تأثير الباكلوبيوترازول والكازين والمدة الزمنية في نمو الكالس الجنيني وتطوره خارج الجسم الحي لنخلة التمر *Phoenix dactylifera* L. صنف نيرسي

هدى عبد الكريم الطه ماجد عبد الحميد إبراهيم زياد طارق صافي العلي
قسم البستنة وهندسة الحدائق مركز أبحاث النخيل/جامعة البصرة
كلية الزراعة/جامعة البصرة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية/كلية الزراعة/جامعة البصرة للمدة من ٢٠١٢/٩/٢٠ ولغاية ٢٠١٣/١/٢٠ ، استعمل فيها الكالس الأولي المستحدث من زراعة البراعم الطرفية لنخيل التمر صنف نيرسي بهدف تأثير مادتي الباكلوبيوترازول والكازين والمدة الزمنية في تطور الكالس الجنيني وتحوره إلى أجنة جسمية. زرع الكالس الأولي بواقع ١٠٠ ملغم في الوسط الغذائي المزود بالاوكسين NAA بتركيز ١٠ ملغم.لتر$^{-1}$ والسايتوكاينين2ip بتركيز ٢ ملغم.لتر$^{-1}$ والفحم المنشط ٢ غم.لتر$^{-1}$ بتراكيز ثابتة في وسطين الأول أضيف إليه الباكلوبيوترازول بتراكيز (٠، ٠.٣، ٠.٥، ٠.٧، ٠.٩، ١.٠) ملغم.لتر$^{-1}$ والوسط الثاني أضيف إليه الكازين بتراكيز (٠، ٢٠٠، ٤٠٠، ٦٠٠، ٨٠٠، ١٠٠٠) ملغم.لتر$^{-1}$.

استمرت عملية إعادة الزراعة للكالس الجنيني في نفس الأوساط الغذائية السابقة للذكر شهرياً ولمدة ٤ أشهر. تشير النتائج إلى أن إضافة الباكلوبيوترازول بتركيز ١.٠ ملغم.لتر$^{-1}$ إلى الوسط الغذائي له تأثيراً ايجابياً في زيادة الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني إذ سجل (١.٥٦٧١ و ٠.١١٩٨) غم على التوالي مقارنة مع باقي تراكيز الباكلوبيوترازول وتراكيز الكازين فضلاً عن معاملة المقارنة، بعد ذلك تليها معاملة الكازين بتركيز ١٠٠٠ ملغم.لتر$^{-1}$ فقد سببت أيضاً زيادة معنوية في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني إذ بلغ (١.٢٨٠٣ و ٠.٠٩٥٩) غم في حين سجلت معاملة المقارنة اقل وزن طري وجاف إذ بلغ (٠.٢٥٧٨ و ٠.٠١٩٨) غم. تشير النتائج أيضاً إلى زيادة الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني وبصورة طردية ومعنوية مع زيادة فترة الحضانة وكانت أعلى نسبة للزيادة بعد مرور ٤ أشهر.

تشير النتائج أيضاً إلى تطور الكالس الجنيني وتحوره إلى أجنة جسمية مختلفة الإحجام في جميع الأوساط الغذائية المزودة بتراكيز الباكلوبيوترازول والكازين، وأكثر وضوحاً في الوسط الغذائي المزود بالباكلوبيوترازول .

Key word: PP333, Casein hydrolysate, embryogeneic callus, *Phoenix dactylifera* L.

المقدمة

نخلة التمر *Phoenix dactylifera* L. ثنائية المسكن، أحادية الفلقة تنتمي إلى العائلة النخيلية Arecaceae ، وتعتبر من الأشجار المهمة في شرق أسيا وأفريقيا فضلاً عن اعتبارها من نباتات الزينة (Morton, 1987).

تلعب تقنيات زراعة الأنسجة النباتية دوراً هاماً في إكثار النخيل للحصول على إعداد كثيرة بفترة زمنية قصيرة ، واستعملت عدة منظمات نمو في زراعة الأنسجة النباتية للنخيل ومن ضمنها الاوكسينات والسايتوكاينينات وأيضاً تستعمل بعض معوقات النمو ومنها منظم النمو الباكلوبيوتروزال والذي يعتبر من احد معوقات النمو الصناعية التي تعمل بها النباتات البستانية والذي اكتشفت عام ١٩٧١ (Purohit, 1986) .

ويعد الباكلوبيوترازول Paclobutrazol من المركبات الكيميائية متعددة الحلقات وإحدى هذه الحلقات تكون فعالة بسبب احتوائها على النتروجين N-heterocyclic's التي تؤثر في معظم الأنواع النباتية عندما تعامل به (Barrett, 2001)، ويرمز للباكلوبيوترازول بـ (Pbz) أو (PP333) إذ يحتوي على مجموعة الترازول Triazole (White, 2003).

وهناك عدة دراسات تشير إلى استعمال منظم النمو الباكلوبيوترازول Paclobutrazol في زراعة الأنسجة النباتية فقد أشار الباحثان(٢٠٠٤) Haifeng and Qingzhong إلى إضافةPaclobutrazol في الوسط الغذائي بتركيزين هما (٠.٠١ و ٠.١) ملغم.لتر$^{-1}$ لأربعة أصناف من نبات 'tall fescues (*Festnca arundiancea*) سبب ذلك زيادة في معدل سرعة نمو الكالس لصنفين هما (Gooden and Triple A) في حين قلل من نشوء الكالس للصنفين الآخرين (Houndogs and Dixie Green) وسببت هذه التراكيز أيضاً عملية تمايز الكالس إلى نبيتات في الأصناف الأربعة وازداد معدل سرعة نمو الكالس وتكوين النبيتات مع زيادة تركيز PP333 في الوسط الغذائي.

كذلك أشار الباحثان Kepenek and Karoglu (2011) إلى إنتاج الكالس من Apical domes لثلاثة أصناف من التفاح هي (Starking Delicious, Mg, Amasya) عند زراعتها في وسط غذائي يحتوي على تراكيز من PP333 (٠.٠، ٠.٥، ١.٠، ٢.٥، ٥.٠) ملغم.لتر$^{-1}$ لمدة ٦ أسابيع ازداد استحثاث الكالس وتطور إلى أفرع خضرية دقيقة مع زيادة تركيز PP333 في الوسط الغذائي.

أما الأحماض الامينية فهي تعد من أهم مصادر النتروجين العضوي وذلك لدورها في التحكم بنمو وتكشف الخلايا وتكوين الأجنة الجسمية في مزارع الأنسجة النباتية (سلمان، ١٩٨٨). تضاف الأحماض الامينية بكميات قليلة إلى الوسط الغذائي أما بشكل بروتين متحلل مثل الكازين هيدروليسيت أو بشكل حامض أميني منفرد (Collin and Edward,1998). وتوجد أنواع من الكازين المتوفر تجارياً تكون ذات قيمة في استعمالها في زراعة الأنسجة النباتية وهي تختلف في

تأثيراتها، والكازين يكون فعالاً أكثر من إضافة الأحماض الامينية بصورة انفرادية إلى الوسط الغذائي من قبل كثير من الباحثين في نمو الكالس الأولي والكالس الجنيني وتطوره إلى أجنة. فقد أشار Abedel-Rahim *et al.*(1998) إلى إضافة الكازين بتراكيز (٠، ٠.٥، ١.٠، ١.٥، ٢) ملغم.لتر$^{-١}$ إلى الوسط الغذائي سبب زيادة معنوية في الوزن الطري لنسيج الكالس المستحث من زراعة مبادئ الأوراق للبراعم الطرفية لنخيل التمر، كذلك سبب زيادة معنوية في معدل سرعة النمو (ملغم/يوم). بعد مرور ٤ أسابيع فقد أعطى التركيز ٢ ملغم.لتر$^{-١}$ أعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ ٠.١٤١ ∓ ٢.٧٤١ غم كذلك أعطى أعلى معدل للنمو بلغ ٩.٠٠ ∓ ٩١.٣٦٧ ملغم/يوم مقارنة بمعدل الوزن الطري للكالس في معاملة المقارنة إذ بلغ ٠.١٠٤ ∓ ١.٥٢٣ غم ومعدل سرعة النمو للكالس بلغ ٤.٩٨ ∓ ٥٠.٧٦٧ ملغم/يوم.

وبين الباحثان Ageel and Elmeer (2011) أن إضافة الكازين بتراكيز (٠، ١، ٢، ٣) غم.لتر$^{-١}$ سبب زيادة معنوية في الوزن الطري لكالس نخيل التمر صنف خلاص مع زيادة تركيز الكازين في الوسط الغذائي، فقد أعطى التركيز ٣ ملغم.لتر$^{-١}$ أعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ ٨٠غم وكذلك أعطى أعلى عدد للأجنة الخضرية بعد مرور ٨ أشهر من زراعته في الوسط الغذائي المزود بالكازين وخالي من منظمات النمو مقارنة بالتراكيز الأخرى، في حين أعطت معاملة المقارنة اقل وزن طري لكالس بلغ ٢٠ غم واقل عدد للأجنة.

وأشار الباحثان Khierallah and Hussein (2013) إلى إضافة الكازين إلى الوسط الغذائي بتركيز (٠، ٠.٥، ١.٠، ٢)غم.لتر$^{-١}$ أدى ذلك إلى زيادة معنوية في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني وفي عدد الأجنة الكروية لنخيل التمر وخاصة عند التركيز العالي ٢ غم.لتر$^{-١}$ من الكازين إذ بلغ (١.٧٠ و ٠.٤٣) غم على التوالي و٤٧ جنين كروي، في حين أعطت معاملة المقارنة اقل وزن طري وجاف بلغ (٠.٤٦ و٠.٠٩)غم على التوالي و٢٠ جنين كروي.

تهدف هذه الدراسة إلى اختبار تأثير تراكيز مختلفة من الباكلوبيوترازول والكازين في نمو الكالس الجنيني وتطوره إلى أجنة جسمية خلال مدد مختلفة ، كذلك معرفة أفضل تركيز من هذه المادتين وأفضل مدة في نمو الكالس الجنيني لنخيل التمر صنف نيرسي.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية/كلية الزراعة/جامعة البصرة للمدة من ٢٠١٢/٩/٢٠ ولغاية ٢٠١٣/١/٢٠، واستعمل فيها الكالس الأولي المستحدث من زراعة البراعم الطرفية لنخيل التمر صنف نيرسي وبعمر ٤ أشهر بهدف تطوره إلى كالس جنيني وتكوين الأجنة الجسمية، إذ زرع ١٠٠ملغم من الكالس في الوسط الغذائي المكون من أملاح Murashige MS) (and Skoog, 1962، وذلك بإضافة ٤.٣٣ غم.لتر$^{-1}$ مع إضافة المواد التالية: سكروز ٣٠ غم.لتر$^{-1}$ وفوسفات الصوديوم الحامضية ٢٠٠ ملغم.لتر$^{-1}$ ، Mesoinositol ١٠٠ ملغم.لتر$^{-1}$، كبريتات الادنين ٤٠ ملغم.لتر$^{-1}$ ومجموعة من الفيتامينات بتركيز ١ ملغم.لتر$^{-1}$، Glutamin ٢٠٠ ملغم.لتر$^{-1}$، فحم منشط ٢ غم.لتر$^{-1}$ ومنظمات النمو NAA ١٠ ملغم.لتر$^{-1}$، 2ip ٢ ملغم.لتر$^{-1}$. بعدها تم إضافة المواد وهي الباكلوبيوترازوال والكازين بتراكيز مختلفة فضلاً عن وجود معاملة المقارنة، ثم ضبط pH ضمن مدى ٥.٧±٠.١ وأضيف الـ Agar بتركيز ٥ غم.لتر$^{-1}$ من شركة (LAB Associates BV)، ومن ثم سخن الوسط الغذائي على درجة حرارة ٩٠-٩٢مْ ووزع الوسط بواقع ٢٠ مل لكل أنبوبة اختبار قياس ٢.٤ × ٢٠سم وسدت الفوهات بالقطن الطبي وغلقت بأوراق ألمنيوم ثم عقمت بواسطة جهاز التعقيم البخاري (Autoclave) تحت ضغط ١.٠٤ كغم/سم^{٢} ودرجة حرارة ١٢١مْ ولمدة ٢٠ دقيقة، حفظت الأنابيب في غرفة التحضين لحين الزراعة.

نفذت التجربة لغرض نمو وتطور الكالس الجنيني وتكوين الأجنة الجسمية وتم دراسة العاملين التاليين خلال مدد مختلفة وهي :

تأثير دراسة تراكيز مختلفة من الباكلوبيوترازول والكازين في الوسط الغذائي

تم دراسة تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الباكلوبيوترازول وهي(٠.٣، ٠.٥، ٠.٧، ٠.٩، ١.٠) ملغم.لتر$^{-1}$ وكذلك الكازين (٢٠٠، ٤٠٠، ٦٠٠، ٨٠٠، ١٠٠٠) ملغم.لتر$^{-1}$ كلٍ على حده فضلاً عن وجود معاملة المقارنة، إذ زرع ١٠٠ملغم/كالس أولي في كل أنبوبة اختبار وحضنت الزروعات على درجة حرارة ٢٧ مْ ± ٢، وشدة إضاءة ١٠٠٠ شمعة/قدم، تم استعمال ١٠ مكررات لكل تركيز وتم اخذ القياسات التالية:

١- حساب الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني(غم) بعد مرور مدد مختلفة (١، ٢، ٣، ٤) أشهر إذ أجريت إعادة زراعة الكالس مرة كل شهر تم خلالها تسجيل الوزن واعتمدت كمؤشر للنمو وحُسب الوزن الطري استناداً إلى سعد (٢٠٠١)، أما الوزن الجاف تم حسابه عن طريق تجفيف الكالس الجنيني في فرن كهربائي بدرجة حرارة ٧٠مْ ولمدة ٢٤ ساعة تم خلالها وزن الكالس الجنيني المجفف.

٢- اخذ ملاحظات حول ظهور الأجنة الجسمية في نهاية التجربة (الشهر الرابع من الحضانة).

التحليل الإحصائي

نفذت التجربة باستخدام التصميم العشوائي الكامل (CRD) Completely Randomized Design وحللت نتائج الدراسة إحصائياً باستعمال تحليل التباين وقورن بين المتوسطات والمعاملات باختبار اقل فرق معنوي المعدل (R.L.S.D) عند مستوى احتمال ٠.٠٥ (الراوي وخلف، ١٩٨٠).

النتائج والمناقشة

توضح النتائج في الشكلين (١و٢) إذ أثرت إضافة الباكلوبيوترازول بتركيز ١.٠ ملغم.لتر$^{-1}$ إلى الوسط الغذائي تأثيراً ايجابياً (لوحة ١) إذ أعطت أعلى وزن طري وجاف للكالس الجنيني وتفوقت معنوياً على جميع معاملات الباكلوبيوترازول وكذلك على معاملات الكازين فضلاً عن معاملة المقارنة إذ سجلت (١.٥٦٧١ و ٠.١١٩٨) غم على التوالي، ثم تليها معاملة الكازين بتركيز ١٠٠٠ملغم.لتر$^{-1}$ فقد سببت زيادة الوزن الطري للكالس الجنيني (لوحة ٢) وأثرت معنوياً على باقي معاملات الكازين(٨٠٠,٦٠٠,٤٠٠,٢٠٠) ملغم.لتر$^{-1}$ والمعاملات الباقية من الباكلوبيوترازول (٠.٩,٠.٧,٠.٥,٠.٣) ملغم.لتر$^{-1}$ في الوزن الطري والجاف إذ سجلت (١.٢٨٠٣ و ٠.٠٩٥٩) غم على التوالي، في حين سجلت معاملة المقارنة اقل وزن طري وجاف للكالس الجنيني إذ بلغ (٠.٢٥٧٨ و ٠.٠١٩٨) غم على التوالي، وقد يعود سبب تفوق معاملة الباكلوبيوترازول بتركيز ١.٠ ملغم.لتر$^{-1}$ حيث أن الباكلوبيوترازول يعتبر من محفزات الشد المائي (Yelenosky *et al.*,1987).

إذ أشارت بعض الدراسات إلى أن عملية الشد تعمل على تحفيز الخلايا وتوجيهيها إلى زيادة معدل تراكم أو تجمع الكاربوهيدرات في خلاياها وبالتالي زيادة في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني وهذا ما هو إلا انعكاساً لهذه العملية (Zuoine and El-Hadrami,2004). وكذلك فان الباكلوبيوترازول يسبب استحداث الخلايا الجنينية من الكالس الجنيني وبالتالي تكوين اكبر عدد من الخلايا الجنينية embryogeneic cells وكذلك زيادة في حجمها مما تسبب زيادة في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني (Lai and Liu,1986)، فضلاً عن ذلك فان الباكلوبيوترازول يسبب تثبيط إنتاج الاثلين ويزيد من إنتاج السايتوكاينينات وهذه بدورها تؤثر على عملية تطور الكالس (Grossmann *et al.*,1989) . تتفق هذه النتائج مما أشار إليه الباحثين(٢٠٠٤) Haifeng and Qingzhong و Kepenek and Karoglu (2011) واستنتجوا بان معدل نمو وتطور الكالس ازداد مع زيادة تركيز الباكلوبيوترازول في الوسط الغذائي لنبات التفاح على التوالي. وكذلك يعود سبب تفوق معاملة الكازين بتركيز ١٠٠٠ملغم. لتر$^{-1}$ إلى الدور المهم لمادة الكازين والذي يعتبر مصدراً مهماً للكالسيوم والفوسفات ومعظم العناصر الصغرى والفيتامينات والأكثر أهمية من ذلك احتوائه على ١٨ حامض أميني، كذلك يحتوي نسبياً على كمية الكلوتامين فضلاً على احتوائه على بعض العوامل المنظمة للنمو غير المعروفة (George *et al.*,2008). كذلك

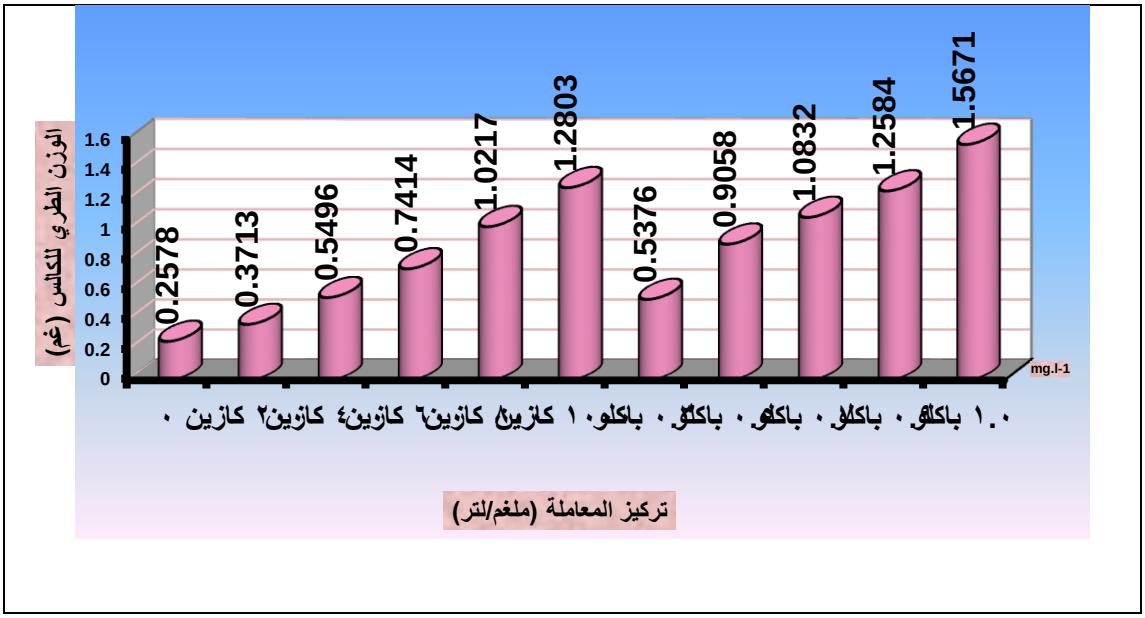
يؤثر الكازين على النمو والتشكل المظهري فهو يحتوي على النتروجين العضوي الذي يدخل بسهولة إلى خلايا الأنسجة النباتية مقارنة مع النتروجين غير العضوي (Thom *et al.*,1980). أن إضافة المواد العضوية مثل الكازين إلى الأوساط الغذائية قد استعملت في زيادة الكالس الأولي والكالس الجنيني وتطوره إلى الأجنة الخضرية لكثير من أصناف نخيل التمر من قبل الباحثين ومنهم Hegazy *et al*,(2009) و AL-Khayri (2010) و Ageel and Elmeer (2011) و Khierallah and Hussein (2013) إذ أكدوا بان نمو الكالس الأولي والجنيني يزداد مع زيادة تركيز الكازين في الوسط الغذائي.

كذلك توضح النتائج في الشكلين (٣ و ٤) تأثير المدة الزمنية وهي ١ و ٢ و ٣ و ٤ شهر في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني إذ ازداد الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني بصورة معنوية وطرديه مع زيادة فترة الحضانة (زيادة المدة الزمنية) وكانت أعلى نسبة للزيادة بعد مرور مدة ٤ أشهر إذ بلغ الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني (١.٥٨١٥٥ و٠.١٢٠١٥) غم على التوالي، مقارنة بأقل وزن طري وجاف للكالس الجنيني بعد مرور شهر واحد من الحضانة إذ بلغ (٠.١٧٣٣٦ و ٠.٠١٤٥٨) غم على التوالي. وقد يعود سبب تفوق مدة الحضانة ٤ أشهر في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني إلى أن عملية إعادة الكالس الجنيني شهرياً ولمدة ٤ أشهر على وسط غذائي جديد ساعد على وجود عناصر غذائية إضافية جديدة أدت إلى توفير الطاقة اللازمة لانقسام الخلايا وزيادة عددها نتيجة لامتصاصها من قبل نسيج الكالس الجنيني وبالتالي تحصل زيادة في النمو فضلاً عن ذلك فان عملية نقل الكالس الجنيني شهرياً إلى وسط غذائي جديد ساعد ذلك في التخلص من المواد الفينولية السامة التي يفرزها الكالس الجنيني والتي تسبب موت الأنسجة وفقدان في الوزن، أيضاً حدث تطور لنسيج الكالس الجنيني إلى أجنة جسمية بعد مرور ٤ أشهر الأمر الذي أدى إلى الزيادة في الحجم والوزن وبالتالي زيادة في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني. تتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه الباحثون Abdel-Rahim *et al*. (1998) إلى أن معدل سرعة النمو (ملغم/يوم) لنسيج الكالس لنخلة التمر ازداد مع زيادة الحضانة لمدة ٤ أسابيع.

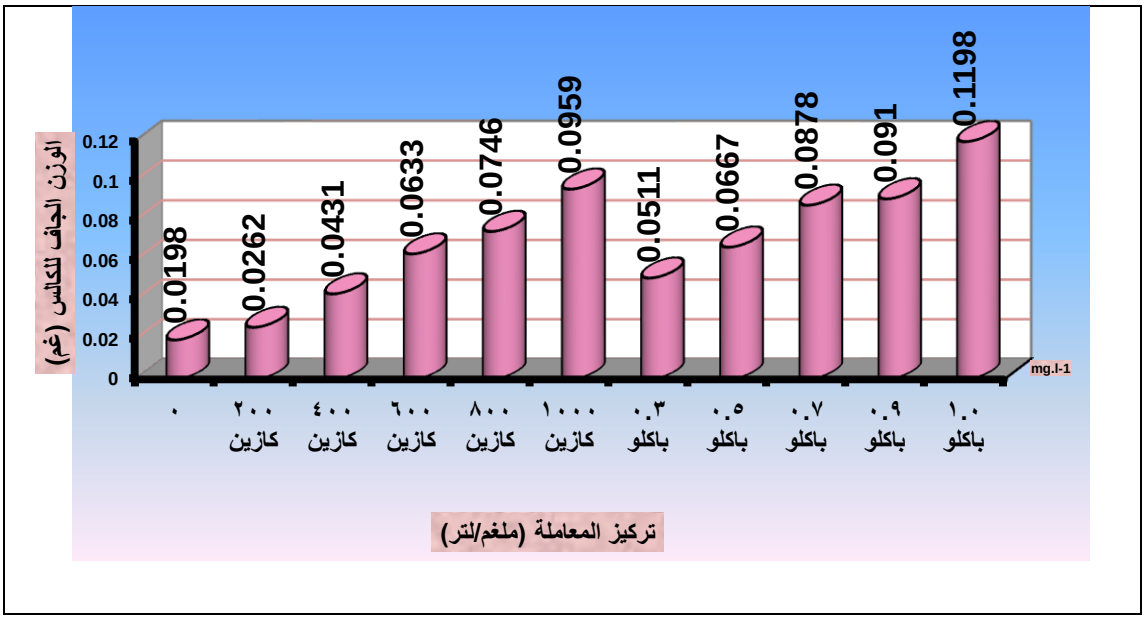
توضح النتائج أيضاً في الجدول (١ و٢) تأثير التداخل بين المعاملات وبين المدة الزمنية في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني ولوحظ أن هناك زيادة تدريجية ابتداءً من الشهر الأول وصولا إلى الشهر الرابع من فترة الحضانة في معاملتي الباكلوبيوترازول والكازين عند التراكيز (١.٠ و١٠٠٠) ملغم. لتر$^{-1}$ على التوالي، إذ تفوقت معنوياً معاملة الكازين بتركيز ١٠٠٠ ملغم. لتر$^{-1}$ في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني عند الشهر الأول على جميع المعاملات ومن ضمنها معاملة الباكلوبيوترازول بتركيز ١.٠ ملغم. لتر$^{-1}$ إذ بلغ (٠.٣٤٤ و٠.٠٢٥) غم بعد ذلك بدأت الزيادة في الوزن ابتداءً من الشهر الثاني وصولاً إلى نهاية الشهر الرابع، فقد تفوقت معنوياً

معاملة الباكلوبيوترازول عند التركيز ١.٠ ملغم. لتر$^{-١}$ على جميع المعاملات فقد أعطت أعلى وزن طري وجاف للكالس الجنيني إذ بلغ (١.١٥٦ و٢.٣٧٤ و٢.٥٥٧)غم وزن طري و (٠.١٢٥ و٠.١٣٧ و٠.١٩٧)غم وزن جاف في حين أعطت معاملة المقارنة اقل وزن طري وجاف للكالس الجنيني إذ بلغ (٠.١٦٤ و ٠.٣٣٦ و٠.٤٣٧) غم وزن طري (٠.٠١٧ و٠.٠١٩ و٠.٠٣٤) غم وزن جاف خلال الشهر الثاني والثالث والرابع على التوالي .

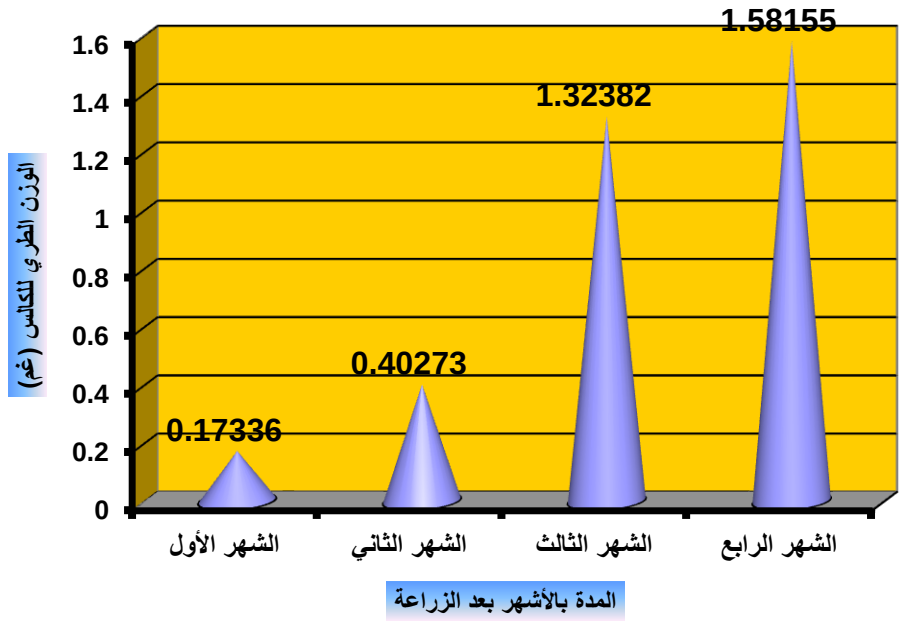
وتوضح النتائج في اللوحة (٣) تأثير تركيزين من الباكلوبيوترازول (العالي والواطئ) وتركيزين من الكازين (العالي والواطئ) أيضا" في تطور الكالس الجنيني إلى أجنة خضرية كروية أو متطاولة مختلفة الأحجام ومتناثرة بيضاء اللون مع وجود بعض التلون البني فيها، إذ يلاحظ تطور الأجنة الخضرية وزيادة في حجمها وعددها في المعاملة المزودة بالباكلوبيوترازول بتركيز عالي (١.٠ ملغم.لتر$^{-١}$) مقارنة مع التركيز الواطئ (٠.٣ ملغم. لتر$^{-١}$) إذ تميزت الأجنة الخضرية بصغر حجمها كذلك تطورت الأجنة الخضرية في المعاملة المزودة بالكازين بالتركيزين (١٠٠٠ و٢٠٠) ملغم. لتر$^{-١}$، إذ يلاحظ من اللوحة (٣) بان التركيز ١٠٠٠ملغم. لتر$^{-١}$ من الكازين كانت الأجنة الخضرية اكبر حجماً وأكثر عدداً من التركيز الواطئ من الكازين (٢٠٠ ملغم. لتر$^{-١}$) فقد كانت الأجنة الخضرية صغيرة الحجم وقليلة العدد. نستنتج من ذلك بان وجود الباكلوبيوترازول في الوسط الغذائي سبب تحفيز وتطور الكالس الجنيني إلى أجنة خضرية أكثر من وجود الكازين في الوسط الغذائي وقد يعود السبب في ذلك إلى أن وجود الباكلوبيوترازول في الوسط الغذائي يسبب غياب أو تقليل إنتاج الجبرلين الداخلي مما أعطى القدرة على إعادة تمايز الخلايا لتكوين خلايا جنينية وهي تشبه طفرة (*PKI*) بالجذر، وهذا ما أكده الباحثون Subotic *et al*.(2009) في دراستهم حول تحفيز الأجنة الخضرية لنبات *Centaurium erythraea* إذ أن الجنين (*PKI*) PICKLيعمل على تشفير الكروماتين Chromatins والذي يعتبر عامل لتحوير الكالس الجنيني إلى أجنة خضرية حسب ما أشار إليه الباحثون Ogas *et al*.(1997) .



شكل (١) : تأثير تراكيز الباكلوبيوترازول والكازين في الوزن الطري للكالس الجنيني(غم) لنخيل التمر صنف نيرسي (R.L.S.D 0.05=0.0189)

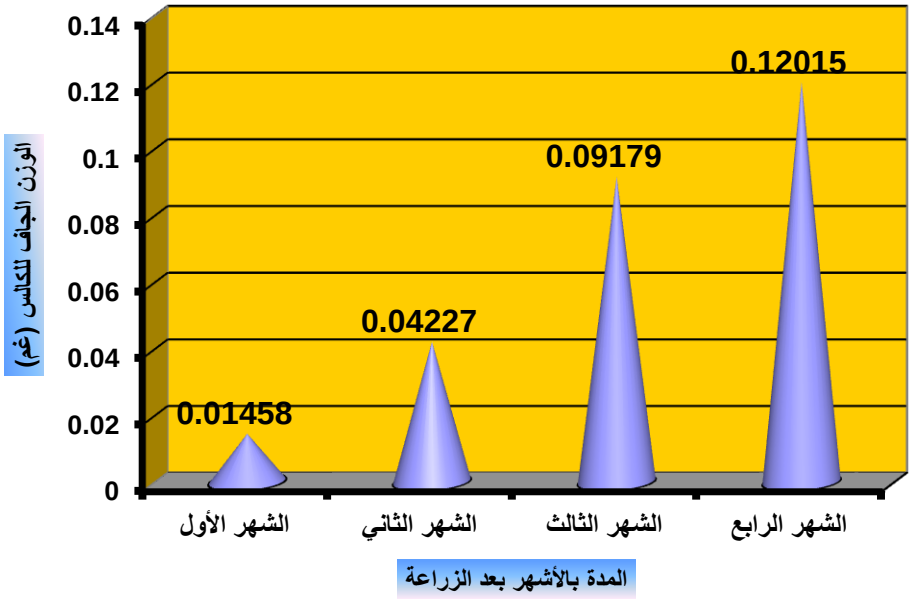


شكل (٢) : تأثير تراكيز الباكلوبيوترازول والكازين في الوزن الجاف للكالس الجنيني(غم) لنخيل التمر صنف نيرسي (R.L.S.D 0.05 = 0.0030)



شكل (٣) : الوزن الطري للكالس الجنيني(غم) لنخيل التمر صنف نيرسي خلال أربعة أشهر من الزراعة

(R.L.S.D 0.05 = 0.0114)



شكل (٤): الوزن الجاف للكالس الجنيني(غم) لنخيل التمر صنف نيرسي خلال أربعة أشهر من الزراعة

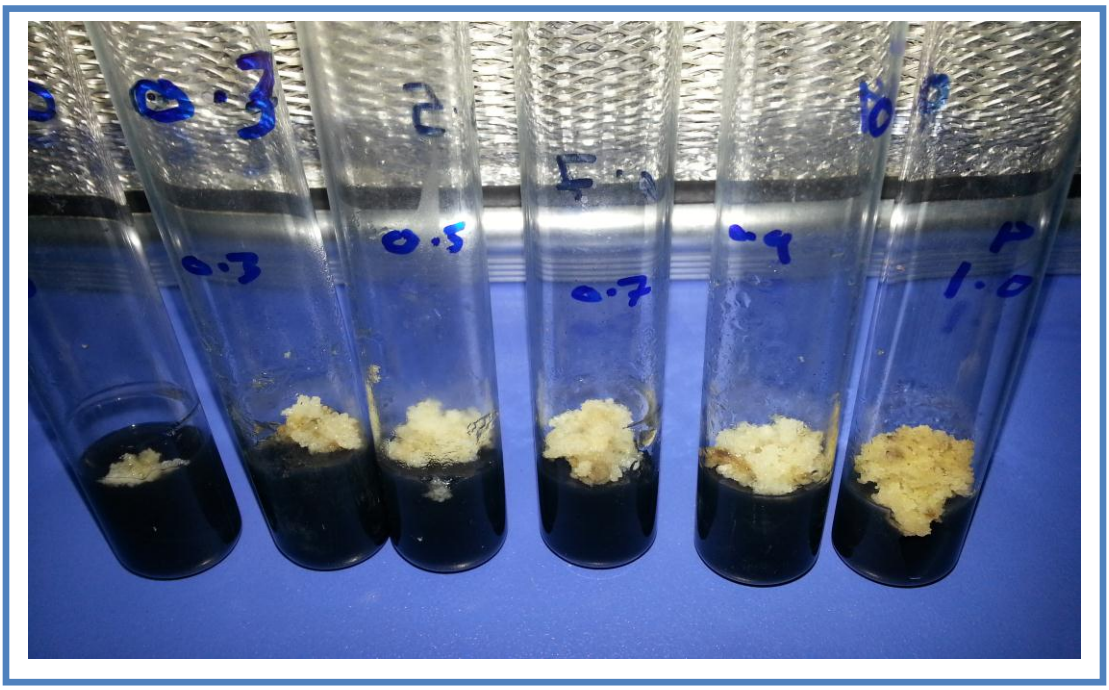
(R.L.S.D 0.05 = 0.0018)

جدول (١): تأثير الباكلوبيوترازول والكازين والمدة الزمنية والتداخل بينهما في الوزن الطري للكالس الجنيني لنخيل التمر صنف نيرسي

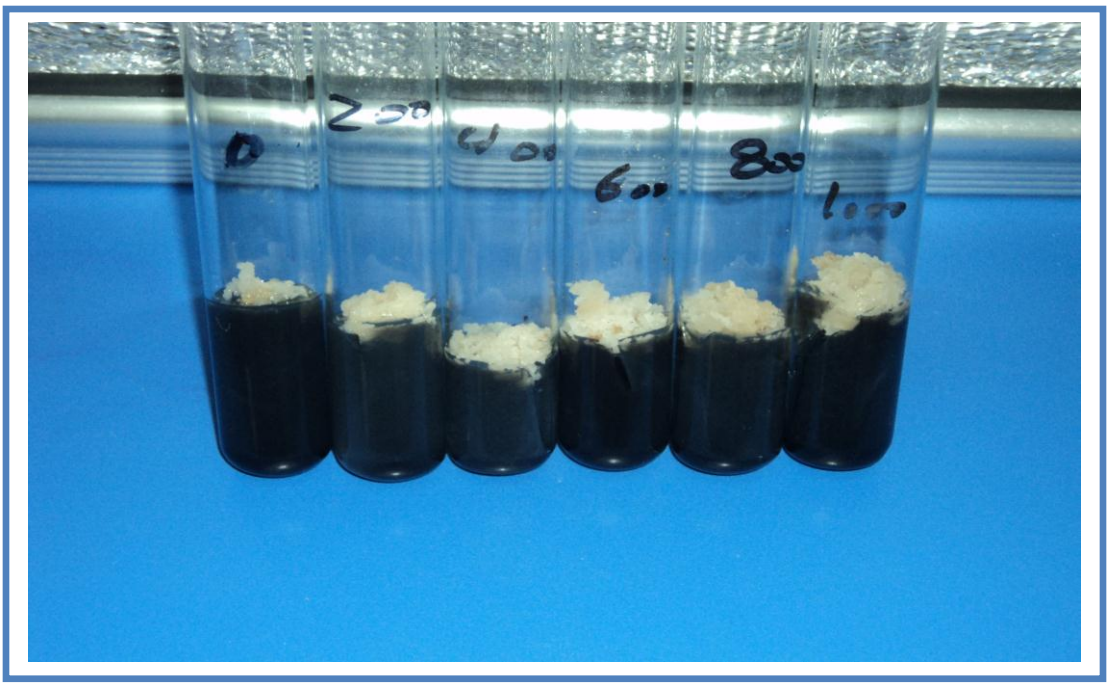
تركيز المعاملة (ملغم/لتر)	الوزن الطري للكالس (غم)			
	الشهر الأول	الشهر الثاني	الشهر الثالث	الشهر الرابع
Control	٠.٠٩٤	٠.١٦٤	٠.٣٣٦	٠.٤٣٧
PP333 0.3	٠.١٣٧	٠.١٤٩	٠.٧٨٦	١.٠٧٨
PP333 0.5	0.153	٠.297	1.430	١.٧٤٣
PP333 0.7	٠.١٥٧	٠.٣٥٠	١.٧٢٠	٢.١٠٦
PP333 0.9	٠.١٧٠	٠.٧٢٠	١.٩٩٥	٢.١٤٨
PP333 1.0	٠.١٨٢	1.156	2.374	2.557
CH 200	0.101	0.204	0.424	0.757
CH 400	0.141	0.293	0.873	0.891
CH 600	0.212	0.311	1.048	1.394
CH 800	0.215	0.335	1.713	1.824
CH 1000	0.344	0.451	1.863	2.463
R.L.S.D 0.05 = 0.0378				

جدول (2) تأثير الباكلوبيوترازول والكازين والمدة الزمنية والتداخل بينهما في الوزن الجاف للكالس الجنيني لنخيل التمر صنف نيرسي

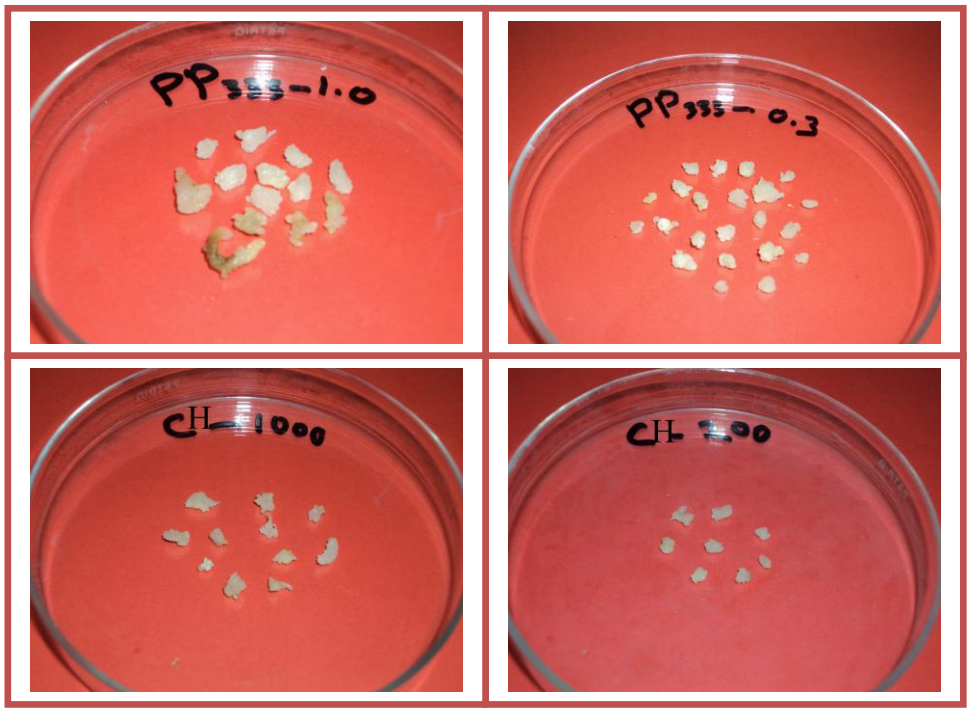
تركيز المعاملة (ملغم/لتر)	الوزن الجاف للكالس (غم)			
	الشهر الأول	الشهر الثاني	الشهر الثالث	الشهر الرابع
Control	0.009	0.017	0.019	0.034
PP333 0.3	0.011	0.014	0.067	0.112
PP333 0.5	0.013	0.029	0.095	0.130
PP333 0.7	0.014	0.075	0.125	0.138
PP333 0.9	0.016	0.079	0.120	0.149
PP333 1.0	0.020	0.125	0.137	0.197
CH 200	0.009	0.018	0.028	0.049
CH 400	0.011	0.020	0.067	0.074
CH 600	0.015	0.021	0.096	0.121
CH 800	0.017	0.025	0.122	0.134
CH 1000	0.025	0.041	0.134	0.183
R.L.S.D. 0.05 = 0.0061				



لوحة (١). تأثير الباكلوبيوترازول في نمو الكالس الجنيني بعد مرور أربعة أشهر من الزراعة



لوحة (٢). تأثير الكازين في نمو الكالس الجنيني بعد مرور أربعة أشهر من الزراعة



لوحة (٣) أجنة كروية بتركيز (٠.٣، ١.٠٠) ملغم.لتر$^{-1}$ باكلوبيوترازول
أجنة كروية بتركيز (٢٠٠ ، ١٠٠٠) ملغم.لتر$^{-1}$ كازين

المصادر

- **الراوي، خاشع محمود و خلف، عبد العزيز محمد (١٩٨٠)**. تصميم وتحليل التجارب الزراعية، مطبعة دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، العراق، ٤٨٨ صفحه.
- **سعد، أحمد عبد الله (٢٠٠١)**. تأثير نوع الوسط الغذائي والسايتوكاينين في نشوء الكالس وتكون الأجنة الخضرية في نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. صنف الأشقر. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة البصرة .
- **سلمان، محمد عباس (١٩٨٨)**. أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد.
- **Abdel-Rahim, E. A.; Abdel-Fatah, O. M.; El-Shemy, H. A. and Abd El-Sami, M. B. (1998).** Growth of date palm callus as affected by amino acids as organic nitrogen source. In: proc . First Int. Conf. Date palm, 23, Al-Ain United Arab Emirates, pp 4-240 .
- **Ageel, S. and Elmeer, K. (2011).** Effects of Casein Hydrolysates and Glutamine on callus and Somatic Embryogenesis of Date palm (*Phoenix dactylifera* L.). New York Science Journal, 4(7):121-125.
- **Al-Khayri, J.M. (2010).**Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Improved by Coconut water. Biotechnology, 9(4): 477-484 .

- **Al-Khayri, J. M. (2011).** Influence of yeast extract and casein hydrolysate on callus multiplication and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Scientia Horticul, 130: 531- 535.
- **Barrett, J. (2001).** Mechanisms of action P.32-241. In: M. Gaston (ed.). Tips on Regulation Growth of Floriculture crops. OFA. Services Inc. Columbus, O.H., [C.F. White, S.A. (2003) M. Sc. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University].
- **Collin, A. and Edwards, S. (1998).** Plant cell culture production Editor Andrea Bosher. Typeset by Chandos Electronic publishing Stanton Harcourt, UK.
- **George, E.F.; Hall, M.A. and Deklerk, G. J. (2008).** Plant propagation by tissue culture. Volume 1. The Background, 3rd Edition, Published by Springer, Dordercht. the Netherlands.
- **Grossmann, K.; Hauser, C.; Sauerbrey, E.; Fritseh, H.; Schmidt, O. and Jung, J. (1989).** Plant growth retardants as in hibitors of ethylene production, J. Plant physiol. 134: 538- 543.
-**Haifeng, Q. and Qingzhong, X. (2004).** Effected of S-3307 and PP333 on callus induction and Plantlet regenerati tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences). 30(1):49-52 .
- **Hegazy, A. E.; Nasr, M. I.; Ibraheem, I. A. and El-Bastawissy, H. H. (2009).** Micropropagation of date palm cv. Malakab through embryogenesis: 3. Effect of yeast extract casein hydrolysate and pineapple extract .J. Agric. Sci. Mansoura Univ. 34: 1561-1576.
- **Kepenek, K. and Karoglu, Z. (2011).** The effects of paclobutrazol and daminozid on in vitro micropropagation of some apple (*Malus domestica)* cultivars and M9-rootstock. African Journal of Biotechnology. 10(24): 4851- 4859.
- **Khierallah, H. S. M. and Hussein, N. H. (2013).** The Role of coconut water and casein hydrolysate in somatic embryogenesis of date palm and genetic stability detection using RAPD markes. Research in Biotechnology. 4(3):20-28.
- **Lai, K. L. and Liu, F. (1986).** Further studies on the variability of plant Regeneration in Alfalfa *Medicago stiva* L. Somatic Embryos. Plant Sci., 100: 211- 219.
-**Morton, J. F. (1987).** Date In: Fruits of warm climates Julia F. Morton, Miami, 5-11 .
- **Murashige, T. and Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures physio. Plant. 15:473- 497.
- **Ogas, J.; Chen, J. T.; Sung, S. R. and Somerville, C. (1997).** Cellular differentiation regulated by gibberellins in Arabidopsis thaliana pickle mutouf. Science, 227: 417- 423.

- **Purohit, S. S. (1986).** Hormonal Regulator of plant Growth and Development. Vol. 4. Agro. Botinical Publishers [India].
- **Subotic, A.; Jevremovic, S.; Trifunovic, M.; Petric, M.; Milosevic, S. and Grubisic, D. (2009).** The influence of gibberllic acid and paclobutrazol on induction of somatic embryogenesis in wild type and hairy root cultures of *Centaurium erythraea* Gillib. African Journal of Biotechnology. 8(4):3223-3228.
- **Thom, M.; Maretzki, A.; Jomer, E. and Soaki, W.S. (1980).** Nutrient uptake and accumulation by sugar cane cell culture in relation to growth cycle. plant Cell Organ. Cult. 1-3.
- **White, S. A. (2003).** Plant growth regulator for height Suppression of *Tradesccantia virgininana* L. In: Nutrition and plant growth regulator rates For high quality growth of containerized spider wart (*Tradesccantia virgininana* L.) Virginia A. Polytechnic Institutes and State Uni. Blacksburg, M. Sc. Thesis.
- **Yelenosky, G.; Mauk, C. S.; Bausher, M. G. and Kushad, M. M. (1987).** Chemical bioregulation of growth and cold hardiness in citrus. In: Plant Cold Hardiness (Li, P.H., ed.). Alan R. Press Inc., New York, 299-321.
- **Zuoine, J. and EL-Hadrami, I. (2004).** Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera L*. Effect of Exogenous supply of sucrose on proteins, Sugars, phenolics and peroxidase Activities during Embryogenesis Cell suspension culture Biotechnology. 3(2): 114-118.

Effect of Paclobutrazol , Casein Hydrolysate and Period on Growth and Development of Embryogeneic Callus *In vitro* of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Nersy

Huda. A. AL-Taha Majid. A. Ibrahim Zyad. T. S. AL-Ali

Department of Horticulture and Landscape Design College of Agriculture Basra University

Date palm Research Center Basra University

Summary

This study was conducted of tissue culture laboratory–College of Agriculture–Basra University. Period from 20-9-2012 until 20-12013. An primary calli which was enhanced from shoot tips of date palm cv. Nersy aim to study the effect of paclobutrazol, Casein hydrolysate and the period on development of embryogeneic callus to form somatic embryos.

100 mg of the primary callus was cultured in media containing Auxin NAA 10 $mg.l^{-1}$ and Cytokinine 2ip 2 $mg.l^{-1}$ with 2 $mg.l^{-1}$ Activated charcoal in tow media ,The first which added different concentration of paclobutrazol (0.3, 0.5, o.7, 0.9, 1.0) $mg.l^{-1}$ and the second media were added different concentration of casein hydrolysate (200, 400, 600, 800, 1000) $mg.l^{-1}$ added to the treatment control . Reculturing of Embryonic callus was continued on the same media for four months in light.

Results revealed that Embryonic callus cultured on media containing 1.0 $mg.l^{-1}$ paclobutrazol was more positive effect which gave the highest fresh and dry weight which were recorded (1.5671, 0.1198) gm respectively, these were significantly differed from other treatments of paclobutrazol, casein hydrolysate and control .

Results Also showed that 1000 $mg.l^{-1}$ of casein hydrolysate (the second concentration) was too significantly differed from other treatment and gave the highest fresh and dry weights (1.2803 , 0.0959) gm ,in other side the control treatment had the lowest fresh and dry weight of cultured embryonic callus. (0.2578 , 0.0198) gm. The Results also revealed significant increased in fresh and dry weight of embryonic callus with increased recultured in the light for four months.

The Results also showed that embryonic callus was development to somatic embryos in different sizes in all media containing paclobutrazol and casein hydrolysate , more clearly in media containing paclobutrazol when compared with other treatments .