أثر اختلاف الجزء النباتي المستخدم في ظهور المشاكل والمعوقات الفسيولوجية على إكثار بعض أصناف نخيل التمر الحساوية معملياً

وائل فتحي حسن شحاتة

قسم التقنية الحيوية الزراعية، كلية العلوم الزراعية والأغذية، جامعة الملك فيصل
الأحساء، المملكة العربية السعودية

الملخص

أجريت هذه الدراسة على عدة أجزاء نباتية مختلفة كالقمة النامية، البراعم الجانبية، والأوراق الغضة تم أخذها من أصناف نخيل التمر التالية: برحي، خلاصي، ورزيز. حيث زرعت على وسط غذائي يحتوي على تراكيز عالية من الأوكسينات (2,4-D; NAA and IAA) وفي إظلام تام تحت درجة حرارة 2± 25°م.

من أهم النتائج المتحصل عليها أن أعلى نسبة تلوث كانت في البراعم الجانبية لصنف برحي، وأقل نسبة تلوث كانت مع القمة النامية لصنف خلاصي ثم صنف رزيز بالرغم من إجراء عملية التعقيم عليها. في حين كانت أعلى نسبة حيوية كانت في القمة النامية لصنف خلاصي، وأقل نسبة حيوية كانت في البراعم الجانبية والأوراق الغضة لصنف برحي. بينما كان أعلى نسبة فقد (وفيات) في البراعم الجانبية لصنف برحي، وأقل نسبة لوحظت في القمة النامية لصنف خلاصي.

وقد أظهرت النتائج أيضاً وجود بعض المعوقات الفسيولوجية التي تعيق وتضر بالنسيج المنزرع متمثلة في ظاهرتي التلون البني والشفافية، حيث تم رصد ظاهرة التلون البني في جميع الأصناف المنزرعة ولكن بدرجات متفاوتة وكان الصنف برحي الأكثر تأثراً، بينما الأوراق الغضة أكثر الأجزاء تأثراً من بين الأجزاء المنزرعة. حيث اختلفت درجة تلون الجزء النباتي باللون البني باختلاف الصنف وكذلك حسب نوعية الجزء النباتي المستخدم. وعلى العكس من ذلك، لم تؤكد الدراسة مدى تأثير هذه العوامل على ظهور مرض الشفافية حيث تم ملاحظته فقط على البراعم الجانبية لصنف رزيز. كما أوضحت النتائج أيضاً أن أفضل نتيجة لتكوين الكالس في القمم النامية لجميع الأصناف قيد الدراسة خاصة في صنف خلاصي.

الكلمات المفتاحية: التلون البني، الحيوية، الكالس، مرض الشفافية، معدل الوفيات، نخيل التمر.

المقدمة

نخيل التمر (*Phoenix dactylifera L.*) شجرة وحيدة الفلقة ثنائية الجنس له مكانه عظيمة وقدسية عند المواطن العربي وبالرغم من أنه أكثر النباتات إهمالاً بسبب طبيعة نموه ذات العمر الطويل مما حد بشكل كبير من التقدم به في مجالات التربية والتحسين الوراثي (Al-Khayri, 2001; El-Bahr *et al*., 2003). ومن المعلوم لدى الجميع أن طرق إكثار النخيل التقليدية بطيئة سواء أكانت عن طريق البذور (تستخدم عادة عند الرغبة في استنباط أصناف جديدة) (Al-Khalifa, 2009)، أو عن طريق الفسائل (الطريقة الشائع استخدامها على مر العصور) إلا أنها طريقة يعاب عليها نقل الأمراض أو الإصابة بالحشرات، بالإضافة إلى قلة إنتاج الفسائل بشكل عام خاصة في الأصناف المرغوبة كما أن نسبة نجاح زراعتها منخفضة بسبب ضعف مجموعها الجذري، بجانب وجود مشكلة عدم التجانس الوراثي للنخيل بسبب الاختلاف في العدد الكروموسومي بين الأصناف (Mater, 1986; Daguin and Letouzé, 1988; Sharma *et al*., 1990). وتعد تقنية زراعة الأنسجة النباتية من التقنيات الحديثة التي تم الاعتماد عليها في إكثار النخيل لما توفره من مزايا وإمكانيات واعدة والتغلب على أغلب مشاكل التي تواجه نمو النخيل في الطبيعة وقد لاقت قبولاً من جميع المهتمين بالنخيل في الآونة الأخيرة، حيث كانت أول محاولة ناجحة في هذا نهاية السبعينيات من خلال زراعة أنسجة أخذت من قلب النخلة (الجمارة) تكشفت ونتج عنها خلايا متكشفة غير منتظمة (الكالس) (Tisserat, 1979)، ومع التقدم في الدراسات تم الحصول على مختلف الأعضاء من هذه الخلايا خلايا متكشفة غير منتظمة، كما أن الفسائل الناتجة منها تتميز بأنها خالية من أي مسببات مرضية أو الحشرية، وذات نمو متماثل وأسرع عن غيرها، ومطابقة للأصل (Sudhersan *et al*.,1993; Letouze *et al*.,1998; Eshraghi *et al*., 2005; Eke *et al*., 2005). بالإضافة إلى إمكانية التحسين الوراثي للتمور على مستوى الخلية بهذه الوسيلة بشكل أفضل وأسرع عن طرق التربية التي تحتاج إلى وقت طويل (Al-Maari and Al-Ghamdi, 1995; George *et al*., 2008).

وعلى الرغم من مزايا الزراعة النسيجية لنخيل التمر، إلا أن هناك بعض المشاكل والمعوقات التي تهدد من التوسع في زراعة وإكثار النخيل معملياً، ومن أهم هذه العقبات التي تم رصدها خلال الدراسات السابقة خاصة ما أثيرت في الآونة الأخيرة حول مدى سلامة الصفات الوراثية للنسل الناتج من الطفرات واحتمالية ظهور بعض المعوقات الأخرى الفسيولوجية أثناء الإكثار الدقيق للنخيل مثل: ظاهرة الاسمرار، مرض الشفافية، تكون الكالس على قواعد النبيتات، تدهور الكالس، وعدم الثبات الوراثي للنباتات الناتجة (Al-Maari, 1995; Alkhateeb and Ali-Dinar, 2002). بالإضافة إلى أن هذه الاختلافات قد لا تظهر إلا بعد بلوغ الأشجار أي بعد حوالي 5-7 سنوات (Alkhateeb, 2008)، وتعتبر هذه خسارة كبيرة إذا ما تبين لاحقاً أن هناك اختلافاً وظهور صفات أخرى غير مرغوبة. وقد ظهرت بعض هذه المشاكل في بعض أصناف النخيل الناتجة معملياً بالمملكة العربية السعودية وذلك خلال عام 1992 على صنف البرحي. ومن أهم هذه الظواهر غير المرغوبة: مشكلة الشيص (ثمار لا تنضج)، تعدد الكرابل، التقزم، بطء النمو، ظهور الاختلافات المورفولوجية، وحدوث الطفرات (Gurevich *et al.*, 2005).

ومن المعروف أن التلون البني ومرض الشفافية من أهم المعوقات الفسيولوجية التي تواجه القائمين في هذا المجال التقني المهم حيث تؤدي إلى فقد المادة الوراثية وموتها في نهاية الأمر. ألا أنه في السنوات الأخيرة قد أثبتت الدراسات تمتع أنسجة النخيل بالمواد الفينولية ومضادات الأكسدة التي لها دور كبير في زيادة المناعة (Alkhateeb, 2008). مما وجه الباحثين إلى إنتاجها وإقامة الأبحاث العديدة لتقدير كميتها وتحديد العوامل التي تساعد على زيادة إفراز تلك المواد بكميات كبيرة دون الانتظار إلى الوصول لمرحلة البلوغ (Othmani *et al.*, 2009).

وتعد ظاهرة الاسمرار (التلون البني) من أهم المعوقات الفسيولوجية الصعبة التي تواجه الباحثين وتحد من نجاح إكثارها معملياً بدرجة كبيرة. ويرجع ذلك إلى أن المركبات الفينولية تتحول إلى مواد كوينونية، مركب سام جداً على النبات خاصة في

وجود إنزيمات الأكسدة مثل البولي فينول أوكسيديز والبيراكسيديز وهذه الإنزيمات تتميز باحتوائها على عنصر النحاس الذي يزيد من فاعلية تلك الإنزيمات. بالإضافة إلى الارتباط الحاصل بين الفينولات والبروتينات مما يؤدي إلى فقد العديد من الإنزيمات المهمة فيحدث ذلك (Alkhateeb and Ali-Dinar, 2002).

وبصفة عامة، يرجح ظهور هذه الظاهرة إلى عدة عوامل منها على سبيل المثال: عوامل متعلقة بالجزء النباتي نفسه كنوع وعمر نبات الأم (Belal *et al*., 2004)، كما وجد أن الأجزاء التي زرعت خلال فصل الشتاء أقل تعرضاً للتلون البني عن التي زرعت في فصل الصيف (Al-Maari and Al-Ghamdi, 1995; Ibrahim *et al*., 1999). عوامل متعلقة بتركيب الوسط الغذائي، فمن المعروف أن ارتفاع نسبة +NH4 في الوسط الغذائي يؤدي إلى زيادة درجة حموضة البيئة مما يقلل من امتصاص عنصر البوتاسيوم ومن ثم زيادة إفراز المركبات الفينولية مما يقلل من تكوين الكالس الجنيني، وبالتالي يجب مراعاة التوازن بين الأمونيا والنترات والبوتاسيوم (NH_4^+, NO_3^-, K) في الوسط المغذي حتى نتغلب على هذه الظاهرة (Zaid, 1984). كما أن زيادة نسبة مركب بوتاسيوم داي هيدروجين فوسفيت ($KH_2PO_4.2H_2O$) عن 200 ملجم/ لتر قد تساعد على ظهورها بشكل كبير. أما فيما يتعلق بالهرمونات خاصة الأوكسينات والبنزيل أمينو بيورين (BAP) عند استخدامها بتراكيز عالية فقد لوحظ أنها تسهم على إفراز المركبات الفينولية. كما أن نوعية الآجار المستخدم تؤثر بشكل واضح على تكون هذه الظاهرة وهذا ما أكده كل من (Zaid, 1986; Ibrahim *et al*., 1999; Belal *et al*., 2008; Alkhateeb, 2008). وهناك عوامل أخرى قد تسهم بشكل أو بأخر في التلون البني للنسيج المنزرع مثل زيادة شدة الإضاءة أو ارتفاع درجة الحرارة بسبب زيادة إفراز المركبات الفينولية في الوسط الغذائي. وقد تظهر على الجزء النباتي المنزرع بسبب الاستخدام المفرط لمواد التعقيم، أو بسبب حدوث جروح به أثناء عملية الزراعة الأولية والنقل (Abul-Soaud *et al*., 2004).

ومن جهة أخرى، نجد أن مرض الشفافية يرجع ظهوره إلى عدة أسباب أهمها

الاستخدام المفرط وبتراكيز عالية من الأوكسينات (Zaid, 1986)، وقد يعود لأسباب أخرى مثل كثرة نقل المنفصل النباتي على البيئة السائلة عن الصلبة، أو بسبب عدم إضافة الفحم بالوسط الغذائي مما يساعد على ظهورها أثناء مراحل النمو المختلفة (Al-Maari, 1995; Alkhateeb *et al*., 2006). ويمكن التغلب على هذا المرض أما باستخدام الفحم النشط مع تقليل نسبة الأمونيا في البيئة أو باستخدام تركيزات مناسبة من الهرمونات النباتية، بالإضافة إلى عدم استخدام البيئات السائلة بشكل مبالغ فيه. أو باستخدام الجيل رايت بدلاً من الآجار مما يحد بدرجة كبيرة من ظهورها على الأجزاء المنزرعة (Debergh *et al*., 1992; Alkhateeb *et al*., 2006).

بينما كان الهدف الأساسي من هذه الدراسة هو معرفة مدى تأثير الأجزاء النباتية والأصناف على الحد من ظهور بعض المشاكل التي تضر بالنسيج المنزرع بالرغم من إجراء عملية التعقيم عليها كالملوثات وفقدان الحيوية. وعلى ظهور بعض المعوقات الفسيولوجية بسبب الاستخدام المفرط سواء من تعدد المركبات الكيمائية أو استخدامها بتراكيز عالية خاصة مع مواد التعقيم أو مع منظمات النمو النباتية (Al-Khayri, 2003; Al-Khayri and Al-Bahrany, 2004)، ومن ثم الوصول إلى أفضل طريقة لإكثار النخيل بطريقة التكشف الجنيني الجسدي معملياً، والمحافظة على المزرعة النسيجية من أي مسببات مرضية وتوفير مادة وراثية نقية يمكن الاعتماد عليها في أجراء العديد من الدراسات والتجارب البحثية.

المواد وطرق العمل

أجريت هذه الدراسة بمعمل الزراعة النسيجية - قسم التقنية الحيوية الزراعية - كلية العلوم الزراعية والأغذية - جامعة الملك فيصل خلال الفترة من 2011 : 2012م.

1. الجزء النباتي المستخدم:

زرعت الأجزاء النباتية (البراعم الجانبية، والأوراق الغضة والقمم النامية) المأخوذة من فسائل عمر 3-5 سنوات تمثل ثلاثة أصناف مختلفة تم الحصول عليها من مزرعة النخيل التابعة لمركز أبحاث النخيل التمور بالجامعة - الأحساء. وذلك بهدف تحديد

أفضل الأجزاء النباتية من حيث التكشف والنمو وكذلك الأكثر تعرضاً لظهور هذه المشاكل والمعوقات عليه.

2. إعداد المادة النباتية:

تم إزالة السعف الخارجي للفسائل بشكل تدريجي من الخارج إلى الداخل ومن أعلى إلى أسفل بحذر تام حتى لا يحدث أي ضرر بالأجزاء النباتية المراد أخذها حتى نصل إلى قلب النخلة، ثم وضعت جميع الأجزاء النباتية بعد فصلها مباشرة في محلول مضاد للأكسدة يحتوي على 150 ملجم/ لتر من حامض الأسكوربيك و 100 ملجم/لتر من حامض الستريك للحفاظ عليه من إفرازات المواد الفينولية قبل البدء في عملية التعقيم (Al-Kharyi and Al- Maari, 1997; Shehata, 2008)، حيث أجريت عملية التعقيم على عدة خطوات كانت على النحو التالي:

- وضع جميع الأجزاء النباتية المستأصل في مبيد فطري (Benlate) بتركيز 3جم/لتر لمدة 20 دقيقة بهدف القضاء على الفطريات السطحية (Abo El-Nil, 1986).
- تم نقل الأجزاء النباتية في محلول الكلوركس 30% (1.575% من NaOCL) مضاف إليه 2-3 نقاط/ 100 مل من مادة (التوين - 20 (Tween-20)) لمدة 20 دقيقة (Ibrahim, 1999).
- ثم تنقل الأجزاء النباتية في كحول إيثيلي بتركيز 70 % لمدة 2-5 ق. ويراعى الغسيل الجيد للأجزاء النباتية بعد كل خطوة ثلاث مرات على الأقل بالماء المقطر المعقم بهدف إزالة آثار مواد التعقيم (Belal and El-Deeb, 1997; Al-Kharyi, 2001; El-Bahr *et al*., 2003).
- وأخيراً توضع في محلول مضاد للأكسدة مرة أخرى وتنقل إلى جهاز الهود لزراعتها على الوسط الغذائي المعد لذلك وتحت ظروف معقمة (Belal *et al*., 2004).

3. إعداد البيئة الغذائية:

يتكون الوسط الغذائي من وصفة موراشيجي وسكوج (Murashige and Skoog, 1962)، مع إضافة بعض المكونات الأخرى بالـ (مليجرام/لتر): -

100, Myo-Inositol; 80, Adenine Sulfate; 170, $NaH_2PO_4.2H_2O$; 30000, Sucrose; 2000, Gerlite; 2000, Active Charcoal; 40, 2,4-D; 10, NAA and 10, IAA.

وبعد إذابة المادة الهلامية بالتسخين تم توزيع الوسط الغذائي في أوعية الزراعة بمعدل 50 مل/ وعاء، ثم تعقم داخل الأتوكلاف (Autoclave) على درجة حرارة 121°م وتحت ضغط جوي مقداره 1.05 كجم/سم^2 ولمدة 20 ق. حيث تنقل الأجزاء النباتية المنزرعة على وسط غذائي جديد كل شهرين.

4. مرحلة البداية:

الهدف من هذه المرحلة هو الحصول على أجزاء نباتية خالية من أي ملوثات مسببة للأمراض. حيث تم تسجيل البيانات اللازمة لتحديد مدى ملاءمة عملية التعقيم على تطور ونمو الأجزاء النباتية المنزرعة معملياً مثل تحديد نسبة التلوث، موت النسيج، ومعدل البقاء. وأخذ بعض القياسات الأخرى الدالة على ظهور بعض الظواهر المصاحبة خلال تلك المرحلة مثل ظاهرة التلون البني ومرض الشفافية التي قد تحدث أثناء عملية التعقيم نتيجة استخدام تراكيز عالية من مواد التعقيم أو بسبب حدوث جروح ناجمة من الأدوات التشريح أثناء عملية فصل وزراعة الأجزاء النباتية (Benjama *et al.*, 2001; Oda *et al.*, 2003).

5. مرحلة تكوين الكالس:

هي مرحلة توجيه جميع الأجزاء النباتية المنزرعة لتكوين الكالس. حيث زرعت جميعها على نفس تركيب الوسط الغذائي السابق ذكرها (Belal *et al.*, 2008). وتحضن في إظلام تام وعلى درجة حرارة 2± 25°م (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2004).

6. تسجيل البيانات:

تم الاعتماد على طريقة (Pottino,1981) في تحليل المشاهدات وتسجيل البيانات بهدف تحديد أفضل الأصناف المنزرعة من حيث استجابتها لتكوين الكالس أثناء فترة النمو، وتحديد مدى قابلية الأجزاء النباتية المنزرعة للتلوث وفقد حيويتها والمعوقات

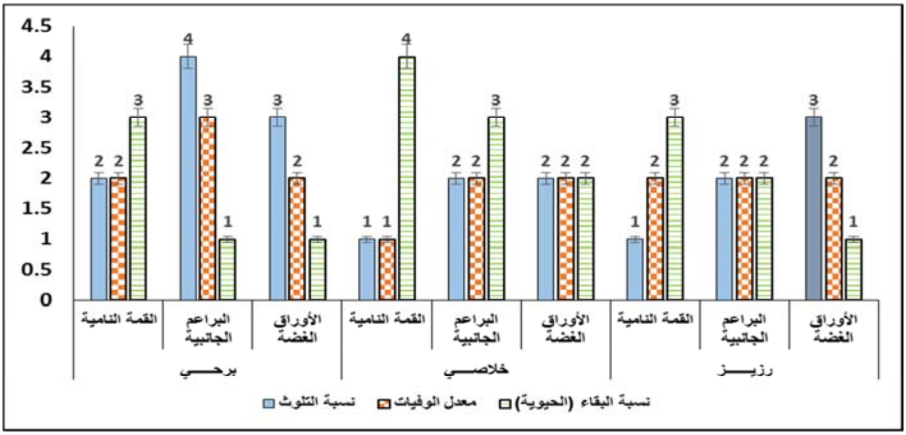
الفسيولوجية التي تؤثر على نموها معملياً. حيث أخذت البيانات المطلوبة على هيئة نسبة مئوية لعدد من العينات لا تقل عن 5 مكررات في المعاملة الواحدة، كانت على النحو التالي:-

1 = نتائج سلبية [ضعيف (0-25%)]. 2 = نتائج أقل من المتوسط [مقبول (26 -50%)].
3 = نتائج متوسطة [جيد (51 -75%)]. 4 = نتائج عالية [ممتاز (76 -100%)].

النتائج والمناقشة

1. مرحلة البداية:

يبين (شكل، 1) أثر الأجزاء النباتية لمختلف الأصناف المنزرعة على ظهور بعض المشاكل مثل نسبة تلوث، موت، وحيويتها (Contamination, Mortality, and Survival %). حيث اتضح لنا أن أعلى نسبة تلوث كانت في البراعم الجانبية لصنف برحي (3.00)، وأقل نسبة تلوث كانت في القمة النامية لصنف خلاصي وصنف رزيز (1.00). في حين أن أعلى نسبة حيوية كانت في القمة النامية لصنف خلاصي (4.00)، وأقل نسبة حيوية كانت في البراعم الجانبية والأوراق الغضة لصنف برحي (1.00). بينما كان أعلى معدل وفيات في البراعم الجانبية لصنف برحي (3.00)، وأقل نسبة كانت في القمة النامية لصنف خلاصي (1.00). وقد تم ملاحظة أن صنف برحي كان أكثر الأصناف تأثراً بمواد التعقيم عن باقي الأصناف خاصة على البراعم الجانبية والأوراق الغضة على التوالي مما أدى إلى فقد حيويتها بدرجة كبيرة، عكس ما حدث على القمة النامية التي أظهرت قدرتها العالية على تحمل الاستخدام المفرط من مواد التعقيم بشكل واضح في جميع الأصناف، ومن ثم القدرة على استعادة حيويتها ونشاطها والتوجه إلى تكوين الكالس. وقد يرجع ذلك إلى قدرة القمة النامية على تحمل مواد التعقيم عن باقي الأجزاء الأخرى أو بسبب الاستخدام المفرط من استخدام المواد الكيميائية سواء بتعدد الأنواع أو باستخدام تراكيز عالية منها. مع الوضع في الاعتبار احتمالية ظهور ذلك بسبب عدم إتقان العمل وعدم دقته من القائمين بعملية (Zacchini and Agazio, 2004; Belal *et al*., 2008).



1= ضعيف (0-25%) 2= مقبول (26-50%) 3= جيد (51-75%) 4=ممتاز (76-100%)

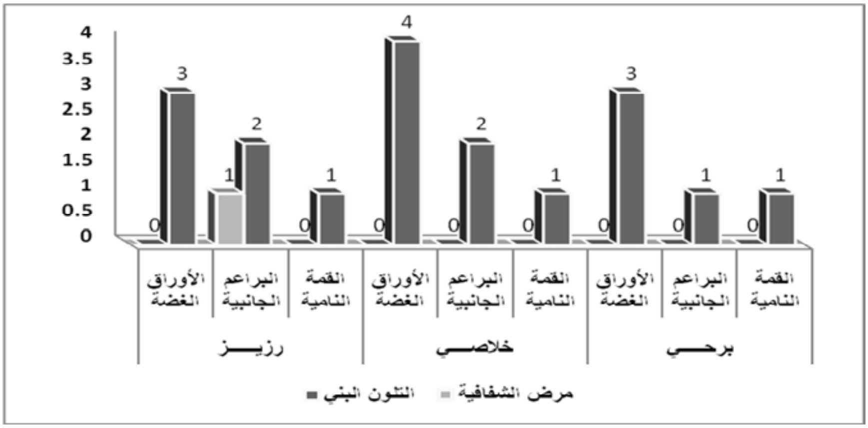
شكل (1): تأثير مواد التعقيم على الأجزاء النباتية المنزرعة أثناء مرحلة البداية وذلك بعد مرور شهر من بدء الزراعة الأولية داخل المعمل.

2. المعوقات الفسيولوجية:

تم رصد أهم المعوقات الفسيولوجية التي قد تحدث أثناء نمو النسيج النباتي المنزرع معملياً. وقد أتضح من خلال البيانات والمشاهدات التي تم ملاحظتها ما يلي: تم رصد ظاهرة التلون البني على أغلب الأجزاء النباتية المنزرعة في جميع الأصناف خاصة صنف برحي فكانت هذه الحالة واضحة تماماً (جلياً). بينما تم رصد مرض الشفافية على صنف رزيز فقط، ولم يظهر في باقي الأصناف خلال الفترة نفسها. وكانت أهم النتائج المتحصل عليها على النحو التالي:

2-1. التلون البني:

يتضح من (شكل، 2 و3) أن صنف برحي كان أكثر الأصناف تأثراً بالتلون البني مقارنة بباقي الأصناف الأخرى على الرغم من ظهور هذه الظاهرة في جميع الأصناف بشكل واضح ولكن بدرجات متفاوتة وهذا يدل على تأثر الجزء النباتي بمواد التعقيم المستخدمة خاصة على الأوراق الغضة (3.00)، ثم البراعم الجانبية (2.00)، وأخيراً القمة النامية (1.00).



1= ضعيف (0-25%)   2= مقبول (26-50%)   3= جيد (51-75%)   4=ممتاز (76-100%)

شكل (2): تأثير المعوقات الفسيولوجية (التلون البني، ومرض الشفافية) على نمو الأجزاء النباتية خلال مرحلة تكوين الكالس لأصناف مختلفة من نخيل التمر.

شكل (3): ظاهرتي التلون البني ومرض الشفافية من أهم المعوقات الفسيولوجية التي ظهرت على الأجزاء النباتية النامية بتقنية الزراعة النسيجية.

تظهر هذه الظاهرة بسبب إفراز بعض المركبات السامة كالمركبات الفينولية في البيئة الغذائية مما يؤدي إلى اسمرار المنفصل النباتي ومن ثم تحلله وموته بعد فترة من الزمن. ويرجع ذلك إلى أن المركبات الفينولية تتحول إلى مواد كوينونية مركب سام جداً على النبات خاصة في وجود إنزيمات الأكسدة. وكذلك حدوث ارتباط بين الفينولات والبروتينات مما يؤدي إلى فقد العديد من الإنزيمات المهمة فيحدث ذلك

(Alkhateeb and Ali-Dinar, 2002).

ويرجح ظهورها إلى عدة عوامل متعلقة بالجزء النباتي نفسه كنوع وعمر نبات الأم، فقد لوحظ أن مبادئ الأزهار لنخيل التمر تكون أقل عرضة للاسمرار عن القمم النامية والبراعم الجانبية (Drira and Al-Sha'ary, 1993)، بينما أثبت (Belal *et al*., 2004) أن القمة النامية أقل تعرضاً للاسمرار عن مبادئ الأوراق والبراعم الجانبية. كما أن موسم الزراعة يؤثر على الجزء النباتي فقد وجد أن الأجزاء المنفصلة خلال فصل الشتاء أقل تعرضاً للاسمرار عن التي تؤخذ بفصل الصيف (Al-Maari and Al-Ghamdi, 1995; Ibrahim *et al*., 1999). كما وجد أن الإقلال بقدر الإمكان من تجريح النسيج المنزرع والحفاظ عليه أثناء عملية الزراعة والنقل يساعد بدرجة كبيرة من الحد من إفراز المواد الفينولية في الوسط المغذي، ومن ثم لا يفقد حيويته وينمو بشكل طبيعي (Meghwal *et al*., 2001; Abul-Soaud *et al*., 2004). بالإضافة إلى الاهتمام بالتوازنات بين مركبات البيئة الغذائية مثل التوازن بين الأوكسينات والسيتوكينينات، وكذلك التوازن بين الأمونيا والنترات والبوتاسيوم (Zaid, 1984)، واختيار نوعية جيدة من الكيماويات خاصة نوعية الآجار المستخدم حيث يؤثر بشكل واضح على تكون هذه الظاهرة (Zaid, 1986; Ibrahim *et al*., 1999). كما أن هناك عوامل أخرى (فيزيائية) يجب عدم إغفالها حتى نحد من ظهور تلك الظاهرة من أهم تلك العوامل درجة الحرارة وشدة الإضاءة وهذا ما أوضحه كل من (Belal *et al*., 2008; Alkhateeb, 2008)

وبصفة عامة، يمكن التغلب على هذه الظاهرة باتباع أحدى الطرق التالية: إضافة الفحم النشط إلى الوسط الغذائي لامتصاص المواد الفينولية، استخدام مضادات الأكسدة [حمض اسكوربيك + حمض ستريك] في الوسط الغذائي أو على الجزء النباتي أثناء عملية تعقيم الجزء النباتي، استخدام بعض المواد الأخرى مثل البولي فينيل بيروليدون PVP والكافين Caffeine، التي لها تأثير إيجابي في الحد من تلك الظاهرة، وهذا ما أكدته العديد من الدراسات السابقة (Zaid, 1984; Tisserat *et al*., 1979; Sharma *et al*., 1984; Al-Maari, 1995).

2-2. مرض الشفافية:

يتضح من (شكل،2 و 3) أن مرض الشفافية (Vitrification) المعروف باسم الظاهرة الزجاجية أو التزجيج (Debergh *et al*., 1992) لم يظهر إلا على البراعم الجانبية لصنف رزيز فقط (1.00)، أما باقي الأجزاء الأخرى لمختلف الأصناف فلم يتم رصدها خلال فترة التجربة. حيث يصبح الجزء النباتي شفافاً أثناء مراحل نمو وتطور المنفصل النباتي كما هو الحال أثناء تكوين الكالس، الأجنة الجسدية، أو على النموات الخضرية في بعض الأحيان، بسبب زيادة محتواها المائي ثم يميل للاسمرار مما يؤدي إلى فقد حيويتها ووقف نموها ومن ثم موتها في نهاية الأمر. ويرجح ذلك إلى الاستخدام المفرط وبتراكيز عالية من الأوكسينات خلال فترة الدراسة وهذا ما يتفق مع (Zaid, 1986). وقد أكدت الدراسات السابقة أن استخدام البيئة السائلة عن الصلبة (Al-Maari, 1995)، أو بسبب عدم إضافة الفحم مما يساعد على ظهورها خاصة أثناء مرحلة تكوين الأجنة الجسدية (Alkhateeb *et al*., 2006). وعليه يمكن الوقاية من هذا المرض أما باستخدام الفحم النشط مع تقليل نسبة الأمونيا في البيئة أو باستخدام تراكيز مناسبة من الهرمونات، بالإضافة إلى عدم استخدام البيئات السائلة بكثرة. أو استخدام الجيل رايت بدلاً من الآجار مما يحد من ظهورها على الأجزاء المنزرعة (Debergh *et al*., 1992).

ومن الملاحظ أيضاً أن النباتات المصابة بهذا المرض تكون ذات وزن جاف منخفض عن النباتات السليمة لزيادة محتواها المائي وانخفاض كمية السليلوز بها ونقص في الجنين، وكما نجد انخفاض نشاط إنزيم البيروكسيديز بالنباتات المصابة، وهذا ما أكده (Alkhateeb, 2008).

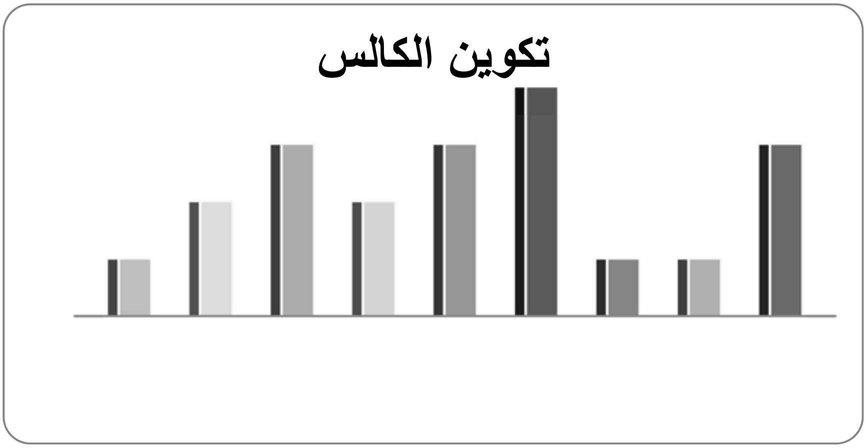
3. مرحلة تكوين الكالس:

يتضح من (شكل،4 و 5) أن نسبة الكالس المتكون على الأجزاء المنزرعة للأصناف قيد الدراسة، وكانت النتائج التي تم رصدها خلال هذه المرحلة على النحو التالي: كانت القمة النامية لصنف خلاصي أفضل الأصناف المكونة للكالس خلال

فترة التجربة عن باقي الأصناف المنزرعة (4.00)، في حين كانت أقل النتائج مع الأوراق الغضة لصنفي برحي ورزيز (1.00).

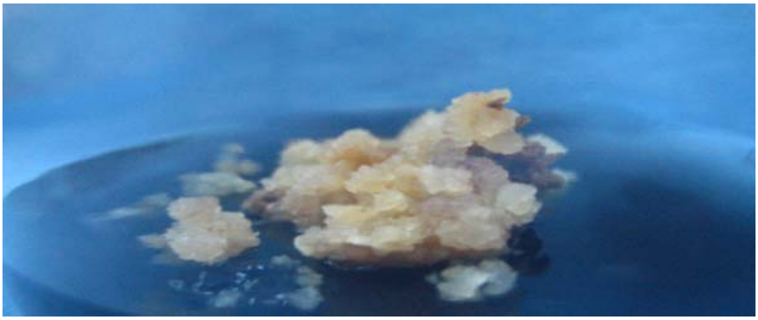
وقد يرجع ذلك إلى أن صنف الخلاصي كان أكثر الأصناف المنزرعة حيوية وأقل تأثراً بمواد التعقيم المستخدمة، بالإضافة إلى قلة معدل الموت ونسبة التلوث به عن باقي الأصناف الأخرى. كما أنه كان أكثر الأصناف تفاعلاً وتأثرًا بتركيزات الأوكسينات الموجودة في الوسط الغذائي عن باقي الأصناف الأخرى. وتشير الأبحاث السابقة أن الإظلام التام مفيد جداً خلال تلك المرحلة المهمة والحساسة حيث إن الأجزاء النباتية في هذه المرحلة تكون ذات حساسية عالية من شدة الإضاءة ودرجات الحرارة العالية مما قد يوجه النبات لإفراز المواد الفينولية الضارة التي تؤدي إلى اسمرار المنفصل النباتي بدلاً من توجه إلى تكوين الكالس، وهذا ما أكده (Belal *et al*., 2004 and 2008). كما تشير النتائج أيضاً إلى أهمية استخدام القمة النامية عن الأجزاء الأخرى في تكوين الكالس بشكل واضح وملحوظ وهذا ما أشارت إليه الدراسات السابقة (Al-Kharyi and Al-Maari, 1997 ; Ibrahim, 1999; El-Bahr *et al*., 2003).

أما تأثير الأوكسينات على تكوين الكالس فقد كان واضحاً أيضاً خلال تلك المرحلة وزادت من قابلية الأجزاء النباتية المنزرعة ووجهتها إلى تكوين الكالس. على عكس التأثير الواضح من استخدام السيتوكينينات التي توجه الجزء النباتي إلى تشكل الأعضاء عليها مباشرة أي تشكل الأعضاء دون المرور بمرحلة الكالس، وهذه النتائج تتطابق بدرجة كبيرة مع نتائج الدراسات السابقة (Al-Khayri, 2003; Abul-Soaud *et al*., 2004; Alkhateeb, 2008).



1= ضعيف (0-25%) 2= مقبول (26-50%) 3= جيد (51-75%) 4=ممتاز (76-100%)

شكل (4): التأثير المعنوي الناتج من تكوين الكالس على مختلف الأجزاء النباتية للأصناف المنزرعة وذلك بعد مرور ستة أشهر من بداية الزراعة.



شكل (5): الكالس المتكون لنخيل التمر المنزرعة على الوسط الغذائي وظهور اللون البني به نتيجة إفرازه المواد الفينولة.

المراجع

Abo El–Nil, M. M. 1986. The effect of amino acid nitrogen on growth of date palm callus. Second Symp., on Date Palm, KFU, Al–Hassa, Saudi Arabia, pp.59-65.

Abul-Soaud, A. A., El-Sherbeny, N.R. and Baker, S.I. 2004. Embryogenesis in female inflorescence of date palm (*Phoenix dactylifera L*. cv. Zaghloul). The 2nd International Conference on Date Palm, Suez Canal University Faculty of Environmental Agricultural Sciences, El-Arish, Egypt, 6-8 October 2004. pp. 139-163.

Al-Khalifa, N. S. 2009. Tissue culture chemistry. Journal of Science and Technology, King Abdulaziz City for Science and Technology (KACST). (23): 20-24.

Al-Kharyi, J. M. and Al-Marri, K.W. 1997. Effect of seasonal variation on the regeneration capacity of date palm. In vitro, 33: 22-26.

Alkhateeb, A. A. 2008. A review The problems facing the use of tissue culture technique in date palm (*Phoenix dactylifera L*.). Scientific Journal of King Faisal University. 9(2): 85-104.

Alkhateeb, A. A., Aljaber, A.M.S., and Aljabr, A.M.H. 2006. Date palm in Kingdom of Saudi Arabia. The National Date Palm Research Center, Ministry of Agriculture, Kingdom of Saudi Arabia, pp 138.

Alkhateeb, A. A., and Ali-Dinar, H.M. 2002. Date Palm in Kingdom of Saudi Arabia: Cultivation, Production and Processing. Translation, Authorship and Publishing Center, King Faisal University, Kingdom of Saudi Arabia. pp. 188.

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: 453-456.

Al-Khayri, J.M. 2003. *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: effect of auxin concentration and strength of MS salts. Current Science. 84: 680-683.

Al-Khayri, J. M. and Al-Bahrany, A.M. 2004. Genotype-dependent *In vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera L*.) cultivars to silver nitrate. Sci. Horti., 99: 153-162.

Al-Maarri, K. and Al-Ghamdi, A.S. 1995. Effect of culturing date on *in vitro* micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera L*.) cv. Hillaly. Arab. Univ. J. Agric. Sci. 3:151-167.

Al-Maarie, K. W. 1995. Propagation of Date Palm (*Phoenix dactylifera L*.) by plant tissue culture technique. Altandeed Altaswerie Corp. (Dabs), Damuscus, Syria.

Belal, A. H. and El-Deeb, M.D. 1997. Direct organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) *in vitro*. Assiut J. of Agricultural Sciences 28(2): 67-77.

Belal, A. H., El-Deeb, M.D. and Shehata, W.F. 2004. Micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) via indirect embryogenesis. The Second International Conference on Date Palm El-Arish, Egypt. 6-8 October 2004. pp. 119-138.

Belal, A. H., El-Deeb, M.D. and Shehata, W.F. 2008. Indirect embryogenesis of five date palm cultivars *in vitro*. The Third international Conference on Date palm, El-Arish, Egypt. 25-27 April 2008. pp. 241-264.

Benjama, A., Cherkaoui, B., and Al-Maii, S. 2001. Origin and detection of Bacillus contaminating date palm vitro culture and importance of manipulations conditions. Al Awamia, 104: 73-74.

Daguin, F. and Letouzé R. 1988. Régéneration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) par embryogenèse somatique: emélioration de l'efficatie par passage au milieu liquide agite. Fruits, 43: 191-194.

Debergh, P. C., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R. and Ziv, M. 1992. Reconsideration of the term "Vitrifcation" as used in micropropagation. Plant cell. Tissue and Organ Culture. 30: 135-140.

Drira, N. and Al-Sha'ary, A. 1993. Analysis of date palm female floral initials potentials by tissue culture. Third Symposium on Date Palm, KFU, Al-Hassa, Saudi Arabia. pp. 161-170.

Eke, C., Akomeah. P., and Asemoto, O. 2005. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera L.*) from apical meristem tissue from "Zebia and Loko" landraces. Afri. J. Biotech. 4(3):244-246.

El-Bahr M.K., Taha H.S. and Bekheet, S.A. 2003. *In vitro* propagation of Egyptian date palm cv. Zaghloul: *in vitro* rooting and *ex vitro* acclimatization. Arab Univ. J. of Agric. Sci. 11: 689-699.

Eshraghi, P.; Zarghami, R. and Mirabdulbaghi, M. 2005. Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. Afri. J. Biotech. 4 (11):1309-1312.

George, Edwin F., Hall, Michael A., De Klerk, and Geert, Jan. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Vol 1. The background (3rd ed.). Springer, Dordrecht.

Gurevich V, Lavi, U, and Cohen, Y. 2005. Genetic variation in date palms propagated from offshoots and tissue culture. Journal of the American Society for Horticultural Science. 130:46-53.

Ibrahim, I. A. 1999. Somaclonal variation during micropropagation of date palm via embryogenesis. The First International Conference, in Egypt, on Plant Tissue Culture and its Application. Zagazig Univ., 189-199.

Ibrahim, I. A., Abo-El-Soaud, A.A., El-Sherbeny, N.R., and Baker, E.I. 1999. Effect of nutrient media on the growth and development of date palm grown *in vitro* and *ex vitro*. In The First International Conference, Egypt, "on Plant Tiss. Cult. App." Zagazig Univ. pp.209-217.

Letouze, R., Daguin, F., Satour; P., Hamama L., and Marionate, F. 1998. Somatic embryogenesis and mass micropropagation of date palm characterization and genetic stability of regenerated plantlets by RAPD markers. In: 1st. Inter. Conf. Date Palms. Al-Ain, U.A.E., March, 1998:158-167.

Mater, A. A. 1986. *In vitro* propagation of *Phoenix dactylifera L.* Date Palm. J. 4: 137-152.

Meghwal, P. R., Sharma, H.C., Goswami, A.M., and Srivastava, K.N. 2001. Effect of stock plant etiolation on *in vitro* phenol exudation during culture establishment of guava (*Psidium guajava L.*). Indian J. Hort. 58:328–331.

Murashige, T. and Skoog, F.A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15: 473-479.

Oda, M. L., Faria, R.T. de, Fonseca, I.C.B., and Silva, G.L. 2003. Fungicide and germicide on contamination escaping in the *in vitro* propagation of Oncidium varicosum Lindl. Semina: Ciencias Agrárias (Londrina). 24:273-276.

Othmani, A., C. Bayoudh, N. Drira and Trifi, M. 2009. *In vitro* cloning of date palm *Phoenix dactylifera L.* cv. Deglet Bey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). Biotechnol. and Biotechnol. EQ. 23: 1181-1185.

Pottino, B. G. 1981. Methods in plant tissue culture. Dept. of Hort., Agric. College, Maryland Univ., College Park, Maryland, USA, pp.8-29.

Sharma, D. R., Chowdury, J.B., Neelman, R.Y. and Chowdury, V.K. 1990. *In vitro* multiplication of female date palm (*Phoenix dactylifera L.*). Bulletin de la Societe Botanique de France. 137: 15-23.

Sharma, D. R., Dawrara, S. and Chowdury, J.B. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm (*Phoenix dactylifera L.*) cv. Khadrawy through tissue culture. Ind. J. Exp. Bio. 22: 596-598.

Sudhersan, C., Abo El-Nil, M. M. and Al-Baize, A. 1993. Occurrencence of direct somatic embryogenesis on the sword leaf *in vitro* plantlets of (*Phoenix dactylifera L.*) cv. Barhee. Curr. Sci. 65:887-888.

Tisserat, B. H. 1979. Tissue culture of the date palm. J. Hered. 70: 221-222.

Tisserat, B.H., Foster, G. and Mason, D. De. 1979. Plantlets production *in vitro* from *Phoenix dactylifera L.* Reprinted from Date Growers Instit. Rep. 54: 19-23.

Zacchini M, and Agazio, M. de. 2004. Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. Biologia Plantarum. 48:589-592.

Zaid, A. 1984. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures. Date Palm J. 3: 269-275.

Zaid, A. 1986. Review of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) tissue culture. The Second Symp, on Date Palm, K.F.U., Al- Hassa, Saudi Arabia: 67-75.

The Effect of Explants Types' Difference of some Hassawi Date Palm Cultivars on *in Vitro* Propagation Physiological Problems and Obstacles Occurrence

Wael F. Shehata

Department of Agricultural Biotechnology, College of Agricultural and Food Sciences, King Faisal University
Al-Hassa, Saudi Arabia.

ABSTRACT

The study was carried out on shoot tips, auxiliary buds, and leaves primordial of different date palm cultivars (Barhi, Khalasi, and Ruziz). All cultivars were cultured on a high Auxins concentrations medium (2,4-D, NAA and IAA) in total darkness under temperature of 25±2°c.

The most important results obtained from this study during sterilization process were that the highest contamination rate occurred with the side buds of Khalasi cv. The lowest survival rate occurred with side buds and primordial leaves of Barhi cultivar, while the highest mortality rate occurred with the side buds of Barhi cv. and the lowest was with the shoot tips of Khalasi cv.

The study detected some Physiological obstacles that are harmful to the explanted tissues represented by browning and vitrification phenomenons. Browning was detected in all explanted cultivars but with varying degrees, the most affected cultivar was Barhi while the most affected explants were the primordial leaves.

The study clearly declared that browning degree varies according to the cultivar and the type of the used explant, contrarily the study did not clarify the effect of the earlier factors on Vitrification as it was detected only with the auxiliary buds of Ruziz. Best result for callus formation were with the shoot tips of all cultivars especially for Khalasi.

Key Words: Browning, Callus, Date palm (*Phoenix dactylifera L.*), Mortality, Survival, Vitirification.