Effect of Some Antioxidants, Auxins and Explants Type on Callus Initiation of Date palm cv. Bream

تأثير بعض مضادات الاكسدة والاوكسينات ونوع الجزء النباتي في نشوء الكالس لنخيل التمر صنف بريم خارج الجسم الحي*

حسام سعد الدين محمد خيرالله و نهلة حمودي ابراهيم
وحدة ابحاث النخيل والتمور/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد

الخلاصة

نفذ البحث الحالي بهدف دراسة بعض العوامل المؤثرة في نشوء الكالس الجنيني لنخيل التمرصنف بريم خارج الجسم الحي وباستخدام أربعة أجزاء نباتية شملت القمة النامية، وبادئات الاوراق، والبراعم الابطية، وانسجة الجمار اجريت تجارب مختلفة للتغلب على مشكلة أسمرار ألاجزاء النباتية المزروعة شملت أضافة حامضي الستريك والاسكوربيك الى الوسط الغذائي بتراكيز مختلفة وبطريقتي التعقيم بالمؤصدة والتعقيم البارد بالمرشحات وكذلك أضافة الفحم النباتي الفعال و Polyvinylpyroledon (PVP) معا" وبتوليفات مختلفة وحسب تركيز الفينولات الذائبة الكلية. وبالنسبة لاستحثاث الكالس الاولي فقد جرى اختبار تأثير تراكيز مختلفة من الاوكسينات 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) وNaphthalene acetic acid (NAA) و 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) وهي (0 أو25 أو50 أو100 ملغم/لتر) وبوجود 3 ملغم/لتر من 2-isopentenyl adenine (2ip). أظهرت النتائج ان اضافة 50 ملغم / لتر من كل من حامضي الستريك والاسكوربيك الى الوسط الغذائي واستعمال المرشحات الدقيقة ادت الى تقليل تركيز الفينولات الذائبة الكلية الى 0.009 ملغم/غم وزن طري. كما ان اضافة 2غم /لتر فحم نباتي و1.5 غم/لتر PVP اعطت اقل تركيز للفينولات الذائبة الكلية بلغ 0.009 ملغم/غم وزن طري. وبالنسبة لاستحثاث الكالس، دلت النتائج على تفوق الاوكسين Picloram بتركيز 50 ملغم/لتر اذ بلغت النسبة المئوية لاستحثاث الكالس 53.12% مقارنة بكل من الاوكسينين 2,4-D وNAA والتي بلغت النسبة المئوية لاستحثاث الكالس فيها 28.12 و37.5% على التتابع. وأعطت القمة النامية اعلى نسبة مئوية للاستحثاث بلغت 87.5%عند التركيز 50 ملغم/لترمن الاوكسين Picloram وتفوق هذا الاوكسين في تقليل المدة الزمنية اللازمة لنشوء الكالس الاولي الى 40 يوما" مقارنة بكل من 2,4-D وNAA واللتان بلغتا 63 و59 يوما"على التتابع. بناءا" على ما تقدم يمكن أعتماد النتائج أعلاه في الاكثار الدقيق لنخيل التمر صنف بريم خارج الجسم الحي.

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

Summary

This research was implemented in order to study some factors affecting callus initiation of date palm cv. Bream. Four explants; shoot tips, leaf primordia, axillary buds and mantel meriestems were used as an explants. To overcome browning, citric and ascorbic acids, as antioxidents and adsorbents including activated charcoal and polyvinylpyrrolidone (PVP) sterilized by autoclave or microfiltration were used. In the initiation stage, the effect of three plant growth regulators 2,4- Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), Naphthalene acetic acid (NAA) and 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) on callus induction from the four types of explants was studied using various concentrations (0, 25, 50 or 100 mg/L). Supplementation of 50 mg/l of each citric and ascorbic acid to the nutrient medium reduced of total soluble phenols to 0.009 mg/g of fresh weight . Results showed that the highest percentage of callus induction (53.12%) was obtained with MS medium supplemented 50mg/l picloram compared, with other auxins NAA and 2,4-D which were 37.5% and 28.12% respectively at the same concentration. Best explants response for callus induction were shoot tips (87.5%) compared with other. Picloram reduced the period required for callus induction 40 days compared with other auxins which was 63 days for 2,4-D and 59 days for NAA. Accordingly, these results can be adopted in the in vitro micropropagation protocols of date palm cv. Bream.

المقدمة

لعل الاكثار السلالي الواسع Clonal mass propagation هو اكثر تطبيقات زراعة الانسجة النباتية انتشارا" فهو الطريقة الملكية لاكثار النباتات خضريا" كما يصفها Gautheret (1985) والتي تتم باتباع طرائق مختلفة للتمايز والتكوين الشكلي مثل تكوين البراعم العرضية وتحفيز نمو البراعم الابطية، وتحفيز نشوء الاجنة الجسمية والتي أستخدمت كطريقة للأكثار خارج الجسم الحي في اكثر من 60 نوعا"من الاشجار الخشبية ممثلة لحوالي 25 عائلة نباتية (الرفاعي والشوبكي،2002) ومن اكثر هذه العوائل فائدة للانسان هي العائلة النخيلية Arecaceae ومن ابرز أشجارها نخيل التمر Date Palm (*Pheoenix dactylifera* L.) (البكر، 1972). خلال سلسلة عمليات النمو والتطور خارج الجسم الحي فان الجزء النباتي لا يستنزف المواد المغذية التي يجهز بها الوسط فحسب وانما يحررمركبات عضوية تؤثر فيزيائيا" في النسيج وتتراكم في وسط الزراعة ومن هذه المركبات هي المواد الفينولية المنتجة طبيعيا" ضمن مركبات الايض الثانوية (Secondary metabolism) اذ تبنى حيويا في الانسجة الخضراء وتتراكم في الانسجة الخشبية وتودع في الفجوات العصارية للخلايا وتنفرد حسب الحاجة اليها وتعرف الفينولات بأنها مركبات تمتلك حلقة اروماتية (Aromatic ring) تحمل مجموعة هيدروكسيل (OH)، وتكون ذات وظائف متنوعة فهي ضرورية في البناء الحيوي لمادة اللكنين Lignin والتي تعد من اهم مكونات جدار الخلية النباتية فضلا"عن ارتباطها بالحماية الكيميائية للنباتات ضد الاصابة بالفطريات والفيروسات (George واخرون، 2008) ان مجموعة الهيدروكسيل تتأكسد لتنتج Quainons والماء، ويعتقد ان تثبيط حيوية الجزء النباتي ثم موته يعود الى ارتباط الفينولات بالبروتين مما يؤدي الى فقد فعالية العديد من الانزيمات. والانزيمات المسؤولة عن ظاهرة الاسمرار هي Peroxidase (Po) و Polyphenoloxidase (PPo) وكذلك Tyrosinase . وتعد المواد الاساس التي تعمل عليها هذه الانزيمات هي Tyrosine والـــ O-hydroxyphenols مثل Chlorogenic acid (George و Sherrington ، 1993). وقد تعمل الفينولات مرافقاً انزيمياً Co-enzyme لبعض انزيمات الاكسدة مثل IAA oxidase الذي يعمل على هدم الاوكسينات. توصل المير والابريسم (2008) الى خفض كمية المواد الفينولية عند تقليل تركيز النترات في وسط الزراعة واستخدام نصف القوة من نترات البوتاسيوم اذ بلغت كمية المواد الفينولية 0.18 ملغم / غم وزن جاف وبلغت اقل كمية من المواد الفينولية في الوسط الغذائي المزود بنصف القوة من نترات البوتاسيوم مع نصف القوة من نترات الامونيوم اذ بلغت 0.10 ملغم / غم وزن جاف. وأكد Othmani واخرون (2009) إلى أن المعاملة الاولية للجزء النباتي بمضادات الاكسدة (حامض الستريك والاسكوربيك بتركيز150 ملغم/لتر كان اكثر فعالية في تقليل الاسمرار مقارنة باستخدام PVP ونقل الجزء النباتي الى وسط الزراعة كل 10ايام. وجد Ibraheem واخرون (2010) ان اضافة 50ملغم/ لترمن Picloram مع 3 ملغم/لتر2ip اعطى اعلى نسبة لتكوين الكالس الجنيني لصنف النخيل زغلول مقارنة بالوسط الذي يحتوي على 50 او 100 ملغم/لترD-2,4 . وتوصل Saka (2010) في دراسة على استخدام Picloram في تحفيز نشوء الكالس الجنيني من الاجنة البالغة الجنسية لنخيل التمر ان اعلى نسبة مئوية للكالس الجنيني (58%) قد تكونت بعد 6-9 اشهر عند استخدام التركيز 12.5 ملغم/لتر من Picloram مقارنة باستخدام التركيزنفسه لكل من Dicamba و2,4-D اذ كانت النسبة المئوية للكالس الجنيني هي 52 و21% على التوالي. وأكد Jain واخرون(2011) ان اضافة Picloram بتركيز0.2-0.5 ملغم/لتر قد زادت من النسبة المئوية لاستحثاث الكالس الجنيني لنخيل التمر فضلا"عن زيادة عدد الاجنة الجسمية.

أن هذه الدراسة تهدف إلى تحسين تقانة الاكثار الدقيق لنخيل التمر صنف بريم بطريقه تكوين الكالس الجنيني من خلال معرفة تأثير بعض العوامل المؤثرة في مرحلة نشوء الكالس كالاسمرار الانزيمي ودراسة تأثير نوع الجزء النباتي ونوع الاوكسين وتركيزه.

المواد وطرائق العمل

نفذت التجارب في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابعة لقسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد للمدة من ايلول 2009 ولغاية ايلول 2011.

1. تحضير الاجزاء النباتية

أختيرت فسائل من الصنف بريم بعمر 2-3 سنة من احد البساتين الاهلية في قضاء الصويرة / محافظة واسط وقد روعي اختيار الفسائل من امهات نشطة وخالية من الاصابات المرضية والحشرية مظهريا"، وازيلت الاوراق (السعف) تدريجياً من قواعدها من الاسفل الى الاعلى بمسار لولبي لحين ازالة اخر ورقة محيطة بقلب الفسيلة والوصول الى القمة النامية بطول 20 سم (شكل 1) وعند ازالة كل ورقة فصل البرعم الابطي ان وجد مع اختيار البراعم بطول 0.5 – 1 سم. ونقلت القمة النامية والبراعم الابطية الى محلول مبرد مانع للاكسدة مكون من حامض الستريك بتركيز 150 ملغم / لتر وحامض الاسكوربيك بتركيز 100 ملغم / لتر معاً لحين الزراعة (Tisserat ، 1991). وتم استخدام الاجزاء النباتية الأتية لكل من تجارب الاسمرار وتكوين الكالس :

1- القمم النامية Shoot tips : بطول 1سم
2- البراعم الابطية Axillary Buds : بطول 0.5 سم
3- بادئات الاوراق Leaf primordia : بطول 1 سم
4- انسجة الجمار Mantel meristem : وبابعاد 0.5×0.5 سم

شكل (1) القمة النامية لصنف النخيل بريم جاهزة لمراحل التعقيم السطحي .

2. الاسمرار

لشيوع ظاهرة الاسمرار في الاجزاء النباتية المزروعة لنخلة التمر فقد جرت محاولات عديدة في البحث لمعالجة هذه الظاهرة وكالآتي :

1.2 دراسة تأثير اضافة بعض المواد المانعة للاكسدة

أضيفت التراكيز الموضحة في الجدول (1) من حامض الاسكوربيك Ascorbic acid والستريك Citric acid والتداخل بينهما الى الوسط الغذائي الخاص بمرحلة النشوء والمكون من مجموعة املاح Murashige و Skoog ، 1962(MS) والانوسيتول Myo-inositol بتركيز 100 ملغم / لتر. اما انواع الفيتامينات المضافة الى الوسط الغذائي فقد تم أضافة مجموعة الفيتامينات (ملغم/لتر) والتي تحتوي على: الثايمين Thiamine-HCl (1) والبيردوكسين Pyrodoxin-HCl (0.5) وحامض النيكوتين (1) والكلايسين (2) فضلاً عن البايوتين Biotin (1) وملح الكالسيوم لحامض البانتوثونك Ca-pantothenic acid (2) والأكار بتركيز 7غم/لتر عدا منظمات النمو النباتية لدراسة تأثيرها في اسمرار الاجزاء النباتية واستخدمت طريقتين في تعقيم هذه المواد هي التعقيم الرطب بالموصدة (Autoclave) والتعقيم البارد باستخدام المرشحات الدقيقة (قطر فتحاتها 0.22 مايكروميتر) وكما موضح في الجدول 1.

جدول (1) تراكيز حامضي الستريك والاسكوربيك المستعملة في التجارب وطريقة التعقيم

المادة	اسلوب التعقيم	التراكيز (ملغم / لتر)			
حامض الاسكوربيك	بالموصدة	0	50	75	100
حامض الستريك		0	50	75	100
حامض الاسكوربيك	بالمرشحات	0	50	75	100
حامض الستريك		0	50	75	100

2.2 دراسة تأثير تراكيز مختلفة من الفحم النباتي الفعال

بعد الحصول على المعاملة الافضل من التجربة السابقة، تمت اضافة الفحم النباتي الفعال أو PVP الى الوسط الغذائي الخاص بنشوء الزروعات والمذكور في الفقرة السابقة عدا منظمات النمو النباتية وكما هو موضح في الجدول (2).

جدول (2) تراكيز الفحم النباتي والPVP المستخدمة في تجارب تقليل الاسمرار

المادة	التراكيز (ملغم / لتر)			
الفحم النباتي	0	1000	2000	3000
PVP	0	2000	1500	1000

حضنت الزروعات في الظلام الكامل وعلى درجة حرارة 27 $\pm$ 2ْم واخذت البيانات بعد ثمانية اسابيع من الزراعة.

3.2 تقدير الفينولات الكلية الذائبة

قدرت الفينولات الذائبة الكلية Total Soluble Phenols وذلك وفقاً لـ Sridha Mahadevan (1986) أعتمادا" على طريقة كاشف آرنو Arnow's او كاشف الفينول اذ تم اخذ 1 غم من كل الاجزاء النباتية ولكل معاملة وسحقها باستخدام الجفنة الخزفية ثم وضعت العينة في وعاء سعة 20 مل واضيف لها 15 مل من كحول اثيلي بتركيز 96% . وضع الخليط في حمام مائي على درجة 95°م لمدة 10 دقائق بعدها سحق الراسب في قعر الوعاء باستعمال هاون خزفي ورشح من خلال طبقتين من قماش الشاش الطبي الناعم، واعيد استخلاص المتبقي من العينة المسحوقة والمصفى باضافة 5 مل من الكحول الاثيلي ذو التركيز 96% وتمت اعادتها مرة اخرى الى الحمام المائي لمدة 3 دقائق ثم رشحت مرة اخرى بالشاش الطبي. جمع الراشحان وتم الترشيح ثانية من خلال ورق الترشيح من النوع Whatman رقم 40 وقطر 7 او 9 سم موضوع داخل قمع . تم وضع القمع المثبت به ورق الترشيح في دورق حجمي سعة 10 مل ثم اكمل الحجم الناتج بالكحول الاثيلي الى 10 مل لكل 1 غم من العينة. اخذ 1 مل من المستخلص بواسطة ماصة pipette ووضعت العينة المسحوبة في دورق حجمي سعة 20 مل واضيف لها المواد الآتية : 1 مل حامض الهيدروكلوريك HCl عيارية 0.5 N + 1 مل كاشف الفينول او كاشف آرنو + 10 مل ماء مقطر ثم اضيف لهذه المواد 2 مل NaOH عيارية N1 فظهرت لون وردي (واصبح الحجم النهائي للعينة الموجودة في الدورق الحجمي 15 مل). تم تحضير كاشف الفينول او كاشف ارنو Arnow's Reagent باذابة 10 غم من نتريت الصوديوم $NaNO_2$ + 10 غم موليبدات الصوديوم Na_4MoO_2 أذيب كلاهما في 100 مل من الماء المقطر وحفظ الكاشف في قنينة معقمة لكي يمكن استعماله عند الحاجة. تم عمل الـ Blank وذلك باضافة كل المواد المذكورة اعلاه ماعدا العينة الى 1 مل من الماء المقطر.

3. استحثاث الكالس الاولي من الاجزاء النباتية

اجريت تجارب عدة في هذه المرحلة بغية الحصول على افضل توليفة لاستحثاث الكالس الاولي أذ درس تأثير الاوكسينات (2,4-D أو NAA أو Picloram) وبالتراكيز (0، 25، 50 أو 100 ملغم/لتر) كلاً على حدة وبوجود 3 ملغم/لتر من السايتوكاينين 2ip وقد احتوى الوسط المستخدم على مكونات (MS) المذكورة في الفقرة 1.2 حضنت الزروعات في الظلام المستمر على درجة 27 ± 1°م وزرعت ثمانية مكررات لكل معاملة ونقلت الاجزاء المزروعة كل 4 اسابيع وحسب عدد الايام اللازمة لنشوء الكالس الأولي من الأجزاء النباتية كما حسبت النسبة المئوية للاجزاء النباتية المختلفة التي كونت كالس بعد 12 اسبوعا" من الزراعة الاولية بالمشاهدة العينية

$$\text{للاجزاء التي كونت الكالس} = \frac{\text{عدد الاجزاء التي كونت الكالس}}{\text{العدد الكلي للاجزاء}} \times 100\%$$

4. التصميم التجريبي والتحليل الاحصائي

صممت تجارب الدراسة كتجارب عاملية باستخدام التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD) حللت النتائج باستخدام البرنامج الاحصائي SAS (2004) وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي Least Significant Differences (LSD) وعلى مستوى احتمال 5% (الساهوكي ووهيب ، 1990).

النتائج والمناقشة :

1. تأثير اضافة حامض الاسكوربيك والستريك في تركيز الفينولات الذائبة الكلية للاجزاء النباتية المزروعة

تبين النتائج الموضحة في الجدول رقم(3) تأثير اضافة توليفات مختلفة من حامضي الاسكوربيك والستريك الى الوسط الغذائي والتعقيم بالموصدة في تركيز الفينولات الذائبة الكلية للاجزاء النباتية المختلفة المزروعة خارج الجسم الحي، ويلاحظ من الجدول انخفاض تركيز الفينولات الذائبة الكلية معنوياً عند اضافة 50 ملغم/لتر من كل من الحامضين الى الوسط الغذائي وكان 0.015 ملغم/غم وارتفع التركيز بعدها الى 0.019 ملغم/غم عند التركيز 100 ملغم/لتر والتي اختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة (من دون اضافة الحامضين) والتي اعطت 0.026 ملغم/ غم. اما فيما يخص الاجزاء النباتية فقد اتضح من الجدول نفسه وجود اختلافات معنوية وتفوق البرعم الجانبي في تركيز المواد الفينولية وبلغ 0.026 ملغم/غم واختلف معنويا عن التركيز في انسجة الجمار وبادئات الاوراق وبلغ 0.022 و0.015 ملغم/غم على التتابع، واعطت القمة النامية اقل تركيز للمواد الفينولية الذائبة بلغ 0.013 ملغم/غم. اما بالنسبة للتداخل فقد كان معنويا واعطت كل من القمة النامية وبادئات الاوراق المزروعة في وسط حاوي على 50 ملغم/ لتر من كل من الحامضين اقل تركيز للمواد الفينولية الذائبة وبلغ 0.011 ملغم/غم ، في حين كان اعلى تركيز لها قد وجد في البرعم الجانبي في وسط خالي من الحامضين وكان 0.037 ملغم/غم.

جدول (3) تأثير اضافة توليفات مختلفة من حامضي الاسكوربيك والستريك والتعقيم بالموصدة في تركيز الفينولات الذائبة الكلية (ملغم / غم) للاجزاء النباتية صنف بريم المزروعة خارج الجسم الحي.

الستريك+ الأسكوربيك ملغم / لتر	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
0 + 0	0.018	0.037	0.020	0.029	0.026
50 + 50	0.011	0.021	0.011	0.017	0.015
75 + 75	0.012	0.022	0.013	0.020	0.016
100 + 100	0.014	0.024	0.015	0.023	0.019
المعدل	0.013	0.026	0.015	0.022	

قيمة LSD : 0.05 للاجزاء النباتية = 0.0019 للمعاملات = 0.0019 للتداخل = 0.0033

اما الجدول (4) فيوضح تاثير اضافة توليفات مختلفة من حامضي الاسكوربيك والستريك الى الوسط الغذائي والتعقيم بالمرشحات الدقيقة في تركيز الفينولات الذائبة الكلية للاجزاء النباتية المختلفة المزروعة خارج الجسم الحي اذ يلاحظ انخفاض تركيز الفينولات الذائبة الكلية معنويا عند اضافة 50 ملغم/ لتر من كل من الحامضين الى الوسط الغذائي وباستعمال المرشحات الدقيقة وكان 0.009 ملغم/غم ارتفع التركيز بعدها الى 0.018 ملغم/غم عند التركيز 100 ملغم / لتر من كل من الحامضين والذي اختلف معنويا عن التركيز 75 ملغم/لترمن كل من الحامضين اذ بلغ 0.012 ملغم/غم في حين لم يختلف معنويا عن معاملة المقارنة (من دون اضافة الحامضين) والتي اعطت 0.026 ملغم / غم . اما فيما يخص الاجزاء النباتية فقد اتضح من الجدول نفسه وجود اختلافات معنوية وتفوق البرعم الجانبي في تركيز المواد الفينولية وبلغ 0.024 ملغم/غم واختلف معنويا عن التركيز في بادئات الاوراق وانسجة الجمار وكان 0.013 و 0.019 ملغم/غم على التتابع. واعطت القمة النامية اقل تركيز للمواد الفينولية الذائبة الكلية 0.011 ملغم / غم والذي اختلف معنويا عن بقية الاجزاء. اما بالنسبة للتداخل فقد كان معنويا واعطت القمة النامية المزروعة في وسط حاوي على 50 ملغم/لتر من كل من الحامضين اقل تركيز للمواد الفينولية الذائبة الكلية بلغ 0.004 ملغم / غم في حين كان اعلى تركيز لها قد وجد في البرعم الجانبي المزروع في وسط خالي من الحامضين وكان 0.037 ملغم/غم.

جدول (4) تأثير اضافة توليفات مختلفة من حامض الاسكوربيك والستريك والتعقيم بالمرشحات الدقيقة في تركيز الفينولات الذائبة الكلية (ملغم / غم) للاجزاء النباتية لنخيل التمر صنف بريم المزروعة خارج الجسم الحي.

الستريك+ الأسكوربيك ملغم / لتر	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
0 + 0	0.018	0.037	0.020	0.029	0.026
50 + 50	0.004	0.015	0.007	0.013	0.009
75 + 75	0.008	0.016	0.010	0.015	0.012
100 + 100	0.013	0.028	0.013	0.020	0.018
المعدل	0.011	0.024	0.013	0.019	

قيمة LSD 0.05: للاجزاء النباتية = 0.0041 للمعاملات = 0.0041 للتداخل = 0.0073

2. تأثير توليفات مختلفة من الفحم النباتي الفعال و PVP في تركيز الفينولات الذائبة الكلية للاجزاء النباتية المزروعة

تبين النتائج الموضحة في الجدول(5) تأثير اضافة توليفات مختلفة من الفحم النباتي الفعال و PVP وبوجود 50 ملغم/لتر من كل من حامض الستريك والاسكوربيك في تركيز الفينولات الذائبة الكلية (ملغم/غم وزن طري) لاجزاء نباتية مختلفة لنخيل التمر صنف بريم عند التعقيم بالموصدة. ويلاحظ انخفاض تركيز الفينولات الذائبة الكلية معنويا عند اضافة 2000 و1500 ملغم / لتر من كل من الفحم النباتي الفعال وPVP على التتابع اذ بلغ 0.009 ملغم/غم والذي اختلف معنوياً عن معاملة المقارنة التي اعطت 0.015 ملغم/غم، وكان التركيز 0.010 ملغم/غم عند التركيزين 3000 و1000 ملغم / لتر من الفحم النباتي وPVP على التتابع والذي لم يختلف معنويا عن معاملة التركيزين 1000 و2000 ملغم / لتر فحم نباتي و PVP على التتابع وبلغ 0.011 ملغم/غم. اما فيما يخص الاجزاء النباتية فقد اتضح من الجدول نفسه وجود اختلافات معنوية وتفوق البرعم الجانبي في تركيز المواد الفينولية الذائبة الكلية وبلغ 0.016 ملغم / غم والتي اختلفت معنويا عن بادئات الاوراق والقمة النامية وبلغتا 0.011 و0.006 ملغم /غم. اما بالنسبة للتداخل فقد كان معنويا واعطت القمة النامية المزروعة في وسط حاوي على 2000 و1500 ملغم / لتر من كل من الفحم النباتي وPVP على التوالي اقل تركيز للمواد الفينولية الكلية الذائبة وبلغ 0.003 ملغم / غم، في حين كان اعلى تركيز لها في البرعم الجانبي المزروع في وسط خال من الفحم النباتي و PVP (معاملة المقارنة) وكان 0.021 ملغم / غم.

جدول (5) تأثير اضافة توليفات مختلفة من الفحم النباتي الفعال و PVP في تركيز الفينولات الذائبة الكلية (ملغم / غم) لاجزاء نباتية مختلفة لنخيل التمر صنف بريم

الفحم النباتي + PVP ملغم/لتر	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
0 + 0	0.011	0.021	0.011	0.017	0.015
2000 + 1000	0.005	0.015	0.010	0.013	0.011
1500 + 2000	0.003	0.013	0.009	0.011	0.009
1000 + 3000	0.004	0.015	0.010	0.014	0.010
المعدل	0.006	0.016	0.011	0.014	

قيمة LSD 0.05: للاجزاء النباتية = 0.0006 للمعاملات = 0.0006 للتداخل = 0.00041

ان مضادات الاكسدة مثل الستريك والاسكوربيك لاتمنع تكوين الفينولات ولكنها تمنع بلمرتها (بلمرة الكينون) وهذا يقلل من الفرصة للفينولات للتفاعل مع البروتين (الرفاعي والشوبكي،2002)، ويعزى سبب ارتفاع النسبة المئوية للاسمرار عند التعقيم بالموصدة الى ان ارتفاع درجات الحرارة يؤدي الى تحطم حامض الاسكوربيك وتكون مركبات الفيرفيرال Furfural والتي تعد احدى المواد الوسطية للمركبات الفينولية (الدلالي والركابي، 1996). كما يعزى سبب انخفاض محتوى الفينولات في القمة النامية مقارنة بباقي الأجزاء النباتية المستخدمة الى كون القمة تتألف من خلايا مرستيمية نشطة دائمة الأنقسام وبالتالي تنخفض فيها نسبة المركبات الفينولية . وتتفق هذه النتائج مع ما وجده (خيرالله ،2007 وAslam وKhan،2009 وOthmani واخرون ،2009).

3. تاثير الاوكسين 2,4-D في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس

توضح النتائج المبينة في الجدول (6) ان للتراكيز المختلفة من 2,4-D تاثيرا" معنويا" في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس من الاجزاء النباتية المختلفة المزروعة خارج الجسم الحي اذ بلغ اعلى نسبة لاستحثاث الكالس 28.12% عند التركيز 50 ملغم/لتر وأختلفت هذه النسبة معنويا عن نسبة استحثاث الكالس عند التركيز 25 و100 ملغم/لتر واللتان بلغتا 9.37 و15.62% على التتابع ولم تعط معاملة المقارنة اي إستجابة وتشير نتائج الجدول نفسه الى تفوق القمة النامية معنويا على باقي الاجزاء المزروعة في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس وبلغت 28.12% في حين بلغت النسبة في بادئات الاوراق 18.75% واختلفت معنويا عن النسبة المئوية في كل من البرعم الجانبي وانسجة الجمار اذ بلغت 3.12 % لكل منهما. وبخصوص التداخل بين تراكيز 2,4-D ونوع الجزء النباتي فقد كان معنويا في تاثيره في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس ويتضح بان اعلى نسبة استجابة لاستحثاث الكالس بلغت 50% في القمة النامية المزروعة في الوسط الحاوي على 50 ملغم / لتر 2,4-D (شكل 2)، ولوحظ عدم تكون انسجة الكالس في البراعم الجانبية وانسجة الجمار المزروعة في وسط MS الحاوي 25 و100 ملغم/ لتر من 2,4-D.

جدول (6) تاثير تراكيز مختلفة من 2,4-D في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس من اجزاء نباتية مختلفة لنخيل صنف بريم خارج الجسم الحي.

2,4-D (ملغم / لتر)	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
0	0	0	0	0	0
25	25	0	12.5	0	9.37
50	50	12.5	37.5	12.5	28.12
100	37.5	0	25	0	15.62
المعدل	28.12	3.12	18.75	3.12	

قيمة LSD 0.05: للاجزاء النباتية = 6.17 للتراكيز = 6.17 للتداخل = 11.08

شكل (2) الكالس الاولي الناشئ من القمم النامية لنخيل التمر صنف بريم المزروعة في اوساط حاوية على 50 ملغم 2,4-D بعد ثمانية أسابيع من الزراعة .

4 . تاثير الاوكسين NAA في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس

اما بالنسبة لتاثير NAA في استحثاث الكالس فيتضح من الجدول (7) بان اعلى نسبة لاستحثاث الكالس 37.5% كان عند التركيز 50 ملغم/ لتر والذي اختلف معنويا عن النسبتين 18.7 و25% التي لوحظت عند استخدام التركيزين 25 و 100 ملغم/لتر على التوالي . وبالنسبة لتاثير نوع الجزء النباتي المستخدم في النسبة المئوية الكالس فيلاحظ بان اقل معدل لاستحثاث الكالس كان في البرعم الجانبي 3.12% والذي اختلف معنوياً عن معدل استحثاث الكالس في كل من بادئات الاوراق وانسجة الجمار واللتان بلغتا 28.12 و 12.5% على التتابع . في حين كان اعلى معدل لاستحثاث الكالس في القمة النامية اذ بلغ 37.5% .

اما بالنسبة للتداخل بين تركيز الـ NAA ونوع الجزء النباتي فقد بلغت اعلى نسبة لاستحثاث الكالس 62.5% في القمة النامية عند التركيز 50 ملغم / لتر والتي اختلفت معنوياً عن بقية المعاملات . ويتضح من نتائج الجدول نفسه عدم استجابة البرعم الجانبي عند التركيز 25 و 100 ملغم / لتر ، في حين لم يلاحظ اي تكون للكالس في معاملة المقارنة (بدون أوكسين) .

جدول (7) تاثير تراكيز مختلفة من الـ NAA في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس من اجزاء نباتية مختلفة للنخيل صنف بريم خارج الجسم الحي.

NAA (ملغم / لتر)	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
0	0	0	0	0	0
25	37.5	0	25	12.5	18.75
50	62.5	12.5	50	25	37.50
100	50	0	37.5	12.5	25.00
المعدل	37.5	3.12	28.12	12.5	

قيمة LSD 0.05: للاجزاء النباتية = 6.16 للتراكيز= 6.16 للتداخل = 14.08

5. تاثير الاوكسين Picloram في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس

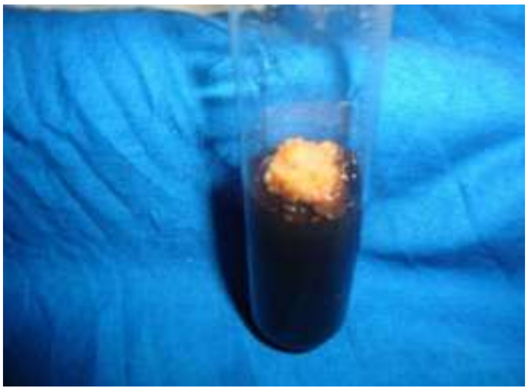
فيما يخص تأثير الاوكسين Picloram في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس فيتضح من نتائج الجدول (8) ان اضافة الـ Picloram الى الوسط الغذائي كان له تأثيرا" في زيادة النسبة المئوية لاستحثاث الكالس اذ بلغت هذه النسبة اعلى مستوياتها عند التركيز 50 ملغم / لتر وبلغت 53.13% واختلفت معنوياً عن التركيز الاقل 25 ملغم / لتر والذي اعطى 31.25% وكذلك عن التركيز الاعلى 100 ملغم / لتر الذي اعطى34.38%. ويلاحظ وجود فروق معنوية بين معدلات النسبة المئوية لاستحثاث الكالس في كل من بادئات الاوراق وانسجة الجمار اذ بلغت 46.88 و 15.63% على التتابع ولم تختلف الاخيرة عن البرعم الجانبي الذي أعطى 6.25% على التتابع اما القمة النامية فقد اعطت اعلى معدل لاستحثاث الكالس بلغ 50% والذي اختلف معنوياً عن بقية الاجزاء (شكل 3).

شكل (3) الكالس الاولي الناشئ من القمة النامية لنخيل التمرصنف بريم المزروعة في وسط حاوي على 50 ملغم Picloram بعد أربعة أسابيع من الزراعة. وبالنسبة للتداخل بين نوع الجزء النباتي وتركيز الـ Picloram فيلاحظ ارتفاع النسبة المئوية لاستحثاث الكالس في القمة النامية باختلاف التركيز فقد ادت زراعة القمة النامية في وسط مجهز بـ 50 ملغم / لتر Picloram الى الحصول على اعلى نسبة مئوية لاستحثاث الكالس بلغت 87.5% والتي اختلفت معنوياً عن معاملة التركيزين 25 و 100 ملغم / لتر اذ بلغتا 62.5 و 50% على التتابع للجزء النباتي نفسه، فيما لم يلاحظ أي تكون للكالس في الوسط الخالي من الاوكسين (معاملة المقارنة) وبغض النظرعن نوع الجزء النباتي.

جدول (8) : تاثير تراكيز مختلفة من الاوكسين Picloram في النسبة المئوية لاستحثاث الكالس من اجزاء نباتية مختلفة لنخيل التمر صنف بريم خارج الجسم الحي.

Picloram (ملغم / لتر)	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
0	0	0	0	0	0
25	62.5	0	50	12.5	31.25
50	87.5	12.5	75	37.5	53.13
100	50	12.5	62.5	12.5	34.38
المعدل	50	6.25	46.88	15.63	

قيمة LSD 0.05: للاجزاء النباتية = 12.36 للتراكيز= 12.36 للتداخل = 22.64



شكل (4) ادامة انسجة الكالس لنخيل التمرصنف بريم المزروعة في وسط حاوي على Picloram تركيز50 ملغم/لتر.

6. تأثير نوع الاوكسين في المدة اللازمة لنشوء الكالس (يوم)

اتضح من خلال النتائج المدرجة في جدول(9) تأثير انواع مختلفة من الاوكسينات هي 2,4-D ، NAA و Picloram بتركيز 50 ملغم / لتر في المدة اللآزمة لنشوء الكالس الاولي والتي امكن تمييزها بالعين المجردة وقد اختلفت معنوياً اذ تفوق الاوكسين Picloram واعطى اقل مدة زمنية (40 يوماً) مقارنة بكل من 2,4-D وNAA والتي بلغت المدة الزمنية 63 و 59 يوماً على التتابع. وقد تم ادامة انسجة الكالس بنقلها الى اوساط حاوية على 50 ملغم/لتر Picloram (شكل 4)

جدول (9) تأثير نوع الاوكسين في المدة اللازمة لنشوء الكالس (يوم) لنخيل التمر صنف بريم خارج الجسم الحي.

نوع الاوكسين	المدة اللازمة لنشوء الكالس (يوم)
2,4-D	64
NAA	59
Picloram	40

قيمة LSD 0.05: للمعاملات = 4.62

وقد يعود سبب اختلاف النسبة المئوية لاستحثاث الكالس بين الاجزاء النباتية الى أستجابة الخلايا المتفاوته للاوكسين بسبب وجود مستقبلات الاوكسين المختلفة والتي تعمل متزامنة مع الاوكسين الداخلي المستقطب حول النسيج الوعائي على تحفيز خلايا البشرة للانقسام وبدء نشوء الكالس الاولي وقد لوحظ ان وجود مادة 2,3,5-triodbenzoic acid (TIBA) المثبطة لانتقال الاوكسين لم يحدث تجمع للاوكسين قرب النسيج الوعائي ولم يلاحظ تكون كالس (Neumann واخرون،2009). أما عدم استجابة البرعم الجانبي عند التركيزين 25 و 100 ملغم/لتر من كل من 2,4-D و NAA فلربما يعزى الى كون هذه التراكيز أقل واعلى من التركيز اللازم لأحداث الأستجابة على التوالي. ويعزى تفوق Picloram الى وجود مجموعة امين الضرورية لبناء البروتينات ذات الوزن الجزيئي الواطئ التي تؤدي دورا" مهما" في انقسام ونمو الخلايا إذ تعطي اشارات لجينات الدرجة الثالثة لبدء عملية التعبير الجيني للخلاياالمفردة لتحفيز نشوء الكالس (George واخرون، 2008). وتتفق هذه النتائج مع ما وجده (Ibraheem واخرون، 2010 وSaka، 2010 و Jain واخرون، 2011).

المصادر

البكر، عبد الجبار. 1972. نخلة التمر- ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وتجارتها. مطبعة العاني. بغداد- العراق.

خيرالله، حسام سعد الدين محمد. 2007.الإكثار الدقيق لصنفين من نخيل التمر .*Phoenix dactylifera* L باستخدام النورة الزهرية ودراسة الثبات الوراثي باستخدام مؤشرات تباين أطوال قطع الدنا المتضاعفة (AFLP).أطروحة دكتوراه. جامعة بغداد، كلية الزراعة ، بغداد، العراق .

الدلالي، باسل كامل والركابي، كامل.1996 . كيمياء الاغذية . جامعة بغداد.وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .العراق .

الرفاعي .عبدالرحيم توفيق ؛ الشوبكي .سمير عبد الرزاق. 2002 .تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة الانسجة .دار الفكر العربي مصر.

الساهوكي ، مدحت ووهيب ،كريمة احمد .1990 تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .العراق.

المير ، اسامة نظيم والابريسم ، اوراس طارق .2008. تأثير نترات الامونيوم والبوتاسيوم في بعض صفات كالس واجنة نخيل التمر صنف البرحي خارج الجسم الحي .مركز ابحاث النخيل\جامعة البصرة.

Aslam, J., Khan, S. A., 2009. *In vitro* micropropagation of khalas date palm(*Phoenix dactylifera* L.), an important fruit plant. J. Fruit and Ornamental Pl. Res. Vol. 17(1): 15-27.

Gautheret, R. J. 1985. History of Plant Tissue and Cell Culture: A Personal Account, in: I. K, Vasil (Ed), Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants, Vol. 2: Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation, and Cryopressrvation Academic Press, Inc., Orlando, pp.1-59.

George , E. F., Michael , A. and G. D. Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culure. Third Edition. Springer, Netherland. p.118-182.

George, E. F. and P. D. Sherrington. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Second Edition. Exegetics Ltd. England.

Ibraheem, Y. M., Pinker, L. and M. Bohme. 2010. Somatic embryogenesis approach for shoot tips of date palm cv. Zaghlool. (Abst) 4th Inter. Conf. Date Plam, UAE. March, p.68.

Jain, S. M., Al-Khayri, J. M. and Johnson, D. V. 2011. Date Palm Biotechnology, Springer Science Business Media, Netherland.

Neumann, H; A. Kumar and J. Imani .2009. Plant Cell and Tissue culture-A tool in Biotechnology. Basics and applications. Germany, pp.90-137.

Othmani, A., C. Bayoudh, N. Drira, M. Marrakchi and M. Trifi, 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L. ,cv.Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus .Plant Cell Tiss. Org. Cult., 97:71-79.

Saka, H., 2010. Somatic embryogenesis and cell suspension cultures from mature zygotic embryo of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). recherché Agronomique 0:1-8.

Tisserat, B. 1991. Clonal propagation of palms. Plant tissue culture manual C2:1-14.

Mahadevan, A. and Sridha, R. 1986. Methods in Physiological Plant Pathology. Siva Kami Publications, Indira nagar, India.