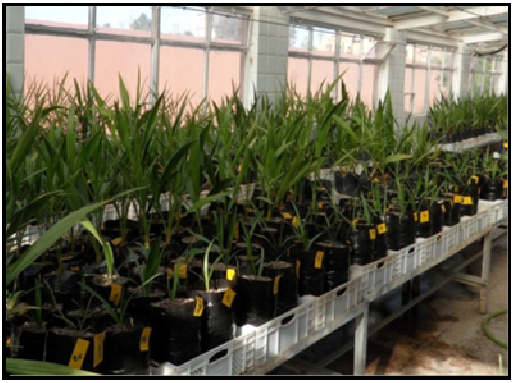
جمهوری اسلامی ایران
وزارت جهادکشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسهٔ تحقیقات علوم باغبانی
پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری

نشریه فنی

مروری بر امکان استفاده از تکنیک‌های کشت بافت در اصلاح نخل خرما

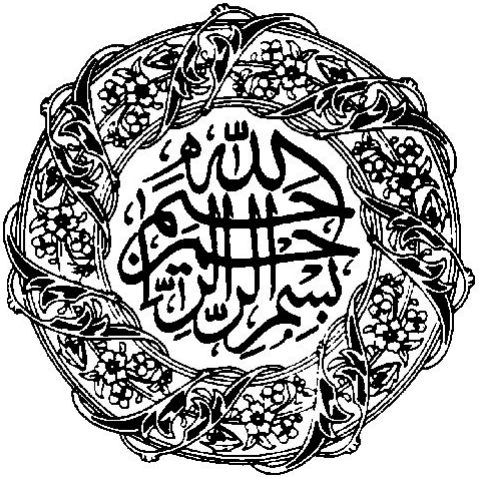


نویسندگان:
مریم بروجردنیا
سید سمیح مرعشی
اعضای هیئت علمی پژوهشکده خرما
و میوه‌های گرمسیری

زمستان ۱۳۹۶

نشانی: اهواز، کیلومتر ۱۰ جادهٔ ساحلی اهواز- خرمشهر
صندوق پستی: ۱۶-۶۱۳۵۵
تلفن : ۳۵۷۱۰۵۴۰ – ۰۶۱ دورنگار : ۳۵۷۱۰۵۴۱- ۰۶۱
پست الکترونیک : dptfrii@yahoo.com
وبگاه: http://khorma.areo.ir

A
B
C
D



نشریه فنی

مروری بر امکان استفاده از تکنیک های کشت بافت در اصلاح نخل خرما

نویسندگان:

مریم بروجردنیا

سید سمیح مرعشی

اعضای هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی

پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری

شناسنامه نشریه:

وزارت جهادکشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات علوم باغبانی

پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری

عنوان نشریه: مروری بر امکان استفاده از تکنیک‌های کشت بافت در اصلاح نخل خرما

نویسندگان: مریم بروجردنیا و سید سمیح مرعشی

ویراستاران: عزیز تراهی و احمد مستعان

ناشر: پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری

شماره نشریه:

شمارگان (تیراژ): ۱۵ نسخه

تاریخ انتشار:

فهرست مطالب

عنوان صفحه

مقدمه ۱
کاربردهای نوین کشت بافت در اصلاح گیاهان ۲
کشت جنین ۳
کاربردهای کشت جنین ۶
غلبه بر عدم زنده مانی جنین ۶
غلبه بر خواب بذر و کوتاه کردن سیکل اصلاح ۶
غلبه بر عقیمی بذر ۷
امتزاج پروتوپلاستی/دورگ گیری سوماتیکی ۷
تولید گیاهان هاپلوئید ۱۱
تولید گیاهان عاری از بیماری ۱۴
تولید بذر سنتزی ۱۷
تنوع سوماکلونال و انتخاب درون شیشه ای ۱۸
نگهداری ژرم پلاسم ۲۳
انبار سرد ۲۴
نگهداری تحت انجماد ۲۵
نتیجه‌گیری ۲۸
منابع ۲۹

مقدمه

امروزه برای رفع تقاضای روزافزون جهان به مواد گیاهی، کاربرد کشت بافت در بخش کشاورزی و صنعت ضروری می‌باشد. در حال حاضر، کشت بافت سهم بسیاری در پیشرفت‌های کشاورزی ایفا می‌کند و ابزارهای جدیدی را برای کمک به اصلاح‌گر در کارهای اصلاحی جدید از قبیل تولید و تکثیر گیاهان هموزیگوت، گیاهان عاری از بیماری و القای تنوع سوماکلونال[1] در اختیار قرار می‌دهد. از آنجایی که اکنون امکان تغییرات ژنتیکی جدید از طریق کشت بافت وجود دارد، می‌توان از این روش برای تولید ژنوتیپ‌های پایدار جدید استفاده کرد(۳).

در مورد نخل خرما، اصلاح آن به دلیل دوره جوانی طولانی و هتروزیگوتی بالا محدود شده است. اصلاح نخل خرما به روش‌های کلاسیک بسیار طولانی و زمان‌بر بوده به‌طوری‌که برای انجام ۳ تلاقی برگشتی[2]، بیش از ۳۰ سال زمان مورد نیاز می‌باشد تا پاجوش‌های اولیه از تلاقی درون گونه‌ای به‌دست آیند و برای تولید پاجوش‌های مورد نیاز جهت آزمایش در سطح مزرعه تعداد زیادی گیاه مادری لازم است. اگر هدف اصلاح عملکرد یا کیفیت میوه نخل خرما باشد حتی زمان بیشتری برای اصلاح آن باید صرف نمود. بنابراین در ۲۰ سال اخیر تلاش‌های بسیاری در جهت تکثیر خرما از طریق کشت بافت صورت

1. Somaclonal variation
2. Backcross

گرفته است، تا علاوه بر تولید انبوه آن، از این روش جهت اصلاح و بهبود آن استفاده کنند(۵).

کاربردهای نوین کشت بافت در اصلاح گیاهان

مهمترین کاربردهای نوین کشت بافت در زمینه اصلاح گیاهان که در این نوشتار به آن‌ها پرداخته شده است، به شرح زیر می‌باشد:

- کشت جنین[۱]
- امتزاج پروتوپلاست[۲]/دورگ گیری سوماتیکی[۳]
- تولیدگیاهان هاپلوئید[٤]
- تولید گیاهان عاری از بیماری
- تولید بذرهای سنتری[۵]
- تنوع سوماکلونال
- نگهداری ژرم پلاسم[٦]

1 . Embryo culture
2. Protoplast fusion
3. Somatic hybridization
4. Haploid
5 . Synthetic seed
6 . Germplasm conservation

کشت جنین

کشت جنین به معنی جداسازی بدون آلودگی جنین و انتقال آن بـر روی محـیط کشـت مناسـب بـرای رشـد در شـرایط کشـت بهینـه اسـت(۱). تلاقـی‌هـای هیبریداسیون گسترده می‌توانند باعث تولید بذرهای چروکیده کوچکی گردند که نشان می‌دهد تلاقی رخ داده ولی بذر قادر به نمو نمی‌باشد. نجات جنین یکی از اولین و موفق‌ترین تکنیک‌های کشت بافت می‌باشد که برای کمـک بـه نمـو آن دسته جنین‌های گیاهی به‌کار می‌رود که در آنها ضـعف آندوسـپرم باعـث سـقط جنین و در نهایت تولید بذر غیرزنده می‌شود. این روش عمدتا برای تلاقی‌های بین گونه‌ای وجنسی بکار می‌رود کـه بـذرهای آن‌هـا در شـرایط طبیعـی سـقط می‌گردد. بنابراین نجات جنین در روش‌های اصلاحی جدید گیاه، در نمو جنـین بسیاری از هیبریدهای بین‌گونه‌ای و بین جنسی نقش مهمی ایفا مـی‌کنـد. سـقط جنین به عنوان عامل اصلی در ناسازگاری بین گونـه‌ای گیاهـان در نظـر گرفتـه شده است. بنابراین تکنیک کشت جنین به‌طور موفقیت‌آمیزی برای غلبه بـر ایـن مشکل جدی و حل مشکلاتی از قبیل بذر نشینی کم، خواب بذر و جوانـه زنـی آهسته بذر بکار می‌رود(۱۷). اخیرا، به‌طور موفقیت‌آمیزی از طریق تکنیک کشت جنین، تعدادی از هیبریدهای بین گونـه‌ای و بـین جنسـی در محصـولات مهـم کشـاورزی از قبیـل پنبـه، جـو، گوجـه فرنگـی، بـرنج، *Triticum*x *Secale*،

Tripsacumx Zea، *Hordeumx Secale* و بعضی گونه‌های براسی‌کا[1] انجام شده است(۳۹ و ٥٤).

بنابراین تکنیک کشت جنین، اصلاح‌گر را قادر می‌سازد به‌طور موفقیت‌آمیزی تلاقی‌های وسیع را با تعداد بیشتری از گونه‌های گیاهی وحشی مرتبط انجام دهد. بنابراین امکان دسترسی به طیف گسترده‌ای از ژن‌ها برای بهبود ژنتیکی محصولات گیاهی وجود دارد(۳).

کشت جنین خرما مبنای پیشرفت‌های اخیر در تکثیر کلونی نخل خرما بوده است. مطالعات بر روی کشت جنین بذری نخل خرما برای اولین بار در دهه ۱۹۷۰ آغاز شد و از طریق جوانه‌زنی درون شیشه‌ای جنین‌های بذری، گیاهچه‌های خرما بدست آمدند(٤٦و٤٩). ریوونی[2] در سال ۱۹۷۹، تشکیل کالوس و نمو ریشه را از ریزنمونه‌های کوتیلدونی جنین خرما در محیط حاوی نفتالین استیک اسید[3] گزارش نمود(٤٣). عمار و بنبادیس[4](۱۹۷۷) از جوانه‌زنی درون شیشه‌ای کوتیلدون‌های جنین‌های بذری خرما کالوس‌های اندام‌زا ایجاد کردند(۸). تیسرات[5] در سال ۱۹۷۹ موفق شد، با استفاده از جنین‌زایی بدنی از جنین‌های بذری خرما در محیط کشت غنی از 2,4-D[6] و همچنین محیط عاری

1. Brassica
2. Reuveni
3. Naphthaleneacetic acid (NAA)
4. Ammar and Benbadis
5.Tisserat
6. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

از هورمن، گیاهچه‌های خرما را از باززایی کالوس تولید نماید(٤٩). سودهرسان[1] و همکاران (٢٠٠٩)، تکنیک کشت جنین را برای نجات جنین‌های خرمای هیبریدی در مراحل مختلف نمو میوه توسعه داده‌اند(٤٦).

نخل خرما به راحتی با سایر گونه‌های جنس Phoenix تلاقی می‌گردد. در بسیاری از موارد، در هیبریدهای بین‌گونه‌ای نقص در نمو آندوسپرم منجر به سقط جنین و عدم نمو کامل بذر می‌گردد. در هیبرید بین نخل خرما با نخل خرمای پاکوتاه، کشت جنین درون شیشه‌ای تنها راه ممکن برای تولید گیاهان هیبریدی بود. در روش‌های نجات جنین، محیط غذایی مصنوعی به عنوان جایگزین آندوسپرم بکار می‌رود و با این روش نمو جنین انجام می‌گیرد. در روش کشت جنین، جنین‌های خرما به صورت مستقیم بر روی محیط کشت مناسب قرار می‌گیرند. موفقیت در کشت جنین به چندین فاکتور از قبیل مرحله نمو جنین، اجزای محیط کشت و شرایط محیطی کشت بستگی دارد(٤٥). نوع محیط مورد نیاز برای نجات جنین به شدت، وابسته به مرحله نمو جنین می‌باشد. جنین‌های جـوان به محیط کشت پیچیـده‌ای با غلظت‌های بالایی از ساکـارز نیاز دارند، درصورتی‌که اغلب جنین‌های بالغ می‌توانند در محیط کشت ساده با غلظت پائینی از ساکارز نمو یابند(٤١). در مورد کشت جنین هیبرید نخل خرما، جنین‌های بذری بالغ در محیط کشت پایه MS با غلظت ٢٠ تا ٣٠ گرم در لیتر ساکارز جوانه می‌زنند، درصورتی‌که جنین‌های جوان در مرحله

1. Sudhersan

کروی به غلظت بالایی ساکارز و هورمن‌های رشد برای بلوغ جنین نیازمند می‌باشند. تحقیقات نشان می‌دهد جنین‌های بذرهای خرما در مرحله خلال انتخاب مناسبی برای تولید گیاه از طریق روش نجات جنین در هیبریدهای بین گونه‌ای نخل خرما می‌باشند(٤٦).

کاربردهای کشت جنین

غلبه بر عدم زنده مانی جنین

در برنامه‌های هیبریداسیون بین گونه‌ای و جنسی، ناسازگاری غالبا مانع نمو طبیعی بذر و تولید هیبرید می‌گردد. اگرچه در اغلب این موارد باروری موفق و نمو اولیه جنین انجام می گیرد، ولی تعدادی از حوادث پیش‌بینی نشده بعدی سرانجام منجر به مرگ جنین و تشکیل بذرهای چروکیده می‌گردد. علت اصلی سقط زودهنگام جنین عدم توسعه اندوسپرم طبیعی می‌باشد که باعث گرسنگی جنین و سقط آن می‌گردد. بنابراین جداسازی جنین‌های نابالغ هیبریدها قبل از سقط و کشت آن‌ها به روش کشت بافت از موانع ناشی از آن جلوگیری می‌کند(١٦). کاربردی‌ترین و متداول‌ترین کشت‌های جنینی به منظور افزایش امکان هیبریدهای نادر از طریق نجات جنین تلاقی‌های ناسازگار می‌باشد(٣).

غلبه بر خواب بذر و کوتاه کردن سیکل اصلاح

دوره‌های طولانی خواب در بذرها به‌ویژه در محصولات و گیاهان باغبانی، کارهای اصلاحی را به تاخیر می‌اندازد. استفاده از تکنیک کشت جنین، سیکل

اصلاحی در این گیاهان را می‌تواند کوتاه نماید(۱٦)، برای مثال کشت جنین به‌طور موفقیت‌آمیز برای غلبه بر خواب ناشی از اثر بازدارنده‌ها در بذرهای زنبق مورد استفاده قرار گرفت و سیکل زندگی زنبق از ۲ تا ۳ سال به کمتر از ۱ سال کاهش یافت. بنابراین کشت جنین موجب تسریع جوانه‌زنی می‌گردد. جوانه‌زنی جنین خارج شده به عنوان یک آزمون قابل اعتماد برای آزمایش قدرت بذرها به ویژه در طی دوره رکود در نظر گرفته می‌شود(۳).

غلبه بر عقیمی بذر

در اوایل دوره رسیدن میوه، بذر نمی‌تواند جوانه بزند به علت اینکه جنین‌های آن‌ها هنوز نابالغ می‌باشند. استفاده از روش کشت جنین ممکن است باعث تولید دانهال از بذرهایی گردد که در اوایل دوره رسیدن میوه عقیم می‌باشند (هسته‌دارانی مانند هلو، آلو و زردآلو). نارگیل‌های Makapuno بسیار گران قیمت می‌باشند و به علت ویژگی‌های اندوسپرم آنها بسیار طعم مطلوبی دارند. تحت شرایط عادی، بذرهای نارگیل قادر به جوانه‌زنی نمی‌باشند اما با تکنیک کشت جنین به‌طور موفقیت‌آمیزی می‌توانند رشد نمایند(۱و۳).

امتزاج پروتوپلاستی/دورگ گیری سوماتیکی

از طریق تکنیک امتزاج پروتوپلاستی بر موانع ناسازگاری موجود در نوترکیبی جنسی درون گونه‌ای یا بین گونه‌ای غلبه می‌گردد. با استفاده از تکنولوژی امتزاج پروتوپلاستی، امکان تلاقی دو گونه متفاوت از نظر ژنتیکی وجود دارد.

امتزاج پروتوپلاستی ابزار جدیدی را برای اصلاح گیاه و بهبود محصولات ارائه می‌دهد، از طریق هیبرید بین گونه‌ای و درون گونه‌ای که به روش‌های سنتی امکان‌پذیر نمی‌باشد. این تکنیک شامل امتزاج پروتوپلاست‌های دو گونه گیاهی متفاوت از نظر ژنتیکی و تولید گیاه نوترکیبی جدید می‌باشد. امتزاج پروتوپلاست یکی از تکنیک‌های کارآمد برای انتقال ژن‌هایی با صفت مطلوب از یک گونه گیاهی به گونه دیگر می‌باشد، بنابراین می‌تواند کمک شایانی در برنامه‌های اصلاحی محصولات ایفا نماید. یکی از اولین موفقیت‌های این تکنولوژی تولید Pomato (امتزاج گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی) بود. علاوه بر این، امتزاج پروتوپلاستی بین گونه‌ایی، بین محصولاتی مانند هویج و اطلسی، ذرت و سورگوم، سویا و جو صورت گرفته است. اخیرا، تکنولوژی امتزاج پروتوپلاستی راهی را برای تولید گیاهان هیبریدی منحصر به فرد با حل مشکل ناسازگاری جنسی گشوده است. این روش کاربرد بسیاری در صنعت باغبانی به‌منظور توسعه هیبریدهای جدید با افزایش عملکرد میوه و مقاومت بهتر به تنش‌های زنده و غیر زنده ایفا می‌کند.

به طور کلی، با توجه به پیشنهاد اوانس و براوو[1]، تولید گیاهان هیبریدی جدید از طریق امتزاج پروتوپلاستی باید در ٤ حوزه متمرکز شود:

- صفات و خصوصیات مهم در زمینه کشاورزی

1 . Evans and Bravo

- دستیابی به ترکیباتی که فقط می‌توان از طریق امتزاج پروتوپلاستی ایجاد شوند.
- هیبریدهای سوماتیکی که باید در برنامه اصلاحی سنتی قرار گیرند.
- گسترش باززایی پروتوپلاست به طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی.

به‌هرحال در این تکنولوژی محدودیت‌ها و ملاحظاتی وجود دارد شامل:

- تلاقی بین گیاهانی که از نظر ژنتیکی به طیف گسترده‌ای مربوط می‌شوند و ناسازگاری ژنتیکی دارند، امکان پذیر نمی‌باشد.
- در بعضی تلاقی‌های گسترده، امکان حذف کروموزوم‌هایی از سلول هیبرید وجود دارد.
- در آزمایش‌های امتزاج پروتوپلاستی درصد امتزاج بین پروتوپلاست دو والد مختلف بسیار پائین است.
- برای شناسایی، انتخاب و جداسازی هیبرید در سطح کشت، روش استاندارد و بهینه شده‌ای که برای همه کاربرد قابل استفاده‌ای داشته باشد موجود نیست(۱۷).

در گیاهان دولپه، پروتوپلاست‌ها می‌توانند از قسمت‌های مختلف گیاه از قبیل برگ‌ها، کوتیلدون، ساقه، ریشه‌ها و گل‌ها گرفته شوند. درصورتی‌که در گونه‌های تک لپه از سوسپانسیون سلولی جنینی و کالوس برای جداسازی پروتوپلاست استفاده می‌شود. در خرما کشت‌های کالوس جنین‌زا برای

جداسازی پروتوپلاست مناسب می‌باشند(۱۸). جداسازی پروتوپلاست تحت‌تاثیر ژنوتیب، مواد گیاهی، ترکیب محلول آنزیمی و شرایط جداسازی قرار می‌گیرد(۱۱).

امتزاج پروتوپلاستی در سطح درون گونه‌ای و بین گونه‌ای در جهت غلبه بر ناسازگاری‌های جنسی به‌کار می‌رود، اگرچه این روش هنوز برای اصلاح خرما استفاده نشده است اما تحقیقات بسیاری در ارتباط با بهینه‌سازی کشت پروتوپلاست در خرما صورت گرفته است تا در آینده بتوان از روش امتزاج پروتوپلاستی برای اصلاح این گیاه استفاده نمود(۱۱).

چابان[۱] و همکاران در سال ۲۰۰۷، تشکیل کالوس از پروتوپلاست ارقام خرمای دگلت‌نور[۲] و تاکربوچ[۳] گزارش کردند(۱۸). به‌طور مشابه ریزکالا[٤] و همکاران در سال ۲۰۰۷ موفق به القای کالوس از پروتوپلاست‌های برحی[٥] و زقلول[٦] شدند(٤٤). یکی از معتبرترین ابزار برای تولید گیاهان مقاوم به همراه کیفیت میوه خوب، اصلاح ژنتیکی می‌باشد. این روش با انتخاب ارقام مقاوم و ارقامی با کیفیت میوه مطلوب از طریق صفات زراعی و سپس ترکیب صفات هر دو در یک رقم از طریق هیبرید سوماتیکی، باعث بهبود گیاه گردد. همچنین از طریق کشت پروتوپلاست امکان انتقال ژن‌های مقاوم از یک رقم یا گونه با

1 .Chabane
2 . Deglet Noor
3 . Takerboucht
4. Rizkalla
5. Barhee
6. Zaghloul

مقاومت بالا (به‌ویژه مقاومت به بیماری) از طریق مهندسی ژنتیکی وجود دارد. تولید موفقیت‌آمیز ارقام مقاوم می‌تواند استفاده از مواد شیمیایی برای کنترل آفات و بیماری‌ها در نخل خرما را کاهش دهد. تلاقی‌های کلاسیک معمولا زمان بالایی (۱۵-۲۰ سال) برای تولید رقم جدید نیاز دارند، بنابراین دورگ‌گیری سوماتیکی می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. هیبرید سوماتیکی به‌طور موفقیت‌آمیزی در موز و در خانواده سولانانسه[1] برای القای مقاومت به بیماری از طریق انتقال مقاومت از واریته‌های نسبتا وحشی به واریته‌های کشت شده انجام شده است(۱۱).

تولید گیاهان هاپلوئید

گیاهان هاپلوئید به علت وجود ژن‌های تک آللی در کروموزوم‌های ژنوم گیاهی می‌توانند بعضی از مشکلات مربوط به مطالعات ژنتیکی گیاهان را حل نماید. با دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های گیاهان هاپلوئید، گیاهانی هموزیگوت حاصل می‌گردد. بنابراین تکنیک کشت بافت می‌تواند گیاهانی هموزیگوت را دوره زمانی نسبتا کوتاه‌تر از طریق کشت پروتوپلاست، بساک و میکروسپور در مقابل روش‌های اصلاحی سنتی تولید نماید(۳۵).

هاپلوئیدها به صورت خودبه‌خودی یا القایی کروموزم‌های آنها مضاعف می‌شود. گیاهان هاپلوئیدی مضاعف[2] از نظر ژنتیکی خالص می‌باشند و در

1. Solanaceae
2. Doubled haploid

برنامه‌های اصلاحی تولید ارقـام جدیـد کـاربرد بسـیاری دارنـد(٥٤). تـورپ و براون[1] بیان کردند که گیاهان هاپلوئید مورد توجه اصلاح‌گـران مـی‌باشـند زیـرا امکان بیان صفات ژنتیکی مغلوب یا ژن‌های جهش‌یافته مغلوب را می دهند کـه بسیاری از آنها برای انتخاب صفات مطلوبی مانند مقاومت به بیماری، حشـرات، آنتی بیوتیـک‌هـا، شـوری و... اهمیـت دارنـد(١٨). همچنـین گیاهـان هاپلوئیـد مضاعف می‌تواننـد بلافاصـله بـه عنـوان لایـن‌هـای اصـلاحی هموزیگـوت در برنامه‌هـای اصـلاحی مـورد اسـتفاده قـرار گیرنـد. تولیـد لایـن‌هـای اصـلاحی هموزیگوت از طریق کشت بافت بسیار در وقت و هزینه نسـبت بـه روش‌هـای معمولی کاراتر می‌باشند. امروزه تکنولوژی تولید گیاهان هاپلوئید در برنامه‌هـای اصلاحی گیاهی با سرعت بخشیدن به تولید لاین‌هـای هموزیگـوت و غلبـه بـر محدودیت‌های خواب بذر و جنین اهمیت بسزایی دارد(١٢).

دو روش درون شیشه‌ای برای تولید گیاهان هاپلوئید مورد استفاده قرار می‌گیرد:

- کشت تخمدان جداشده و تخمک
- کشت دانه گرده و بساک

در حال حاضر، در بسیاری از گونه های گیاهی برای تولید گیاهان هاپلوئید از کشت دانه‌گرده، میکروسپور و بساک استفاده شده است. این روش در گیاهانی از قبیل غلات (جو، ذرت، برنج، چاودار، چاودم و گندم)، محصولات علوفه‌ای(یونجه و شبدر)، میوه‌ها (انگور و توت فرنگی)، گیاهان دارویی (گل

3. Thorpe and Brown

انگشت دانه‌ای، بذرالبنج)، گیاهان زینتی (ژربرا و آفتابگردان)، دانه‌های روغنی (کلزا و شلغم)، درختان (سیب، لیچی، صنوبر و کائوچو)، محصولات مزرعه‌ای (پنبه، نیشکر و توتون) و محصولات سبزی (مارچوبه، کلم‌بروکلی، کلم‌پیچ، هویج، فلفل، سیب‌زمینی، چغندرقند، سیب‌زمینی‌شیرین، گوجه فرنگی و نخودفرنگی) مورد استفاده قرارگرفته است. ارقام گندم هاپلوئید حاصل از کشت بساک در فرانسه و چین منتشر شده‌اند. در برنامه اصلاحی ذرت در چین از طریق هاپلوئیدهای حاصل از کشت بساک، ۵ تا ۷ سال تولید اینبرد لاین‌های سریع‌تر صورت گرفته است. گزارش‌های مشابه برای چاودم و گیاه باغبانی فریزریا بدست آمده است(۱۷).

تولید گیاهان هاپلوئید در نخل خرما هنوز انجام نشده است. کشت گل یکی از راه‌ها برای القای تولید جنین‌های بدنی هاپلوئید خواهد بود.

مطالعات اختصاص یافته بر روی کشت بساک و تخمک خرما بسیار نادر می‌باشد، اما تحقیقات نشان می‌دهد از میکروسپورهای نابالغ تحت شرایط مختلف، تقسیم سلولی صورت گرفته و جنین‌های کروی تشکیل شده است. بعضی تحقیقات کاربرد تیمار سرمایی و ترکیب اکسین و سیتوکنین را به عنوان عناصر کلیدی برای تولید جنین‌ها ثابت نموده‌اند اما جنین‌های تشکیل شده قادر به نمو نبوده‌اند(۱۹). مشکل اصلی در چنین تحقیقاتی دوره کوتاه گلدهی می‌باشد که امکان داشتن بساک‌هایی با میکروسپورهای تک هسته‌ای تازه و به

میزان کافی را نمی‌دهد. به‌علاوه بساک‌های نخل خرما به‌طور معمول قهوه‌ای می‌شوند و چند هفته پس از کشت آن‌ها می‌میرند(٢٤).

همچنین تحقیقاتی در زمینه تولید گیاهان خرمای هاپلوئید با استفاده از کشت تخمک تلقیح نشده صورت گرفته است. اندازه کوچک تخمک‌ها، قهوه‌ای شدن و مرگ آن‌ها از مهمترین عوامل محدود کننده در این قبیل کشت‌ها بوده است. استفاده از زغال فعال برای اطمینان از بقای طولانی مدت آن‌ها و تشکیل کالوس و ریشه ضروری می‌باشد(٢٣). در خرما، گل‌هایی که از اسپات‌های بسته گرفته شده‌اند و در آن‌ها کیسه‌های جنینی حاوی سلول‌های تمایز نیافته تشکیل شده، بهترین نتایج را می‌دهند.

تحقیقات صورت گرفته بر روی کشت بساک نارگیل و خرما تاکنون ناموفق بوده‌اند. همچنین کشت تخمک در نارگیل موفقیت‌آمیز نبوده است(٤٨).

تولید گیاهان عاری از بیماری

محصولات گیاهی به‌ویژه واریته‌هایی که از طریق رویشی تکثیر می‌شوند عموما به پاتوژن آلوده می‌شوند. یکی از کاربردهای کشت بافت تولید، نگهداری و تکثیر گیاهان عاری از پاتوژن، توسط کشت مریستم می‌باشد. این تکنیک اولین بار توسط مورل و مارتین[1] بر روی کوکب برای حذف ویروس مورد استفاده قرار گرفت و منجر به تولید گیاهان عاری از پاتوژن گردید. اخیرا کشت مریستم

1 . Morel and Martin
2 . Lizarraga

بـــه‌طـــور موفقیـــت‌آمیـــزی بـــرای حـــذف ویـــروس در بســـیاری از گیاهـــان (سیب‌زمینی، نیشکر، توت فرنگی) به‌کاربرده شده است(۳). لیزاراگا[1] و همکاران بیان کردند پاتوژن‌های گیاهی مانند نماتدها، قارچ‌ها، بـاکتری‌هـا و ویـروس‌هـا می‌توانند از گیاهان بیمار به گیاهان سالم انتقال یابند اما همه سلول‌هـای گیـاهی آلوده نمی‌شوند، به‌طـوری‌کـه بعضـی سـلول‌هـای مریسـتمی عـاری از بیمـاری می‌باشند(۳۲). توزیع پاتوژن‌های مختلف در گیاه بیمار بسیار متفاوت مـی‌باشـد. پراکنـــدگی ویـــروس پیچیـــدگی بـــرگ ســـیب‌زمینـــی (*Pseudomonas solanacearum*) و مایکوپلاسما به بافت‌های آونـدی گیـاه محـدود مـی‌شـوند. *Erwinia carotovora* و ویـروس X سـیب‌زمینـی در بافـت‌هـای آونـدی و غیرآوندی وارد می‌شوند. بنابراین همه سلول‌ها در گیاهان بیمار به پاتوژن آلـوده نمی‌شوند، گاهی بافت‌های مریستمی ریشه و ساقه‌های گیاهـان آلـوده عـاری از ویروس هستند برای مثال در گیاهان آلوده به ویروس X سیب‌زمینی و ویـروس Tobacco rattle، فقط مریسـتم انتهـایی و پریموردیـای بـرگ جـوان عـاری از ویروس می‌باشند(۳ و ۱۷). علت دقیق آن مشخص نیست، اگرچه عقیده بر ایـن است که یک یا چند عامل مسئول می‌باشد از قبیل:

- فعالیت متابولیکی بالا

به علت فعالیت‌های متابولیکی بالا در این سلول‌ها، ویروس‌ها قادر به کنترل فرایندهای بیوسنتر در گیاه میزبان نمی‌باشند.

- عدم سیستم آوندی

ویروس‌ها از طریق سیستم آوندی به سرعت در گیاه میزبان پراکنده می‌شوند. ویروس‌های محدود شده به فلوئم (PLRV[1]) نمی‌توانند به بافت‌های مریستمی به علت عدم وجود تمایز سلولی حمله کنند. در ناحیه مریستمی، ویروس‌هایی که بافت‌های غیرآوندی را آلوده می‌سازند، از سلولی به سلول دیگر از طریق پلاسمودسماتا پراکنده می‌گردند. این فرایند بسیار آهسته می‌باشد، بنابراین باعث شده که ویروس‌ها برای آلوده کردن سلول‌هایی که به سرعت تکثیر می‌شوند دچار مشکل شوند.

- غلظت اکسین بالا

بافت‌های مریستمی گیاه دارای غلظت بالاتری از اکسین نسبت به سایر بافت‌ها می‌باشند. گزارش شده که اکسین از تکثیر ویروس‌ها جلوگیری می‌کند، بنابراین جداسازی و کشت مریستم‌های انتهایی، همراه با حرارت درمانی یا شیمی درمانی، به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تولید مواد گیاهی فاقد ویروس و عاری از پاتوژن بکار می‌رود(۳).

در مورد خرما، بسیاری از ارقام معروف از قبیل مجول[2]، دگلت نور و بوفگوس[3] به بیماری Bayoud که توسط قارچ *Fusarium oxysporum* حساس

1 . Potato leafroll virus

2. Medjool
3. Boufegouss

می‌باشند. از طریق کشت بافت‌های مریستمی یا گل‌آذین خرما می‌توان گیاهان عاری از بیماری تولید نمود(۲۲).

تولید بذر سنتزی

بذرهای سنتزی یا مصنوعی عبارتند از جنین‌های سوماتیکی محصور شده در پوشش، جوانه‌های ساقه و یا هر گونه بافتی که بتواند برای رشد به عنوان بذر به‌کار رود و دارای توانایی تولید گیاه تحت شرایط درون شیشه‌ای و محیط بیرونی و قابلیت انبارداری باشد(۹).

بذرهای سنتزی جهت بهبود پروتوکل‌های ریزازدیادی در محصولاتی که به‌روش رویشی تکثیر می‌شوند، به‌کار می‌رود. همچنین سایر کاربردهای این روش شامل نگهداری لاین‌های نرعقیم، نگهداری لاین‌های والدین برای تولید محصول هیبرید، حفظ و تکثیر ژنوتیپ‌های برتر گیاهان چوبی که دوره رشد جوانی در آن‌ها طولانی می‌باشد(۱۷).

تکنولوژی بذر مصنوعی روش‌هایی را برای آماده سازی بذر سنتزی از اندام‌های تکثیری مانند جنین‌های سوماتیکی، جوانه‌های جانبی ساقه، مریستم-انتهایی، کالوس‌های جنینی فراهم می‌سازد. اگرچه قبل از کاربرد وسیع این تکنولوژی باید تنوع سوماکلونال به حداقل برسد و جنین‌های با کیفیت بالا در گونه‌های گیاهی مورد نظر تولید شود. همچنین پروتوکل‌های مقرون به‌صرفه‌ای در مقایسه با بذر موجود و تکنولوژی‌های ریزازدیادی باید ساخته شود(۱۷).

در پاپایا از جنین‌های سوماتیکی و در موز از قسمت‌های انتهایی ساقه برای تولید بذر سنتزی استفاده شده است. در نخل خرما توسط بخیت[1] و همکاران در سال ۲۰۰۲، سیستم قابل اطمینانی برای نگهداری ژرم‌پلاسم از طریق بذر سنتزی بدست آمده است. در این روش جنین‌های سوماتیکی حاصل از کشت قسمت انتهایی ساقه در کپسول‌های سدیم آلژینات محصور می‌گردند و برای ۱۲ ماه قابل نگهداری می‌باشند. جنین‌های سوماتیکی در ٤ مرحله بلوغ شامل کروی، اژدری، کوتیلدونی و اواخر کوتیلدونی گرفته می‌شوند و در زیر هود لامینار خشک شده، سپس با ژل سدیم‌آلژینات ۳ درصد مخلوط می‌گردند. بیشترین درصد زنده‌مانی در مرحله کوتیلدونی و بیشترین درصد تبدیل به گیاهچه در مرحله اواخر کوتیلدونی بدست آمده است(١٤).

در طی سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری برای تولید بذر مصنوعی در بسیاری از گیاهان صورت گرفته است. علی‌رغم این مطالعات، به علت محدودیت‌هایی که در تولید و نمو بذرهای مصنوعی وجود دارد و همچنین جهش و تغییرات بعدی که در میکروپروپاگول‌ها[2] در زمان تبدیل شدن به گیاهچه تحت شرایط درون‌شیشه‌ای و محیط بیرونی رخ می‌دهد، اجرای عملی این تکنولوژی کاملا تحقق نیافته است.

1 . Bekheet
2 .Micropropagule

تنوع سوماکلونال و انتخاب درون شیشه ای

در طبیعت، تنوع ژنتیکی و تغییرپذیری در جمعیت از طریق وقایع نوترکیبی ایجاد می‌گردد. عواملی مانند انتخاب طبیعی، جهش، مهاجرت و اندازه جمعیت، به شیوه‌های مختلف باعث تغییرات ژنتیکی می‌گردد(۳).

کشت بافت می‌تواند منبع غنی از تنوع ژنتیکی باشد. اصطلاح تنوع سوماکلونال در اوایل دهه ۱۹۸۰، به عنوان تنوع ژنتیکی ایجاد شده در سلول‌ها، بافت‌ها و گیاهان در شرایط درون شیشه معرفی گردید(۳۱). تغییرات سوماکلونالی که به تغییر طبیعی در جمعیت سلول‌ها وابسته است، ممکن است اپی‌ژنتیک یا ژنتیکی باشد و در گیاهچه‌های باززایی شده عموما مشاهده می‌گردد(۲٤).

بسیاری از تغییرات مشاهده شده در گیاهان باززایی شده از کشت بافت از نظر کشاورزی و یا باغبانی دارای اهمیت می‌باشند. این تغییرات شامل تغییر در رنگدانه، عملکرد بذر، اندازه و قدرت گیاه، مورفولوژی برگ و گل، روغن‌های ضروری، مواد جامد میوه و مقاومت به بیماری می‌باشند. تنوع سوماکلونال در بسیاری از محصولات مانند گندم، چاودم، برنج، جو، ذرت، نیشکر، یونجه، تنباکو، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی، بذرهای روغنی، شلغم و کرفس مشاهده شده است(۱۷).

یکی از مزایای عمده تنوع سوماکلونال، ایجاد تنوع ژنتیکی در ارقام کشاورزی سازگاریافته بدون نیاز به هیبریداسیون می‌باشد. بنابراین درصورتی‌که

انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای امکان‌پذیر باشد و روش‌های غربالگیری گیاهی سریعی در دسترس قرارگیرد، این روش می‌تواند ارزشمند باشد.

تنوع سوماکلونال و انتخاب درون شیشه‌ای ابزار مفیدی در اصلاح نخل خرما برای مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده مانند خشکی، شوری و بیماری‌ها می‌باشد(٢٤). این تکنیک همچنین به عنوان یک روشی اصلاحی برای تولید ژنوتیپ‌های جدید با صفاتی از قبیل افزایش تعداد و اندازه میوه یا بهبود بافت یا مزه، تغییر ساختار گل به‌کار می‌رود(٤). علت وجود تنوع سوماکلونال در طی تکثیر درون شیشه‌ای بسیار متفاوت است و به ژنوتیپ، سطح پلوئیدی، شرایط رشد و مدت آن بستگی دارد. تغییراتی که در اثر تنوع سوماکلونال رخ می‌دهد، ممکن است به علت تغییراتی در سطح ژن مانند دوبرابر شدن، جابجایی، جهش نقطه‌ای، حذف شدگی یا اضافه شدن ژن و میتیلاسیون باشد یا تغییراتی که در سطح کروموزومی مانند بی‌ثباتی، وارونگی و تغییرات پلوئیدی ناپایدار و گذرا رخ می‌دهد. این وقایع منجر به تغییرات غیرقابل برگشت پلی‌وتروپیک و اپی-ژنتیکی می‌گردد و واریانت‌هایی تولید می‌نماید که شیمر نامیده می‌شود. مواد جهش‌زایی که عموما به‌کار می‌روند شامل سم‌های سنتزی میکروبی (فوزاریک اسید[1])، مواد شیمیایی (دی اتیل سولفانات[2]، اتیل متان سولفانات[3] و گروه آزیدها) یا جهش‌زاهای فیزیکی مانند اشعه‌های گاما و ایکس و نوترون‌های

1 . Fusaric acid
2. Diethyl sulphonate (DES)
3. Ethyl methane-sulphonate (EMS)

سریع و حرارتی(nf و Nth) می‌باشد. تنوع سوماکلونال از نقطه‌نظر تولید تجاری نامطلوب می‌باشند اما از نظر اصلاح با ارزش هستند(۲۲).

تنوع سوماکلونال خودبه‌خودی در اثر انعطاف‌پذیری ژنوم و توانایی بازسازی آن در واکنش به تقابل شرایط بیرونی و درونی کشت درون شیشه‌ای رخ می‌دهد.

عوامل بسیاری مانند نوع ریزنمونه و ژنوتیپ گیاه، سن کشت، تعداد واکشت انجام گرفته، اثرات تنظیم کننده‌های رشد داخلی و بیرونی در تنوع سوماکلونال نقش دارند. بعضی اکسین‌ها از قبیل 2,4-D در القای تنوع سوماکلونال نقش بیشتری دارند(۳۰). همچنین واکنش ژنوتیپ‌های خرما به این تنظیم کننده‌های رشد متفاوت می‌باشد. بعضی از ارقام در کشت درون شیشه‌ای گیاهانی شبیه گیاه مادری تولید می‌کنند اما بعضی ارقام میزان تنوع سوماکلونال بالاتری نشان می‌دهند. سایر منابع القا کننده تنوع سوماکلونال شامل استفاده از جهش‌های فیزیکی یا شیمیایی می‌باشد. جهش‌زایی درون شیشه‌ای راهی سریع و کارآمد برای ایجاد صفات مطلوب مانند مقاومت به تنش‌های غیر زنده و زنده، اصلاح عملکرد و کیفیت میوه در نخل خرما می‌باشد(۲٤).

تنش‌های غیر زنده مانند خشکی، شوری، دماهای بالا و آلودگی‌های شیمیایی اتمسفری یا زمینی باعث آسیب‌های قابل توجهی به نخل خرما می‌گردد. گیاهان استراتژی‌های مختلفی برای مقابله با تنش‌ها دارند. شدت تنش محیطی و مدت زمانی که گیاه تحت تاثیر آن قرار می‌گیرد، اهمیت دارد. ارقام

تجاری اغلب به تنش‌های محیطی حساس بوده و در شرایط نامساعد عملکرد آن‌ها به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یابد(۲۳). انتخاب درون شیشه‌ای در اصلاح گیاهان برای مقاومت به تنش‌های غیر زنده مانند شامل مقاومت به دما و فتوپریود، مقاومت به خشکی و شوری، مقاومت به میکروارگانیسم‌ها و آفات یا سایر متابولیت‌های سمی، مقاومت به قارچکش و آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت به فلزات سنگین به‌کار می‌رود. با توجه به عامل انتخابی، روش انتخاب درون شیشه‌ای در کشت پروتوپلاست، مرحله کالوس یا اواخر دوره باززایی شاخه و مریستم‌های ریشه صورت می‌گیرد(٦).

به‌طورگسترده تکنیک درون‌شیشه‌ای برای تولید ارقام خرمای مقاوم به خشکی با روش انتخاب درون شیشه ای توسعه یافته است. اسمولیت‌هایی مانند ساکارز، مانیتول یا پلی اتیلن گلیکول جهت انتخاب درون شیشه ای ارقام مقاوم به خشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مولکول‌ها به علت کاهش قابلیت دسترسی آب سلولی باعث القای تنش خشکی می‌گردند(۲۳).

در نخل خرما مانند بسیاری از گونه‌های گیاهی، غربالگری ژرم پلاسم و برنامه‌های اصلاحی برای مقاومت به شوری بسیار محدود کننده می‌باشد. بنابراین از تکنیک کشت بافت برای غربالگیری ژنوتیپ های مقاوم به شوری استفاده می‌گردد. آل منصوری[1] و همکاران (۲۰۰۷)، اثر کلرید سدیم را بر کالوس‌های حاصل از جنین های نابالغ ٤ رقم محلی خرما بررسی کردند. بین

1. Al Mansoori

ژنوتیپ‌ها از نظر واکنش به شوری اختلاف معنی‌داری وجود داشت. با افزایش غلظت کلریدسدیم، رشد کالوس کاهش یافت و در بیش از ۳ درصد کلرید سدیم از رشد کالوس ممانعت گردید(۷).

اثرات کلریدسدیم و پلی اتیلن گلیکول برای القای تنش بر روی نخل خرما مورد بررسی قرار گرفته است. هدف این تحقیقات تعیین غلظت کشنده، ارزیابی واکنش رشدی و تجمع میزان پرولین به عنوان شاخصی برای مقاومت به تنش خشکی و شوری بود. موادی که در شرایط درون شیشه ای برای اعمال تنش به‌کار می‌رود به نوع تنش، ژنوتیپ، سهولت کاربرد و پتانسیل باززایی سریع ژنوتیپ‌های مقاوم بستگی دارد(٦).

نگهداری ژرم پلاسم

حفظ ژرم پلاسم به علت سرعت بالای انقراض گونه‌های گیاهی و ضرورت حفاظت از ژرم پلاسم هر کشور امری ضروری و لازم الاجرا می‌باشد. کشت بافت گیاهی روشی مناسب برای نگهداری ژنوتیپ‌ها یا گونه‌هایی در معرض انقراض می‌باشد(٢٦). پروتوکل‌های کشت بافت گیاهی می‌توانند برای نگهداری بافت‌های رویشی به‌کار برده شوند، زمانی که هدف نگهداری کلون‌ها می‌باشد. همچنین گونه‌های گیاهی که بذر تولید نمی‌کنند یا بذرهایی دارند که برای مدت زمان طولانی قادر به انبار شدن نمی‌باشند، از تکنیک کشت بافت برای نگهداری آن‌ها استفاده می‌گردد(۳). ذخیره سازی درون شیشه‌ای روشی مناسب برای

نگهداری گیاهانی می‌باشد که از طریق رویشی تکثیر می‌گردند. این تکنولوژی‌ها در جهت کاهش یا توقف رشد و فعالیت‌های متابولیکی عمل می‌کنند. این تکنیک‌ها برای طیف وسیعی از گیاهان توسعه یافته‌اند. مهمترین محدودیت این تکنولوژی فقدان یک روش مناسب برای همه گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها، هزینه‌های بالا و احتمال تنوع سوماکلونال و انتخاب سلولی تصادفی در مواد ذخیره شده می‌باشد.

انبار سرد

یکی از راه‌های حفظ ژرم پلاسم، ذخیره سازی درون شیشه‌ای تحت شرایط رشد آهسته (در دمای پائین، ترکیبات بازدارنده رشد در محیط) یا نگهداری تحت انجماد یا بذر سنتزی خشک شده می‌باشد که جایگزین بانک‌های بذری و به ویژه بانک‌های مزرعه‌ای در محصولات تکثیر شده از طریق رویشی شده است. در انبار سرد، دمای مورد استفاده با توجه به گونه ذخیره شده متغییر می‌باشد. گونه‌های گیاهی معتدله در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و گیاهان گرمسیری در محدوده دمایی ۱۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. این تکنیک دوره واکشت را از ۱۲ ماه تا ٤ سال می‌تواند افزایش دهد. اغلب پروتکول‌های این روش تحت شدت نوری کم یا تاریکی کامل انجام می‌گیرند(۱۰).

هدف اصلی در نگهداری درون شیشه ای ژرم‌پلاسم با تکنیک رشد آهسته، محدود کردن تعداد واکشت و حفظ تنوع ژنتیکی گونه‌ها تحت شرایط استریل، کاهش رشد و تقسیم سلولی به منظور افزایش ماندگاری گیاه بدون تغییرات ژنتیکی می‌باشد.

برای نگهداری خرما با روش رشد آهسته موارد زیر باید رعایت گردد:

- استفاده از پروتکل موثر برای کاهش رشد و نمو مواد گیاهی
- ممانعت از القای رشد و نمو غیر طبیعی در طی انبار
- حفظ زنده‌مانی گیاه انبار شده در شرایط درون شیشه ای

روش رشد آهسته امکان نگهداری کلون‌های گیاهی را به مدت ۱ تا ۵ سال تحت شرایط کشت بافت فراهم می‌سازد. در این روش دوره واکشت به گونه گیاهی وابسته می‌باشد. عمدتا برای محدود کردن رشد از طریق کاهش غلظت قند و یا عناصر معدنی، کاربرد بازدارندگان رشد اسمزی (مانیتول) یا کندکنندگان رشد(آبسزیک اسید) استفاده می‌کنند(۳٤).

نگهداری تحت انجماد[1]

تکنیک فرا سرما یا نگهداری تحت انجماد، نقش مهمی در نگهداری درون شیشه‌ای طولانی مدت منابع ژنتیکی و مواد بیولوژیکی ضروری ایفا می‌کند. موفقیت این روش اغلب با زنده‌مانی سلول، بافت و توانایی رشد مجدد یا

1. Cryopreservation

باززایی آن ها به گیاه کامل یا تشکیل کلون‌های جدید تعیین شده است. در این روش نگهداری درون شیشه ای از دمای ۷۹- تا ۱۹٦- درجه سانتی‌گراد استفاده می‌کنند. در این شرایط دمایی تقسیم سلولی، فرایندهای بیوشیمیایی و متابولیکی متوقف می‌گردد، بنابراین سلول‌ها بدون تغییر برای دوره زمانی نامعین نگهداری می‌شوند. همچنین گیاهان نگهداری شده در این روش حداکثر ثبات در ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی ژرم پلاسم را نشان می‌دهد، بنابراین نسبت به روش‌های نگهداری رایج برتری دارد(۵۲). مزیت اصلی انجماد نگهداری، محدود کردن تعداد واکشت، هزینه نسبتا پائین، فضای نسبتا کم و قابلیت کنترل آن می‌باشد. به‌هرحال انجماد نگهداری، تنها روش قابل دسترس برای نگهداری بلند مدت ژرم پلاسم‌های گیاهی است که به روش رویشی تکثیر می‌گردند(۱۵). در روش انجماد نگهداری، مجموعه وسیعی از بافت‌ها از جمله نوک ساقه، جوانه‌ها، جنین‌ها تا پروتوپلاست به‌طور موفقیت‌آمیزی در نیتروژن مایع نگهداری می‌گردند. تکنولوژی انجماد نگهداری به‌طور معنی‌داری در دهه اخیر به ویژه در محصولات گرمسیری پیشرفت داشته است. اکنون برای بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی که در اشکال مختلف از قبیل سوسپانسیون سلولی، کالوس، جنین‌های سوماتیکی و بذری و مریستم انتهایی کشت شده‌اند، تکنیک‌های مختلفی توسعه یافته است(٤۲).

مطالعات بسیار محدودی برای نگهداری ژرم پلاسم خرما با روش انجماد صورت گرفته است، بنابراین توسعه روش‌های جدید برای نگهداری کارآمد

منابع ژنتیکی و مدیریت تکثیر تجاری در خرما ضروری می‌باشد. فینکل[1] و همکاران (۱۹۷۹) امکان نگهداری نخل خرما از طریق انجماد نگهداری را بررسی نمودند. مراحل انجماد نگهداری شامل مراحل زیر می‌باشد:

- کشت در محیطی با ترکیبات فعال اسمزی(پیش تیمار)
- تیمار با عامل انجماد
- یخ زدگی و انبار در دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد
- ذوب شدن
- تیمارهای پس از ذوب شدن و بازیابی رشد

ظرفیت زنده‌مانی ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع به چندین فاکتور از قبیل حالت فیزیولوژیکی ریزنمونه بستگی دارد. نوع سلول‌ها، تعیین کننده توانایی سلول‌ها برای مقاومت نسبت به تنش یخ زدگی می‌باشد. در کل پیشنهاد می‌گردد که ریزنمونه‌ها از کشت‌های در حال رشد و فعال از نظر تقسیم سلولی گرفته شوند که دارای سیتوپلاسم ضخیم و سیستم واکئولی کوچکی می‌باشند و بهتر نسبت به یخ زدگی مقاومت می‌کنند.

در میان انواع مختلف قندهایی (فروکتوز، گلوکز، سوربیتول و ساکارز) که به عنوان عامل اسمزی در محیط کشت پیش تیمار مورد استفاده قرار می‌گیرند، محیط کشت حاوی ساکارز بهترین زنده‌مانی را در روش انجماد نگهداری کشت بافت‌های خرما نشان داد(۲۷).

1 . Finkle

نگهداری منابع ژنتیکی خرما از این نظر حائز اهمیت می باشد که در آینده از ژن‌های مفید موجود در ژرم پلاسم‌ها می‌توان جهت برنامه‌های اصلاحی گیاه استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

امروزه تکنیک‌های مختلف کشت بافت برای اصلاح گیاهان به‌کار رفته است. تکنیک‌هایی که امکان استفاده از آن‌ها در نخل خرما وجود دارد شامل موارد زیر می باشد:

- تولید گیاهان عاری از ویروس با استفاده از کشت مریستم، امکان جابه‌جایی بی‌خطر مواد گیاهی میان مناطق مختلف در داخل و خارج کشور را تسهیل می‌نماید.
- نجات جنین با استفاده از کشت بافت می‌تواند مشکلات موجود در ناسازگاری‌های بعد از تشکیل جنین در هیبریدهای بین گونه‌ای جنس خرما را مرتفع سازد.
- نگهداری درون شیشه‌ای ذخایر ژنتیکی خرما به‌عنوان روشی جایگزین برای غلبه بر موانع و مشکلات مدیریت ذخایر ژنتیکی به شمار می‌آید.
- تنوع سوماکلونال و انتخاب درون شیشه‌ای که می‌تواند برای اصلاح نخل خرما از نظر مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده به‌کاربرده شود.

- دستیابی به تکنولوژی تولید گیاهان هاپلوئید نخل خرما می‌تواند تولید لاین‌های هموزیگوت را سرعت بخشد.

منابع

۱. تاجی، ا.، پی کومار، پ.، لاکشمانن، پ. ترجمه رنجبر، غ. اصلاح نباتات درون شیشه ای. ۱۳۸٤. نشر آموزش کشاورزی، ۲۰٤ صفحه.

2. Acquaah, G. 2007. Principles of plant genetics and breeding. 1 edn. Blackwell Publisher Ltd, London, UK, pp: 564.

3. Adebabay, T. 2017. Plant tissue culture technique as a novel tool in plant breeding. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci, 17 (2): 111-118.

4. Ahloowalia, B.S, Maluszynski, M. 2001. Induced mutations: a new paradigm in plant breeding. Euphytica, 119:167–173.

5. Al-Khalifah, N. S., Shanavaskhan A. E. 2012. Micropropagation of date palms. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB) and Association of Agricultural Research Institutions in the Near East and North Africa (AARINENA), pp: 54.

6. Al-Khayri, J. M., Ibraheem, Y. 2014. *In vitro* selection of abiotic stress tolerant date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Emir. J. Food Agric, 26 (11): 921-933.

7. Al Mansoori, T. A., Alaa Eldeen, M. N. 2007. Evaluation techniques for salt tolerance in date palm. Acta Hort, 736:301–307.

8. Ammar, S., Benbadis, A. 1977. Multiplication vegetative du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) par la culture de tissue de jeunes plantes issues de semis. C R Acad Sci, 284:1789–1792.

9. Ara, H., Jaiswal, U.V.S., Jaiswal, V. S. 2000. Synthetic seed: Prospects and limitations. Current Sci, 78: 12-25.

10. Ashmore, S. E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

11. Assani, A., Chabane, D., Shittu, H., Bouguedoura, N. 2011. Date Palm Cell and Protoplast Culture. In: Jain, S. M., Khayri, J. M, Johnson, D.V (eds), Date palm biotechnology. Springer, Dordrecht, pp: 605-629.

12. Bajaj, Y. P. S.1990. *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. Biotechnol. Agr. Forest. Berlin, pp: 3-44.

13. Basu, S. K., Datta, M., Sharma, M., Kumar, A. 2011. Haploid plant production technology in wheat and some selected higher plants, Aust. J. Crop Sci, 5(9): 1087-1093.

14. Bekheet, S. A., Taha, H. S., Saker, M. M., Moursy, H. A. 2002. A synthetic seed system of date palm through somatic embryogenesis encapsulation. Ann Agric Sci, 47:325–337.

15. Bekheet, S. A. 2011. *In Vitro* Conservation of Date Palm Germplasm. In: Jain, S. M., Khayri, J. M., Johnson, D.V

(eds), Date palm biotechnology. Springer, Dordrecht, pp: 337-360.

16. Bridgen, M. P.1994. A review of plant embryo culture. Hort. Sci, 29: 1243-1246.

17. Brown, D. C. W., Thorpe, T. A. 1995. Crop improvement through tissue culture. World J. Microbiol. Biotechnol, 11: 409-415.

18. Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., *et al*. 2007. Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. C R Biol, 330:392–401.

19. Chaibi, N., Ben Abdallah, A., Harzallah, H., Lepoivre, P. 2002. Potentialites androgenetiques du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. et culture *in vitro* d'anthères. Biotechnol Agron Soc, 6: 201–207.

20. Chatenet, M., Delage, C., Ripolles, M., Irey, M., Lockhart, B. L.E., Rott, P. 2001. Detection of sugarcane yellow leaf virus in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. Plant Disease, 85(11): 1177-118.

21. Chauhan, H., Khurana, P. 2011. Use of double haploid technology for development of stable drought tolerant bread wheat (*Triticum aestivum* L) transgenics. Plant Biotechnol. J, 9(3): 408-417.

22. El Hadrami, A., El Idrissi-Tourane, A., El Hassni, M., Daayf F., El Hadrami, I. 2005. Toxin-based *in vitro* selection and its

potential application to date palm for resistance to the bayoud fusarium wilt. C R Biol, 328:732–744.

23. El Hadrami., Daayf, F., El Hadrami, I. 2011. *In Vitro* selection for abiotic stress in date palm. In: Jain, S. M., Khayri, J. M., Johnson, D.V (eds), Date palm biotechnology. Springer, Dordrecht, pp: 237-252.

24. El Hadrami, A., Daayf, F., Elshibli, F., Jain, S., Hadrami, S. M., Hadrami. I. El. 2011. Somaclonal variation in date Palm. In: Jain, S. M, Khayri, J.M, Johnson, D.V (eds), Date palm biotechnology. Springer, Dordrecht, pp: 183-203.

25. Evans, D. A. 1983. Agricultural applications of plant protoplast fusion. Biotechnology, 1: 253-261.

26. Filho, A. R., Dal-Vesco, L. L., Nodari, R.O., Lischka, R.W., Müller, C.V., Guerra, M. P. 2005. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vries eareitzii* Leme and Costa, abromelian threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. Biodivers. Conserv , 14(8): 1799-1808.

27. Finkle, B. J., Ulrich, J. M., Rains, D.W., *et al.*1979. Survival of alfalfa (*Medicago sativa*), rice (*Oryza sativa*) and date palm (*Phoenix dactylifera* L.) callus after liquid nitrogen freezing. Cryobiology, 16:583.

28. Garcia-Gonzales, R., Quiroz, K., Carrasco, B., Caligari, P. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. Ciencia e Investigation Agraria, 37(3):5-3.

29. Harding, K., 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. Cryo. Lett, 25: 3-22.

30. Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, S., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., Kishan Sadh, R. 2016. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 Biotech, 6:54.

31. Larkin, P., Scowcroft, W. 1981. Somaclonal variation as novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet, 60: 197-214.

32. Lizarraga, R., Tovar, P. Jayasinghe, U. Dodds, J. 1986. Tissue culture for elimination of pathogens. Specialized Technology Document 3. International Potato Center, Lima, Peru, pp: 22.

33. Marino, G., Battistini, S. 1990. Leaf-callus growth, shoot regeneration and somaclonal variation in *Actinidia deliciosa*: effect of media pH. Acta Horticulturae, 280: 37-44.

34. Mohan Jain, S. 2011. Prospects of *in vitro* conservation of date palm genetic diversity for sustainable production. Emir. J. Food Agric, 23 (2): 110-119.

35. Morrison, R. A., Evans, D. A. 1998. Haploid plants from tissue culture: New plant varieties in shortened time frame. Nat. Biotechnol, 6: 684-690.

36. Mostageer, A., Elshihy, O. M. 2003. Establishment of salt tolerant somatic hybrid through protoplast fusion between rice and ditch reed, Arab. J. Biotechnol, 6(1): 1-12.

37. Motomura, T., Hidaka, T. Akihama, T. Omura, M. 1997. Protoplast fusion for production of hybrid plants between citrus and its related genera. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 65: 685-692.

38. Nabors, M. W., Gibbs, G. E., Bemrtein, C. S., Mels, M. S. 1980. NaCI-tolerant tobacco plants from cultured cells, Z. Pllanzenphysiol, 97: 13-17.

39. Palmer, C. E., Keller, W. A. 1994. *In vitro* culture of oilseeds: Plant cell and tissue culture. In*:* Vasil, L. K. and Thorpe, T. A., (Eds.). Dordrecht: Kluwer Academic, pp: 413-455.

40. Ragavan, V. 1977. Applied aspects of embryo culture. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds), Plant cell, tissue and organ culture. Springer, Berlin, pp: 375–397.

41. Ragavan, V. 2003.One hundred years of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro* Cell Dev Biol Plant, 39: 437–442.

42. Reed, B. M. 2008. Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, New York.

43. Reuveni, O. 1979. Embryogenesis and plantlet growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) derived from callus tissues. Plant Physiol, 63(Suppl):138.

44. Rizkalla, A. A., Badr-Elden, A. M., Nower, A. A. 2007. Protoplast isolation, salt stress and callus formation of two date palm genotypes. J Appl Sci Res, 3:1186–1194.

45. Sengar, R. S., Chaudhary, R. Tyagi, S. K. 2010. Present status and scope of floriculture developed through different biological tools. Res J. Agri. Sci, 1(4): 306-314.

46. Sudhersan, C., Al-Shayji, Y., Jibi Manuel, S. 2009. Date palm crop improvement via T x D hybridization integrated with *in vitro* culture technique. Acta Hortic, 829: 219–224.

47. Sudhersan, C., Al-Shayji. 2011. Interspecific hybridization and embryo resuce in date palm. In: Jain, S. M., Khayri., J. M, Johnson, D.V (eds), Date palm biotechnology. Springer, Dordrecht, pp: 567–584.

48. Sunil Kumar, K., Sparjanbabu, D. S. 2013. Haploid Breeding in Palms. Adv Crop Sci Tech, 1: 113.

49. Tisserat, B. 1979. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *In Vitro*, J Exp Bot, 30:1275–1283.

50. Tyagi, R. K., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z., Tyagi, H. 2007. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers, *In vitro* Cell Develop. Biol. Plant, 43: 51-58.

51. Van Den Bulk, R.W., Jansen, J., Undhout, W.H., Lofiler, H.J.M. 1991. Screening of tomato somaclones for resistance to bacterial canker. Plant Breed, 107: 190-196.

52. Withers, L. A. 1983. Germplasm storage in plant biotechnology. In: Mantell, S. H., Smith, H (eds.), Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, pp: 187–218.

53. Zaid, A. 1987. Morphogenetic variation in palm embryos *in vitro*. Date Palm J, 5:36–47.

54. Zapata-Arias, F. J., Torrizo, L. B., Ando, A. 1995. Current developments in plant biotechnology for genetic improvement: the case of rice (*Oryza sativa* L). World J. Microbiol. Biotechnol, 11: 393-399.

55. Zulkharnain, Z., Tapingkae, T., Acram, T. 2015. Application of In vitro techniques in plant breeding. In: Al-Khayri, J. M., Jain, S. M., Johnson, D. V (Eds.),

56. Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular tools. Springer International. Publishing, pp: 293-328.