

بررسی اثرات ژنوتیپ و سیتوکینین‌ها بر تولید کالوس جنین‌زا در نخل

خرما (*Phoenix dactylifera* L.)

آتوسا دانیایی^۱، امیر موسوی*^۲، فرح فراهانی^۳، بهاره دهسرا^۴، محمد ضعیفی‌زاده^۵

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m-amir@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

به منظور بهینه‌سازی مراحل تولید جنین رویشی در نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.)، بافت‌های جوان و مرستمی جدا شده از پاجوش‌های ۲-۳ ساله سه ژنوتیپ شامل ارقام زاهدی، کبکاب و دیری در ۱۰ سطح هورمون شامل ۵ سطح زآنین^۱ (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌گرم درلیتر) و ۵ سطح تی‌دیازورون^۲ (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۶ میلی‌گرم درلیتر) به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی در ۳ تکرار بر روی محیط پایه موراشیک و اسکوگ حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم درلیتر توفوردی کلروفنوکسی‌استیک اسید، ۳ گرم درلیتر زغال فعال و ۳۰ گرم درلیتر ساکارز کشت شدند. نمونه‌ها در شرایط کنترل شده با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. بافت‌های کشت شده در تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت، کالوس اولیه تولید کردند و پس از انجام واکست‌هایی در همان محیط‌ها در مدت ۶-۸ هفته کالوس جنین‌زا به دست آمد. ارقام زاهدی و کبکاب به ترتیب در غلظت‌های ۰/۵ و ۳ میلی‌گرم درلیتر زآنین و رقم دیری در ۰/۱ میلی‌گرم درلیتر تی‌دیازورون، بیشترین میانگین کالوس جنین‌زا را داشتند. هم‌چنین ارقام کبکاب، زاهدی و دیری به ترتیب کوتاه‌ترین زمان کالوس‌زایی را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی

خرما،
روبان‌زایی رویشی،
کالوس،
کشت بافت

^۱ Zeatin

^۲ TDZ

مقدمه

کشور ایران با تنوع وسیع آب و هوایی، در پاره‌ای از مناطق آن در زمینه تولید برخی از محصولات کشاورزی و باغی نظیر خرما، از مزایای قابل توجهی برخوردار است. از گذشته دور، خرما یکی از محصولات مهم و استراتژیک کشور بوده و با توجه به ارزش غذایی بالا، تنوع تولید و مرغوبیت خاص برخی ارقام آن، از نظر مصارف داخلی و صادرات بسیار حائز اهمیت می‌باشد. کشورهای مصر، ایران، عربستان و پاکستان عمده‌ترین کشورهای تولید کننده و هم چنین استان‌های هرمزگان، کرمان و خوزستان نیز از مراکز مهم گسترش نخلستان‌ها به شمار می‌آیند. بر اساس آخرین اطلاعات موجود، سطح زیر کشت خرما در ایران در سال زراعی ۱۳۸۶-۸۷ برابر با ۲۴۳ هزار هکتار بوده که بیشترین سطح بارور خرما با ۱۸/۰۴٪ به استان هرمزگان تعلق دارد.

گونه نخل خرما (*Phoenix dactylifera L.*) از گیاهان تک‌لپه و دوپایه بوده که از سطح هتروزیگوتی^۱ بالایی برخوردار می‌باشد. این خصوصیات، تکثیر نخل به طریق بذر را به دلیل تفرق زیاد خصوصیات ژنتیکی غیراقتصادی ساخته، لذا، استفاده از روش کشت بافت جهت تکثیر و تولید انبوه نهال‌های یکسان و محافظت ژرم پلاسما مورد توجه قرار گرفته است. بدین جهت محققینی از جمله (Tisserat و Zaid، ۱۸)، (Tisserat و Mater، ۲۲)، (Ross و همکاران ۱۶) مطالعه و بررسی در این زمینه را آغاز کرده و تولید کالوس‌های جنین‌زا و تکامل جنین‌ها به گیاهک را گزارش نموده‌اند و این تحقیقات همچنان ادامه دارد (۲۱ و ۴۸، ۱۰).

در حال حاضر، فن آوری‌های کشت بافت گیاهی به عنوان یک ابزار قوی جهت مطالعه مشکلات اساسی و کاربردی زیست‌شناسی گیاهی درآمده است. مهم‌ترین موارد استفاده از کشت بافت و سلول‌های گیاهی شامل تکثیر انبوه و سریع گیاهان، اصلاح ارقام، تولید گیاهان عاری از بیماری و تهیه ژنوتیپ‌های مقاوم به تنش‌های محیطی می‌باشد.

یکی از پدیده‌های بسیار باارزش که باززایی گیاهان از ریزنمونه‌های مختلف به‌وسیله آن به‌راحتی انجام می‌پذیرد،

جنین‌زایی سوماتیکی است. جنین‌زایی سوماتیکی از جمله موضوعات باارزش و برجسته در کشت بافت گیاهی بوده و مفهوم آن تولید جنین از سلول‌ها، بافت‌ها و یا اندام‌های سوماتیکی و به‌طور کلی از ریزنمونه‌های سوماتیکی می‌باشد. در خرما، بافت‌های مختلف می‌توانند برای تولید کالوس مورد استفاده قرار گیرند (۲۲). پیرو بررسی‌های انجام شده قسمت‌های مختلف پاجوش، گل‌آذین جوان، میوه نارس و جنین بذر از قابلیت تولید کالوس جنین‌زا برخوردار بوده‌اند. با توجه به خصوصیت رشدی این گیاه مبنی بر عدم تولید شاخه‌های فرعی در نخل خرما، یک نقطه رشد پایه وجود داشته که در زمان کوتاهی از دوره زندگی خود پاجوش تولید می‌کند. بنابراین تعدادی پاجوش و در نتیجه تعدادی مریستم به‌عنوان ریزنمونه تولید می‌شود که معمولاً این تعداد نیز کم می‌باشد (حداکثر بین ۳۰-۰) (۱۹۶).

استفاده از روش‌های نوین زیست‌فناوری از جمله کشت بافت و باززایی گیاه و به‌ویژه توسعه روش‌های انتقال ژن و تراریختی در گیاهان چوبی، در کنار روش‌های اصلاحی متداول، به یک ابزار ضروری برای اصلاح گیاهان تبدیل شده است. با در نظر گرفتن این نکته و توجه به تنوع بالای ژرم پلاسما ارقام ایرانی، هنوز اطلاعات جامعی در زمینه بهینه‌سازی کشت بافت و تولید کالوس جنین‌زا در کلیه ارقام تجاری کشورمان در دسترس نمی‌باشد. لذا، با توجه به اهمیت موضوع و در همین راستا، بهینه‌سازی تولید کالوس و جنین‌زایی رویشی حاصل از آن در برخی ژنوتیپ‌های مهم خرماهای ایرانی با استفاده از هورمون‌های سیتوکینین به همراه یک نوع اکسین برای اولین بار مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. البته تاکنون ترکیبات مختلفی از اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها با غلظت‌های متفاوت جهت تولید کالوس‌های رویان‌زا در ارقام مختلف خرما توسط پژوهشگران به‌کار رفته است (۱۷ و ۲، ۱۵). اما با عنایت به تنوع ژرم پلاسما و اهمیت جهانی محصولات خرما، مطالعه در زمینه بهینه‌سازی کشت بافت آن در ارقام برتر ایرانی موفقیت قابل توجهی را در امر تولید و صادرات به همراه خواهد داشت.

Heterozygote^۱

مواد و روش‌ها

۱- تهیه نمونه گیاهی

در این آزمایش از سه ژنوتیپ خرماي ایرانی (Phoenix *dactylifera* L.) به نام‌های زاهدی، کبکاب و دیری که از مناطق خرماخیز کشور از جمله اهواز و بهبهان در استان خوزستان تهیه شده بودند، استفاده شد. به این منظور بعد از انتخاب پایه‌های مادری مناسب و سالم، پاجوش‌های ۲-۳ ساله آن‌ها به طول ۹۰-۷۰ سانتی‌متر و قطر ۲۵-۴۰ سانتی‌متر جدا گشتند. به‌طورکلی، عمل جداسازی پاجوش از پایه مادری جهت حفظ پاجوش از گرما و سرمای بیش از حد در فصول بهار و پاییز صورت گرفت. این پاجوش‌ها، بعد از جداسازی و قطع شاخ و برگ و ریشه‌های اضافی در محلول‌های ۵ در هزار قارچ‌کش (بنومیل^۱) و حشره‌کش (مالاتیون^۲)، به ترتیب به مدت زمان ۱۰ و ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از ضدعفونی، پاجوش‌ها درون گونی‌های چتایی پیچانده شده و به محیط آزمایشگاه انتقال یافتند. در آزمایشگاه بخش کوچکی از پاجوش‌ها حاوی جوانه انتهایی، بافت‌های مرستمی و پریموردیای برگی جدا گردیده و به مدت ۳-۴ ساعت در محلول ترکیبی آنتی‌اکسیدان (اسیدسیتریک^۳ و اسیداسکوربیک^۴ به ترتیب ۱۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر) در یخچال نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به وسیله الکل ۷۰٪ و هیپوکلریت سدیم^۱ ۵۰٪ حاوی چند قطره تویین ۲۰^۲، به ترتیب به مدت زمان ۳۰ ثانیه و ۲۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. بعد از چهار بار شست‌وشو با آب مقطر استریل، بخش مورد نظر به ریزنمونه‌های ۳-۴ میلی‌متری خرد شده و در محیط کشت تولید کالوس به مدت ۴-۶ هفته قرار گرفتند.

۲- محیط کشت

برای تولید کالوس از محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (۱۳) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر توفوردی و غلظت‌های مختلفی از

Benomyl^۱Malathion^۲Citric acid^۳Ascorbic acid^۴Sodium hypochlorite^۱Tween 20^۲

سیتوکینین‌های زآتین و تی‌دیازورون طبق جدول ۱ استفاده شد. علاوه بر ترکیبات فوق، ۰/۳٪ زغال فعال، ۰/۳٪ ساکارز و ۰/۷٪ آگار اضافه گردید و pH محیط حدود ۵/۷ تنظیم شد. ریزنمونه‌ها در شرایط کنترل شده با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگهداری و هر ۶-۴ هفته یک بار واکشت شدند. در طی دوره رشد تورم بافت‌ها و خصوصیات ظاهری کالوس‌ها از نظر شکل، سفتی و نرمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱- سطوح مختلف هورمونی در محیط کشت برحسب میلی‌گرم‌درلیتر.

تی‌دیازورون	زآتین	تیمار هورمونی در محیط کشت
-	۰/۵	Z ₁
-	۱	Z ₂
-	۱/۵	Z ₃
-	۲	Z ₄
-	۳	Z ₅
۰/۱	-	T ₁
۰/۲	-	T ₂
۰/۳	-	T ₃
۰/۴	-	T ₄
۰/۶	-	T ₅

۳- تجزیه آماری

در محیط کشت پایه حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر توفوردی آزمایشی با ده تیمار هورمونی شامل پنج غلظت از زآتین و پنج غلظت از تی‌دیازورون (جدول ۱) بر روی سه ژنوتیپ خرماي زاهدی، کبکاب و دیری به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی به مدت ۸-۲ هفته اندازه‌گیری گردید. آزمون نرمال

بودن داده‌ها به روش چولوگی^۱ و کشیدگی^۲ انجام گردید. پس از نرمال کردن داده‌های مربوط به جنین‌زایی با استفاده از $\log(x+0.5)$ تجزیه واریانس (ANOVA) با نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن^۳ در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت و نتایج برحسب داده‌های واقعی ارائه گردید.

نتایج و بحث

بافت‌های مریستمی و جوان پس از دو بار واگشت روی محیط‌های مذکور تولید کالوس نمودند. بافت‌های متورم و شفاف بر روی ریزنمونه‌ها و پس از آن کالوس‌های شفاف و روشن در زیر استریومیکروسکوپ دیده شدند که به دنبال آن مراحل اولیه القای کالوس‌های جنین‌زا نیز در برخی از کالوس‌های با ظاهری متراکم، زرد رنگ و دانه‌دار مشاهده گردید. کالوس‌های جنین‌زا سفت و دانه‌ای و به رنگ‌های سفید و زرد کم‌رنگ بودند. بررسی میکروسکوپی جنین‌های غیرجنسی، اشکال کروی، قلبی و کشیده را نشان داد.

میزان رشد کالوس بسته به نوع محیط غذایی و نوع ژنوتیپ متفاوت بود. به طوری که در تیمار تی‌دیازورون، رقم زاهدی در

محیط‌های حاوی ۰/۲ و ۰/۳ میلی‌گرم‌درلیتر تی‌دیازورون، رقم کبکاب در محیط‌های حاوی ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌گرم‌درلیتر تی‌دیازورون، رقم دیری در محیط حاوی ۰/۱ میلی‌گرم‌درلیتر تی‌دیازورون رشد بیشتری از خود نشان دادند. درحالی‌که در تیمار زآتین، رقم زاهدی در محیط‌های حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم‌درلیتر زآتین، رقم کبکاب در محیط‌های حاوی ۲ و ۳ میلی‌گرم‌درلیتر زآتین و رقم دیری در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر زآتین دارای رشد کالوس و نمو بعدی مناسب‌تر بودند. این موضوع از روی مشاهده افزایش حجم کالوس‌ها نیز کاملاً مشهود بود (شکل ۱). درصد تولید کالوس جنین‌زا نیز در مقایسه با غلظت‌های بهینه شده برای تولید کالوس، مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی، کوتاه‌تر شدن مدت زمان تولید کالوس و تشکیل کالوس جنین‌زا (شکل ۲) در سه ژنوتیپ مورد آزمایش نسبت به تیمار شاهد (۱۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر توفوردی) مشهود بود (داده‌ها و نتایج ارائه نشده است).

نتایج تجزیه واریانس برای درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در جدول ۲ آمده است. بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ کالوس‌زایی و جنین‌زایی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ مشاهده شد. بدین معنی که ارقام از لحاظ کالوس‌زایی و جنین‌زایی با هم تفاوت داشتند.

Skewneses^۱
Kourtises^۲
Duncan's test^۳

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس برای درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در غلظت‌های مختلف هورمون‌های رشد در ژنوتیپ‌های خرما.

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)	
		کالوس‌زایی	جنین‌زایی
ژنوتیپ	۲	۱۲۹۱/۲۶**	۶/۲۹**
هورمون	۹	۱۷۸/۰۳**	۰/۴۳ ^{ns}
هورمون × ژنوتیپ	۱۸	۶۲۸/۴۱**	۲/۷۴**
اشتباه آزمایش	۶۹	۵۳/۳	۰/۳۰۳

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

ns: غیر معنی‌دار.

گردید. از لحاظ جنین‌زایی بیشترین درصد جنین‌زایی در رقم کبکاب دیده شد که با میانگین (۳۲/۷۷ درصد) در کلاس a به طور جداگانه قرار گرفت. بعد از آن رقم زاهدی در کلاس b و رقم دیری با حداقل میانگین جنین‌زایی در کلاس c گروه‌بندی شده بودند. بدین ترتیب روندی منطقی بین درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی در ارقام دیده شد.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها از لحاظ درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی به روش دانکن.

ژنوتیپ	درصد کالوس‌زایی	جنین‌زایی
زاهدی	^a ۱۸/۶۷	^b ۱۸/۴۶
کبکاب	^a ۱۹/۶۷	^a ۳۲/۷۷
دیری	^b ۸	^c ۶

* حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین تیمارهای مختلف هورمونی از لحاظ درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی (در سطح احتمال ۰/۰۵).

تیمار	درصد کالوس‌زایی	درصد جنین‌زایی
Z1 ⁺	20.00ab*	23.15a
Z2	13.33dc	15.76a
Z3	8.89d	12.96a
Z4	14.67bcd	19.33a
Z5	12.22d	24.63a
TDZ1 ⁺⁺	22.22a	20.00a
TDZ2	19.05bc	20.24a
TDZ3	20.00ab	25.61a
TDZ4	11.67d	11.67a
TDZ5	13.33cd	17.57a

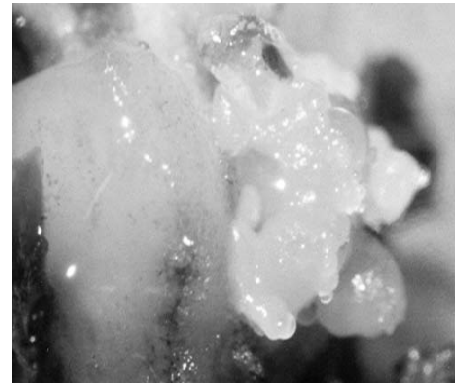
* حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵.

⁺ Z1 تا Z5 به ترتیب تیمار هورمونی زاتین در غلظت‌های ۰/۰۵، ۱،

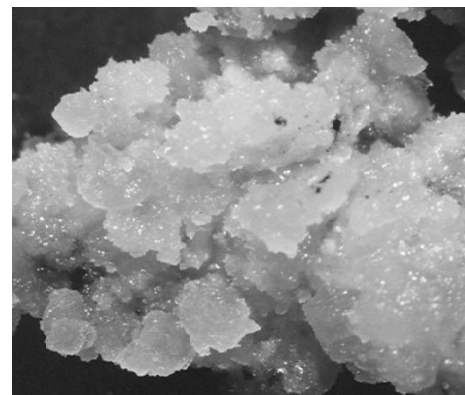
۱/۰۵، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر.

⁺⁺ TDZ1 تا TDZ5 به ترتیب تیمار هورمونی تیدیاژرون در

غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۶ میلی گرم در لیتر.



شکل ۱- القا و تولید کالوس در رقم زاهدی در غلظت‌های بهینه‌شده تی‌دیازورون.



شکل ۲- تولید کالوس جنین‌زا در خرماي رقم کبکاب.

بین ۱۰ سطح هورمونی (۵ سطح زاتین و ۵ سطح تی‌دیازورون)، از لحاظ کالوس‌زایی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ وجود داشت، ولی از لحاظ جنین‌زایی تفاوت معنی‌دار نبود. بنابراین تأثیر هورمون‌ها بر روی کالوس‌زایی متفاوت بود اما بر روی جنین‌زایی این تفاوت معنی‌دار نبود. اثر متقابل هورمون و نوع ژنوتیپ برای هر دو صفت معنی‌دار بود ($P \leq 0.1$). بدین معنی که ژنوتیپ‌ها در سطوح هورمون‌ها عکس‌العمل یکسان نداشتند.

چون ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ هر دو صفت درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۲)، بنابراین مقایسه میانگین آنها برای صفات فوق به روش دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد که نتایج مربوطه در جدول ۳ آمده است. بدین ترتیب رقم کبکاب بیشترین درصد کالوس‌زایی را داشت هر چند که با رقم زاهدی تفاوتی معنی‌داری نداشت و کمترین درصد کالوس‌زایی در رقم دیری مشاهده

هورمون‌ها بر روی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متفاوت بود. بیشترین درصد جنین‌زایی در رقم کبکاب در سطح هورمون زآتین ۳ میلی‌گرم‌درلیتر به میزان ۷۳/۸٪ مشاهده شد. رقم کبکاب در تی‌دیازورون ۰/۴ میلی‌گرم‌درلیتر با میزان ۵۲/۷٪ و رقم زاهدی در تی‌دیازورون ۰/۳ میلی‌گرم‌درلیتر با میزان ۴۹/۵٪، رقم کبکاب در زآتین ۲ میلی‌گرم‌درلیتر با میزان ۴۸/۳٪ و رقم زاهدی در زآتین ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر با میزان ۴۷/۷٪ و کبکاب در تی‌دیازورون ۰/۴ میلی‌گرم‌درلیتر با میزان ۴۶/۷٪ در رتبه بعدی گروه‌بندی شدند. به طور کلی در رقم زاهدی با افزایش غلظت زآتین جنین‌زایی کاهش یافت و در غلظت بیش از ۱ میلی‌گرم‌در لیتر میزان جنین‌زایی متوقف گردید. اما با افزایش غلظت تی‌دیازورون روند جنین‌زایی تا سطح ۰/۳ میلی‌گرم‌در لیتر افزایش ولی از آن به بعد جنین‌زایی متوقف شد. در رقم کبکاب هم با افزایش غلظت زآتین و هم تی‌دیازورون جنین‌زایی افزایش چشم‌گیری نشان داد. بیشترین جنین‌زایی در حداکثر غلظت زآتین و تی‌دیازورون روی داد. اما در رقم دیری فقط در سطح زآتین ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر و تی‌دیازورون ۰/۱ میلی‌گرم‌درلیتر جنین‌زایی اتفاق افتاد، ولی در بقیه سطوح کاملاً متوقف شد.

این تحقیق بیانگر تأثیر نوع ژنوتیپ بر درصد القای کالوس و تشکیل کالوس جنین‌زا بوده و هم چنین تأثیر نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در تولید کالوس و تسریع تشکیل کالوس جنین‌زا را نشان می‌دهد.

شاید بتوان گفت که تا به حال یک محیط بهینه نسبی برای کشت بافت خرما با استفاده از هورمون تی‌دیازورون (به عنوان یک سیتوکینین جدید و با مکانیسم اثر متفاوت) و نیز هورمون زآتین به همراه توفوردی به خصوص در ژنوتیپ‌های استفاده شده در این تحقیق، معرفی نشده (۹) و ترکیب محیط کشت و زمان تشکیل کالوس و در نتیجه تولید جنین رویشی در ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت است (۵، ۳ و ۲۰). در این آزمایش، بافت‌های مرستمی پاجوش، قابلیت کالوس‌زایی و تولید کالوس جنین‌زا را نشان دادند. همچنین مشخص شد که میزان تولید کالوس جنین‌زا تحت تأثیر هر دو فاکتور ترکیبات محیط کشت از جمله نوع و غلظت هورمون‌ها و رقم یا ژنوتیپ قرار دارد. مطالعه در این زمینه برای روشن شدن مکانیسم اثر این

مقایسه میانگین تیمارهای هورمونی برای درصد کالوس‌زایی و جنین‌زایی (جدول ۴) انجام گردید. بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به هورمون تی‌دیازورون با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم‌درلیتر بود. هرچندکه با هورمون زآتین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر و تی‌دیازورون با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم‌درلیتر اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین درصد کالوس‌زایی در زآتین (۱/۵ و ۳ میلی‌گرم‌درلیتر) و تی‌دیازورون (۰/۴ میلی‌گرم‌درلیتر) بود.

با توجه به نتایج می‌توان اظهار نمود که با افزایش غلظت زآتین و نیز تی‌دیازورون روند کالوس‌زایی کاهش یافته است اما به دلیل وجود اثر متقابل معنی‌دار بین ژنوتیپ در سطوح هورمون باید با دقت بیشتر در هر سطح از هورمون و ارقام به طور جداگانه بررسی شود.

اثر متقابل ژنوتیپ در سطح هورمون‌ها معنی‌دار بود. نتایج تأثیر هورمون‌های مورد مطالعه بر روی کالوس‌زایی و جنین‌زایی در ژنوتیپ‌های مختلف در شکل‌های ۳ و ۴ آمده است. بیشترین درصد کالوس‌زایی در رقم زاهدی در سطح هورمون تی‌دیازورون (۰/۳ میلی‌گرم‌درلیتر)، در رقم کبکاب مربوط به سطح هورمون تی‌دیازورون (۰/۴ میلی‌گرم‌درلیتر) و زآتین (۵ میلی‌گرم‌درلیتر) و در رقم دیری در سطح هورمون تی‌دیازورون (۰/۱ میلی‌گرم‌درلیتر) بوده است. در رقم زاهدی، استفاده از زآتین (۳ میلی‌گرم‌درلیتر) و تی‌دیازورون (۰/۶ میلی‌گرم‌درلیتر)، کالوس‌زایی حداقل را به همراه داشت. به نظر می‌رسد با افزایش سطح غلظت زآتین روند کالوس‌زایی در رقم زاهدی کاهش داشته ولی با افزایش غلظت تی‌دیازورون تا سطح ۰/۳ میلی‌گرم‌درلیتر افزایش کالوس‌زایی و بعد از آن کاهش کالوس‌زایی به طور معنی‌دار اتفاق افتاده است اما این روند در رقم کبکاب متفاوت بود.

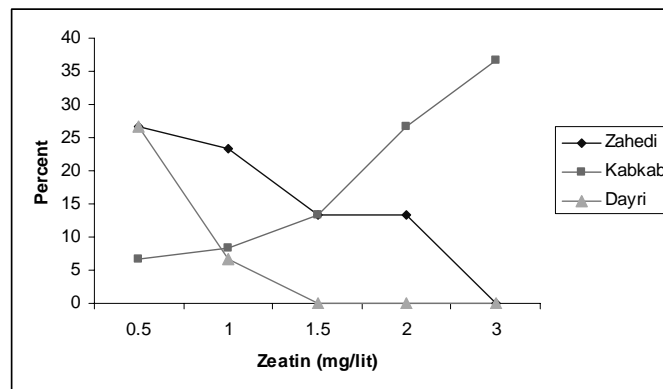
با افزایش غلظت زآتین و تی‌دیازورون، میزان کالوس‌زایی در رقم کبکاب افزایش یافته است، به گونه‌ای که در این رقم، در غلظت‌های پایین حداقل کالوس‌زایی و در غلظت‌های بالا حداکثر کالوس‌زایی اتفاق افتاد. در رقم دیری نیز روند کاهش کالوس‌زایی با افزایش غلظت زآتین و تی‌دیازورون مشاهده شد. از سطح ۱/۵ میلی‌گرم‌درلیتر زآتین به بعد و نیز از سطح ۰/۳ میلی‌گرم‌درلیتر تی‌دیازورون، کالوس‌زایی در این رقم متوقف شده است. تأثیر

عوامل و نیز تاثیر نوع بافت کشت شده ادامه دارد.

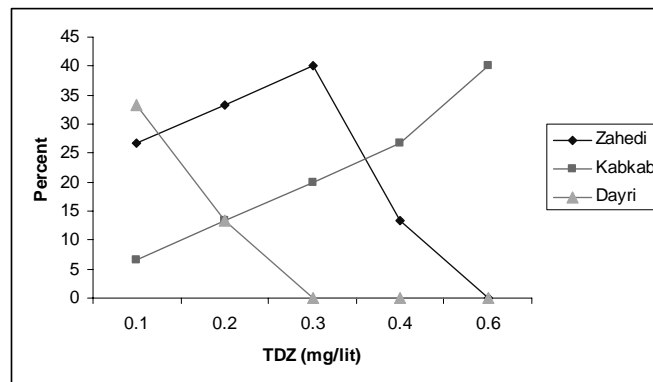
در این بررسی از اکسین توفوردی به طور ثابت و سیتوکینین‌های تی‌دیازورون و زآتین برای جنین‌زایی استفاده شد. غلظت مناسب برای رشد و تکامل جنین‌زایی بسته به نوع، غلظت و ترکیب هورمون‌ها متفاوت می‌باشد. کاربرد سیتوکینین‌ها در ترکیب با اکسین‌ها در تسریع القای کالوس و تشکیل کالوس جنین‌زا در خرما و بسیاری از گیاهان شناخته شده است (۱۱، ۱۲). در غلظت‌های پایین اکسین عموماً رشد بافت و تولید اندام‌های ریشه و برگ را موجب می‌شود، ولی غلظت‌های بالاتر باعث تشکیل کالوس می‌گردد (۱). گرچه ترکیبات مختلف قادر به ایجاد کالوس و جنین‌زایی هستند، اما لازم است که اثرات آن‌ها در مراحل بعدی رشد گیاهانی که از این جنین‌ها به دست می‌آیند نیز، مدنظر قرار گیرند. البته کاربرد جنین‌زایی رویشی محدود به ازدیاد انبوه نخل خرما نبوده، بلکه به عنوان ابزار با اهمیتی در تولید مواد اولیه لازم در مهندسی ژنتیک و اصلاح ارقام موجود از طریق انتقال ژن

و نیز فرآیندهای بیولوژیکی به شمار می‌رود.

با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده می‌توان گفت که کاربرد هورمون‌های سیتوکینینی در کنار توفوردی باعث بهبود کالوس‌زایی در بافت‌های مختلف مورد بررسی شده و در کاهش این دوره در نخل خرما که نیازمند زمان طولانی و نیز مشکل قهوه‌ای شدن بافت‌ها است، مؤثر می‌باشد. در عین حال، ارقام مختلف دارای پتانسیل‌های متفاوتی در جهت تولید کالوس بوده و عامل ژنوتیپ در پروژه‌های کشت بافت همواره باید مد نظر قرار گیرد. البته ژنوتیپ‌های مختلف توانایی متفاوتی در تشکیل کالوس نشان دادند و نوع و غلظت‌های متفاوت هورمون‌ها نیز تاثیرات مهمی در کم‌نمودن دوره زمانی کالوس‌زایی ابراز داشتند. در نهایت، این پروتکل می‌تواند به منظور تولید بهینه کالوس مناسب به عنوان پیش‌نیاز ریزازدیادی و نیز تراریختی در گونه نخل خرما مورد بهره‌برداری قرار گیرد.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف زآتین بر درصد کالوس‌زایی سه ژنوتیپ خرما.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف تی‌دیازورون بر درصد کالوس‌زایی سه ژنوتیپ خرما.

سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز بین‌المللی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی (ICGEB) بابت تامین منابع مادی این مطالعه (گرات - CRP/IRA03) و نیز حمایت‌های دریافت‌شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری (طرح ۲۱۶) قدردانی و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

- Biotechnology in Plant Sciences. Eds, Taji, A. and Williams, J.R. University of New England Publications Unit. Australia. pp. 41-53.
- Huan Le, van Tuong, Takamura T. and Tanaka M. (2004). Callus Formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in cymbidium orchid. *J. of Plant science*. 166: 1443-1449.
- Kackar, N. L., Solanki, K. R. and Joshi, S. P. (1989). Micro propagation of date palm cv. Khadrawy using Tissue culture Technique. *Ann. Of Arid Zone*. 28(182):137-191.
- Mater, A. A. (1983). Plant Regeneration from callus culture of (*Phoenix dactylifera* L.). *Date palm J.* 1 (2): 57-77.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- Reynolds, J. F. and Murashige, T. (1979). Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In Vitro*. 15: 383-387.
- 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.
- Tisserat, B. (1979). Propagation of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. *J. Expe. Bot.* 30 (119):1275-1283.
- Tisserat, B. and Demason, D.A. (1980). A Histological study of Development of Adventive's Embryos in organ culture of *Phoenix dactylifera* L.. *Ann. Bot.* 46:465-472.
- 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.
- Veramendi, J. and Navarro, L. (1997). Influence of explants sources of adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) on embryogenic callus formation. *J. Hort. Sci.* 72: 665-671.
- Williams, J.R. (2002). Plant tissue culture- its importance to agriculture and horticulture. In: *The Importance of Plant Tissue Culture and Biotechnology in Plant Sciences*. Eds, Taji, A. and Williams, J.R., University of New England Publications Unit. Australia. pp. 91-103.
- Zaid, A. and Tisserat, B. (1983). Morphogenetic Responses obtained from a variety of somatic explants Tissue of Date Palm. *Bot. Mag.* 96: 67-73.
- ناظری، س.، خوشکام، ص.، افشاری، م.، مدیری، م.، شکیب، ع. و مجیدی، ا. (۱۳۷۱). تولید جنین رویشی در ارقام خرماي استعمران و کبکاب در شرایط کنترل شده، *مجله تحقیقات کشاورزی «نهل و بذر»*، ج ۸، ش ۳ و ۴: ۲۰-۱۶.
- Alkhateeb, A. (2008). Comparison Effects of Sucrose and Date Palm Syrup on Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 4 (1): 19-23.
- Al-Khayri, J. M. (2001). Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *In Vitro Cell, Dev. Biol-Plant*. 37(4): 453-456.
- Asemota, O., Eke R.C. and Odewale, O.J. (2007). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (20), pp. 2353-2357.
- Bajaja, Y. (1992). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micro propagation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 18: 471-492.
- Beauchesne, G. (1982). Vegetative propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by in vitro culture, proceeding of the first symposium on date palm. King. Facial University Saudi Arabia. 698-699.
- Dolendro singh, N., Sahoo, L., Sarin, N. B. and Jaiwal, P. K. (2003). The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Mill sp). *J. of Plant science*. 164: 341-347.
- Eke, R. C., Akomeah, P. and Asemota, O. (2005). Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from apical meristem tissues from 'zebia' and 'loko' landraces. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (3), pp. 244-246.
- Eshraghi, P., Zarghami, R., Ofoghi, H. and Mirabdulbaghi, M. (2005). Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. *African J. Biotech.* 4 (11): 1309-1312.
- Gorst, J.R. 2002. Plant tissue culture- its importance in biology. In: *The Importance of Plant Tissue Culture and*