS حاوی ۱۰۰ میلی گرم 2,4-D+۵ میلی گرم BAP و بیشترین میزان تولید کالوس جنین زا بر روی محیط MS حاوی ۵ میلی گرم BAP+۱ میلی گرم Kinetin+ ۱/ میلی گرم NAA بدست آمده است.بعد از برش گیری با دستگاه میکروتوم مقایسه برش های کالوس های معمولی و حنین زا نشان می دهد که در کالوس های معمولی آثاری از تمایز دیده نمی شود یا به کمی دیده می شود سلول ها دارای هسته کوچک و سیتوپلاسم غیر متراکم می باشد و فضای بین سلولی در بین سلول ها دیده می شود شکل (الف) ولی در کالوس جنین زا آثار تمایز بوضوح دیده می شود تراکئیدها به عنوان اولین آثار تمایز نزدیک به سلول های مریستمی ظاهر می شوند سلول های مریستمی دارای هسته حجیم و سیتوپلاسم متراکم می باشد که فضای بین سلولی در آنها دیده نمی شود شکل(ب).

(الف)



(ب)



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.
Ramawat K.G., (2003). Plant Biotechnology. S. CHAND & COMPANY LTD.

A Study on the propagation of date palm (Mjool) 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 has always served as a main dish for the poor in certain deprived regions of the world, specially the third world countries facing malnutrition. 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.
Keywords: palm date, somatic embryogenesis, seedling.