مجلة جامعة الملك سعود، ٢٧ ، مجلة العلوم الزراعية(١)، ص ص ٣٥-٤٨، الرياض (٢٠١٦م)

استخدام نظام الغمر المؤقت (TIS) لاستحثاث الأجنة الجسدية لنخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) صنف البرحي المزروع معمليا

أحمد ماضي وحيد المياحي [١] عبد المنعم حسين الموسوي [٢]

[١] *مركز ابحاث النخيل/ جامعة البصرة/ البصرة/ العراق*

[٢] *وحدة ابحاث الخلية/ كلية العلوم/ جامعة البصرة/ البصرة/ العراق*

(قدم للنشر في ١٩/ ١/ ١٤٣٧هـ؛ قبل للنشر في ١٠ / ٨ / ١٤٣٧هـ)

الكلمات المفتاحية: المفاعل الحيويPlantform bioreactor " نظام الغمر المؤقت"، نخلة التمر، تكوين الأجنة الجسدية.

مخلص البحث: أجريت هذه الدراسة لبحث كفاءة استخدام " المفاعل الحيوي" Plantform Bioreactor الذي يعمل بنظام الغمر المؤقت (Temporary Immersion system) في استحثاث الأجنة الجسدية لنخيل التمر صنف البرحي التي أستعمل فيها فترات غمر مختلفة بمعدل ٢ و ٥ دقيقة كل ٨ ساعات و٥ دقيقة كل ١٢ساعة، وقد أظهرت معاملة الغمر٢ دقيقة كل ٨ ساعات تفوقها في عدد الأجنة الجسدية ومعدل أوزانها الرطبة والتي بلغت ١٠٢ جنين/ ٥٠٠ملغم كالس جنيني و١,٤٨٠ غرام على التوالي مقارنة بفترتي ألغمر ٥ دقيقة كل ٨ و ١٢ ساعة ولمدة ١٠ أسابيع. كما أظهرت الدراسة التفوق المعنوي لنظام الغمر المؤقت"TIS بفترة غمر 2 دقيقة كل8 ساعات في عدد الأجنة الجسدية المستحثة من الكالس الجنيني ومعدل أوزانها الرطبة وسرعة تشكل الأجنة المتكونة فضلا عن تفوقها في معدل أطوالها وأقطارها مقارنة بالأجنة النامية بالوسط الصلب.

ومن تتبع تغيرات محتوى النشا خلال تطور الأجنة الجسدية لنخيل التمر صنف البرحي في كلا الوسطين تبين أن الأجنة النامية في المفاعل الحيوي" بنظام الغمر المؤقت كانت متفوقة في محتواها من النشا طيلة فترات الدراسة مقارنة بتلك النامية في الوسط الصلب .

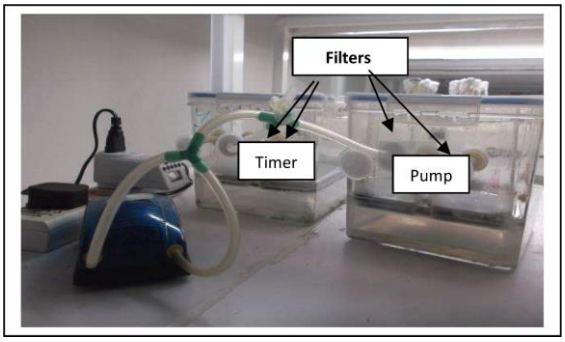
١ – المقدمة

تعد نخلة التمر *Phoenix dactylifera* L. واحدة من أهم أشجار الفاكهة مستديمة الخضرة التي تنتشر زراعتها في مختلف بلدان العالم لما تشكله من اهمية اقتصادية وغذائية عالية (Al-Khalifah and Shanavaskhan ,2012). أثبتت زراعة الأنسجة النباتية لنخيل التمر كفاءتها من حيث وفرة النباتات وتجانسها التي يمكن انتاجها من نبات واحد ومطابقة النباتات الناتجة لأصولها "True-to-type" التي اخذت منها، وخلوها من المسببات المرضية والحشرية (Zaid *et al.*,2011) . وقد أكدت الأبحاث على النطاق التجاري الواسع كون النباتات المنتجة متناسقة من حيث النمو (Mii,2001;Jayanthi 2001 Tokuhara and and Mandal,). وبالرغم من التقدم الحاصل في زراعة الأنسجة النباتية بواسطة الأجنة الجسدية الذي يمكن أن يكون نظاما كفوءاً وأكثر أنتاجا إلا ان هناك العديد من المشاكل التي تواجه اكثار النخيل بهذه الطريقة منها محدودية عدد الاجنة المتكونة وتلاصقها فضلا عن اندماجها في خلايا الكالس وانخفاض نسبة إنباتها التي تتراوح بين صفر – 50% نتيجة استخدام الطرق التقليدية في الإكثار باستخدام الأوساط الصلبة Anjaran (Mazri and Meziani 2015 ؛ *et al.*,1995). لكن استعمال الاوساط السائلة حسنت كثيرا طريقة التضاعف الخضري، كما إنها ساعدت في الإكثار الواسع لبعض أصناف نخيل التمر كالبرحي ودقلة نور والقنطار (Bhaskaran and Smith, 1992 ؛ Zouine *et al*.,2005؛ Mazri, 2014;). اما طريقة الزراعة بنظام الغمر المؤقت(TIS) فهي واحدة من أكثر الطرق الواعدة للإكثار الدقيق، وهناك عدة تقارير تناولت دور المفاعلات الحيوية في الاكثار الواسع لنخيل التمر باستخدام طريق تولد الاجنة الجسدية او السيقان (Okere *et al*. 2010 ؛ Othmani Al-Mayahi, ؛ Ibraheem, *et al*., 2013؛*et al*., 2011 2015). وأظهرت دراسة Tisserat and Vandercook (1985) زيادة نمو وتطور اجنة الجزر ونخلة التمر المزروعة بالوسط السائل بنظام الغمر المؤقت بمعدل 1.9 أضعاف للجزر و4 أضعاف لنخلة التمر مقارنة بالزراعة في الاوساط الصلبة. ان العديد من الدراسات تناولت اكثار النباتات بتقانة زراعة الأنسجة بواسطة الأجنة الجسدية باستخدام الأوساط الصلبة، ونظرا لقلة الدراسات التي تناولت تطور الأجنة الجسدية ونضجها باستخدام الأوساط السائلة بنظام الغمر المؤقت "TIS" في نخيل التمر فقد اجريت هذه الدراسة للبحث عن أفضل الشروط اللازمة لاستحثاث وتطور الاجنة الجسدية من الكالس الجنيني لنخلة التمر صنف البرحي باستخدام حاويات المفاعل الحيوي ومدّة

الغمر، علاوة على ذلك تقييم تكوين الأجنة في المفاعل الحيوي بنظام الغمر المؤقت والأوساط الصلبة.

٢- مواد البحث وطرقه

نُفذ هذا البحث في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لمركز أبحاث النخيل في جامعة البصرة تم الحصول على الكالس الجنيني وحسب الطريقة الموصوفة من قبل Al-Mayahi, 2015 . نُقل الكالس الجنيني لنخيل التمر صنف البرحي المزروع في الوسط الغذائي الصلب والمزود بـ 10 ملغم. لتر$^{-1}$ NAA و 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ 2iP لمدة 12 اسبوع إلى وسط MS السائل(Murashige and Skoog,1982) الخاص بتكوين الاجنة الخضرية المزود بـ 1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ 0.500 Activated charcoal(AC)+ Dichlorophenoxy acetic acid (2,4 D) غرام. لتر$^{-1}$ لمدة 12 أسبوع. وحضنت الزروعات تحت ظروف الإضاءة بمعدل 16 ساعة ضوئية و8 ساعات ظلام وشدة إضاءة 1000 لوكس وعلى درجة حرارة (27 ±2)°م ورطوبة (٣٥-٤٠)٪. استخدمت عدة فترات غمر للأنسجة ٢ و ٥ دقائق لكل ثماني ساعات و5 دقائق لكل ١٢ ساعة. عملية ضخ الهواء تم بواسطة مضخة عبر فلاتر معقمة ومتصلة بمنظم كهربائي ينظم عملها وفقا للفترات المطلوبة للغمر، وكما هي موضحة في اللوحة ١. حُسبَ عدد الاجنة الجسدية المتكونة ومعدل أوزانها بعد ١٠ أسابيع من زراعة الكالس الجنيني. تم تعديل حموضة الوسط الغذائي قبل التعقيم الى ٥,٨ ، ثم تم تعقيم الوسط الغذائي السائل مع المفاعل الحيوي باسستخدام جهاز الموصده (Autoclave) على درجة حرارة ١٢١°م ولمدة ٢٠ دقيقة. تم تعقيم الفلاتر المايكروية الخاصة بالمفاعل الحيوي (Plant form bioreactor) بشكل منفصل لتلافي الضغط الناتج من عملية التعقيم والذي قد يسبب تلف المفاعل الحيوي وباستخدام نفس الجهاز ونفس درجة الحرارة المذكورين اعلاه.، ثم تم ربط الفلاتر بالمفاعل الحيوي بعد التعقيم داخل كابينة الزرع لمنع التلوث. ؛المفاعل الحيوي المستخدم في هذه التجربه تم الحصول علية بمساعدة الدكتورSayegh . تم تطوير هذا المفاعل من قبل الباحثين Welandar and Sayegh, 2012، ويعتمد هذا الجهاز على تسليط الضغط على الوسط الغذائي لرفعه الى المكان الذي يحتوي على المواد النباتية (سيقان اجنة او غيرها) باستخدام مضخة بسيطة كتلك المستخدمة في احواض الاسماك عبر فلتر دقيق لتنقية الهواء من الملوثات Welandar and Sayegh, (2012) ، يمكن تعقيم هذه المفاعلات بسهولة بجهاز المعقام البخاري (Autoclave) .



لوحة (١). زراعة كالس نخيل التمر صنف البرحي في حاويات الـBioreactor بنظام الغمر المؤقت (TIS) بغية استحثاث الاجنة الجسدية، والمزودة بمنظم Timer ومضخة Pump وفلاتر Filters .

حضنت الزروعات تحت ظروف الإضاءة بمعدل 16 ساعة ضوئية و8 ساعات ظلام وشدة إضاءة قدرها 1000 لوكس وعلى درجة حرارة (27 ±2)°م ورطوبة (٣٥-٤٠)٪. استخدمت عدة فترات غمر للانسجة ٢ و ٥ دقائق لكل ثماني ساعات و5 دقائق لكل ١٢ ساعة. عملية ضخ الهواء تم بواسطة مضخة عبر فلاتر معقمة ومتصلة بمنظم كهربائي ينظم عملها وفقا للفترات المطلوبة للغمر، وكما هي موضحة في اللوحة ١. حُسبَ عدد الأجنة الخضرية المتكونة ومعدل اوزانها بعد ١٠ اسابيع من زراعة الكالس الجنيني.

وبعد تحديد فترة الغمر المثلى لنمو وتطور الأجنة الجسدية في التجربة الأولى ثبتت فترة الغمر٢ دقيقة لكل ثماني ساعات في التجارب اللاحقة التي قورن فيها نظام الزراعة المؤقت مع الوسط الصلب وتأثيرهما على نمو الأجنة الجسدية وتطورها ، وقد استعمل الوسط الصلب MS وزود بـ ٧غرام/ لتر من الآجار و 0.1 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA.

١-٢: الوزن الرطب للأجنة: أُخذت أجنة عشوائيا وغسلت عدة مرات بالماء المقطّر ثمّ جففت بمنديل ناعم لإزالة الماء ثم قيس الوزن وتمت هذه العملية في كابينة الزراعة المعقمة.

٢-٢: طول الأجنة الجسدية وقطرها: قيست أطوال الاجنة وأقطارها بوساطة Vernier scale.

٣-٢: التحليلات النباتية : قدر محتوى الأنسجة خلال تطور الاجنة الخضرية من النشا في كلا الوسطين الصلب والسائل بنظام الغمر المؤقت وذلك بعد ٣٠ و٦٠ و٧٥ و٩٠ يوم من الزراعة حسب طريقة McCready *et al*.,(1950) . واستخدم ثلاثة مكررات لكل معاملة.

تصميم التجربة والتحليل الإحصائي.

نفذت تجارب هذه الدراسة كتجارب بسيطة وحسب التصميم العشوائي الكامل، واجري اختبار الفرق بين المتوسطات باستخدام اقل فرق معنوي للمعدل R.L.S.D وبمستوى احتمال ٥٪ (Snedecor and Cochran, 1967).

٣- النتائج والمناقشة

١-٣: تأثير فترات الغمر" بنظام الغمر المؤقت "TIS" في تطور الأجنة الجسدية لنخيل التمر صنف البرحي.

تُشير النتائج في (الجدول1) إلى أن فترات الغمر في حاويات الـمفاعل الحيوي ٢ دقيقة لكل

ثماني ساعات قد اثرت معنويا في زيادة عدد الأجنة الجسدية ومعدل أوزانها الرطبة لنخيل التمر صنف البرحي اذ بلغت ١٠٢ جنين/ ٥٠٠ملغم من الكالس الجنيني ومعدل وزن الجنين ١,٤٨٠غرام ، بينما سببت زيادة فترات الغمر في حاويات المفاعل الحيوي ٥ دقائق لكل ١٢ ساعة او ٥ دقائق لكل ٨ ساعات الى خفض أعداد الأجنة الجسدية ومعدل أوزانها الرطبة وبفارق معنوي ٤٢ و ٦٨ جنين/ ٥٠٠ملغم التوالي. وقد ظهرت الأجنة الجسدية في بادئ الأمر على شكل نتوءات بيضاء صغيرة على سطح نسيج الكالس الجنيني المزروع في حاويات الـمفاعل الحيوي ثم تطورت إلى أجنة جسدية متكاملة ومنفصلة عن بعضها البعض(لوحة ٢).

وتأتي هذه النتائج متفقه مع ما ذكره كل من Etienne and Berthouly,(2002) من ان مدة الغمر في نظام (TIS) هي الأكثر تأثيرا وفعالية على هذا النظام. كما تتفق هذه الدراسة مع Etienne *et al.*,(1997a,b) من ان الغمر لفترات قصيرة ١ دقيقة لكل ١٢ ساعة حفزت تكوين الأجنة الجسدية في نباتي القهوة والمطاط المكثرة نسيجيا. وأكد Albarran *et al.*,(2005) ان لفترات الغمر المختلفة تأثير على كفاءة تجديد الجنين الجسدي، حيث أدى الغمر القصير١ دقيقة/ ٤ ساعات إلى الحصول على عدد اكبر من الاجنة في نبات القهوة . كما تتفق الدراسة مع ما اورده .Gatica-Arias *et al.*,(2008) على ان الغمر المتكرر ولفترات قصيرة اكثر فعالية على نمو وتطور الأجنة الجسدية. ان اتباع التجفيف الجزئي Partial desiccation على الكالس الجنيني يساعد على نضوج الاجنة الجسدية وهذا يؤدي الى الحصول على اعداد لابأس بها من الاجنة الناضجة ومن المعتقد ان هناك علاقة معقدة بين المحتوى المائي من الكالس الجنيني وعملية نضوج الاجنة الجسمية . وعلى هذا الاساس هناك عوامل اخرى تشترك مع نقصان المحتوى المائي للكالس الجنيني منها ارتفاع تركيز السكر المتعدد والمسمى gellan gum وهذا يسهل كثيرا في نضوج الاجنة الخضرية كما وان من المعتقد ان التجفيف الجزئي للكالس الجنيني يسبب ارتفاع مستوى حامض الابسيسك والذي يساعد على احداث النضوج (Klimaszewska *et al*. 2000).

الجدول رقم (١). تأثير فترات الغمر في حاويات المفاعل الحيوي"Plant Form Bioreactor" بنظام الغمر المؤقت(TIS)على تكوين الاجنة الجسدية لنخيل التمر صنف البرحي من٥٠٠ملغم كالس جنيني بعد ١٠ اسابيع من الزراعة.

فترات الغمر	عدد الاجنة الجسدية / ٥٠٠ملغم كالس جنيني	وزن الاجنة الجسدية(gm.)
2 min every 8 hrs.	١٠٢a	١,٤٨٠a
5 min every 8 hrs.	٤٢c	٠,٩٥٣c
5 min every 12 hrs.	٦٨b	١,٢٦٩b

*المعدلات التي يتبعها الحرف نفسه في داخل العمود لا تختلف عن بعضها معنوياً واختلافها دلالة على وجود فروق معنوية على مستوى احتمالية 5٪ .

لوحة (٢). الأجنة الجسدية المستحثة من الزراعة في حاويات المفاعل الحيوي الذي يعمل بنظام الغمر المؤقتTIS.

وتأتي هذه النتائج متفقه مع ما ذكره كل من Etienne and Berthouly,(2002) من ان مدة الغمر في نظام (TIS) هي الأكثر تأثيرا وفعالية على هذا النظام. كما تتفق هذه الدراسة مع Etienne *et al.*,(1997a,b) من ان الغمر لفترات قصيرة ١ دقيقة لكل ١٢ ساعة حفزت تكوين الأجنة الجسدية في نباتي القهوة

والمطاط المكثرة نسيجيا. وأكد Albarran *et al.*,(2005) ان لفترات الغمر المختلفة تأثير على كفاءة تجديد الجنين الجسدي، حيث أدى الغمر القصير١ دقيقة/ ٤ ساعات إلى الحصول على عدد أكبر من الأجنة في نبات القهوة . كما تتفق الدراسة مع ما اورده Gatica-Arias *et al.*,(2008). على ان الغمر المتكرر ولفترات قصيرة اكثر فعالية على نمو وتطور الأجنة الجسدية. ان اتباع التجفيف الجزئي Partial desiccation على الكالس الجنيني يساعد على نضوج الاجنة الجسدية وهذا يؤدي الى الحصول على اعداد لابأس بها من الاجنة الناضجة ومن المعتقد ان هناك علاقة معقدة بين المحتوى المائي من الكالس الجنيني وعملية نضوج الاجنة الجسمية . وعلى هذا الاساس هناك عوامل اخرى تشترك مع نقصان المحتوى المائي للكالس الجنيني منها ارتفاع تركيز السكر المتعدد والمسمى gellan gum وهذا يسهل كثيرا في نضوج الاجنة الخضرية كما وان من المعتقد ان التجفيف الجزئي للكالس الجنيني يسبب ارتفاع مستوى حامض الابسيسك والذي يساعد على احداث النضوج (Klimaszewska *et al.* 2000).

٢-٣: تأثير نوع الوسط الغذائي على تطور الأجنة الجسدية لنخيل التمر صنف البرحي.

تظهر البيانات في (الجدول2) إلى أن تكاثر الأجنة الجسدية كان مختلف في النظامين، حيث ازداد عدد الاجنة بعد ٨ و١٠ اسبوع من الزراعة ومعدل اوزانها الرطبة المستحثة من الكالس الجنيني المزروع في الوسط الغذائي السائل بنظام الغمر المؤقت"(٢ دقيقة لكل ثماني ساعات) معنويا مقارنة بتلك المتكونة على الوسط الصلب. حيث ادى الغمر المتكرر إلى زيادة عدد الأجنة الى ١١٢ لكلّ حاوية مفاعل حيوي" مزروع بـ ٥٠٠ ملغم كالس جنيني بالمقارنة بأعداد الأجنة وأوزانها في الوسط الصلب .

ان الوسط السائل لم يزد عدد الأجنة الجسدية فحسب لكنه سرّع من تشكيلها أيضا خلال ٦ أسابيع من زراعة الكالس الجنيني حيث كان تشكيل الأجنة الجسدية واضحا في وسط الزراعة السائل (المفاعل الحيوي) بنظام الغمر المؤقت مقارنة بالوسط الصلب الذي تميز بانخفاض تطور الكالس الجنيني وتشكيل الأجنة الجسدية حتى الأسبوع ٨ حيث بلغ ٥٦ و ١٢ جنين لكلّ زراعة على التوالي. أبقى الوسط السائل تفوقه المعنوي على الوسط الصلب الذي يصل نهاية عملية تشكيل الجنين الجسدي في الأسبوع ١٠. بالمقابل الاوساط الصلبة واصلت إنتاج أكثر في الأسبوع ١٠ في نهاية التجربة، أنتجت الأوساط السائلة ١١٢ جنين جسدي بالمقارنة مع الوسط الصلب ٢٧ جنين(جدول2). كما يتضح من النتائج في الجدول نفسه الى التفوق المعنوي لنوع الوسط في نسبة الأجنة الناضجة، حيث

ازداد طول الأجنة وقطرها الذي استمر بالنمو حتى وصل اقصى طول وقطر بلغ ١,٧ و ١٩,٠ سم وذلك بعد ١٠ أسابيع مقارنة بالأجنة النامية في الوسط الصلب الذي بلغ ٠,٩ و١٠,٠ سم على التوالي (لوحة 3) .

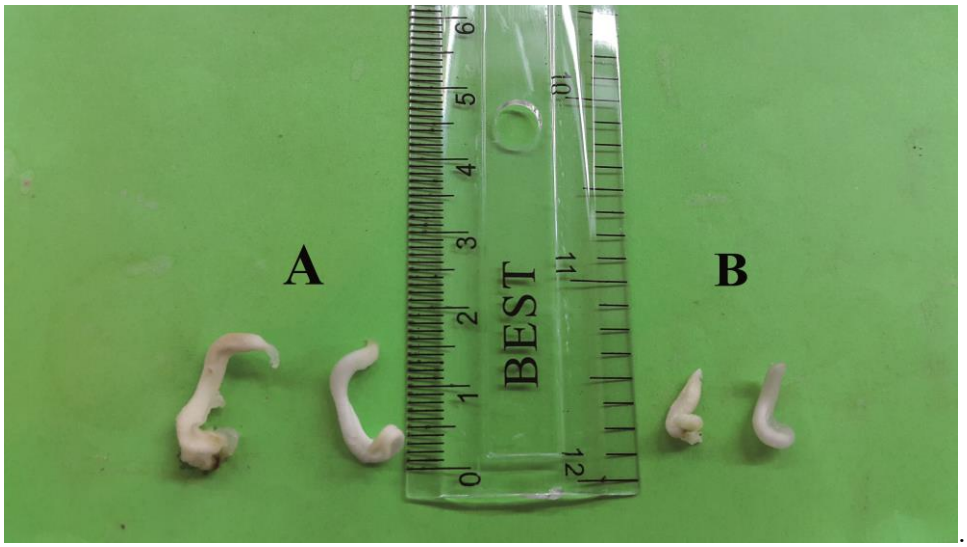
أن التفوق في عمل المفاعل الحيوي "Bioreactor" ربما قد يكون ناتجا عن زيادة جاهزية المواد الغذائية وسهولة امتصاصها في الوسط السائل المتحرك مقارنة بالوسط الصلب فضلا عن حركة الأجزاء النباتية في الوسط الغذائي السائل تؤدي الى تبادل الغازات والتخلص من ظاهرة نقص بعض العناصر التي قد تظهر على الاجزاء النباتية نتيجة لتجمعها وانتشارها (Ducos *et al* .,2003). وذكر Al Khateeb and Alturki ,(2014) ان الزراعة في الوسط الصلب قد يعيق امتصاص المغذيات والذي بدوره يؤثر على النمو وتضاعف النموات الجسدية مقارنة بالوسط السائل .

كما ان المفاعل الحيوي حقق حالة مفيدة للانفصال الأقصى من الخلايا عبر ضخ الهواء النقي وهي حالة مفيدة لحدوث حالات انفصال الاجنة عن بعضها من جهة وعن خلايا الكالس الجنيني من جهة اخرى الامر الذي ادى الى زيادة اعداد الاجنة المتكونة. وربما يكون السبب في زيادة تكوين الأجنة الجسدية في الوسط السائل بنظام الغمر المؤقت"TIS" الى اسهامه بزيادة انتشار الاوكسجين الامر الذي ادى الى نمو وتطور الكالس الجنيني نتيجة الحركة المتولدة من تجهيز الهواء الخارجي بنظام الغمر المؤقت TIS . كما ان زيادة المنطقة السطحيّة للخلايا المعرضة مباشرة إلى الوسط المغذّي تسبب في زيادة عدد الأجنة الجسدية المتكونة وزيادة نسبة نضجها (Duval *et al*.,1995, Mujib *et al*.,2014, Mehrotra *et al*.,2007). واشار Roels (2005 , 2006) *et al*. ان الزراعة بالوسط السائل بنظام الغمر المؤقت"Bioreactor" يمنع تراكم ثنائي اوكسيد الكاربون والاثيلين اللذان لهما تأثيرات ضارة على الانسجة المزروعة الذي يحصل نتيجة الزراعة فوق الوسط الصلب. تتفق هذه الدراسة مع تلك التي اجريت على الزراعة بنظام الغمر المؤقت واكدت تفوقها في تكاثر الأجنة مقارنة باستخدام انظمة الزراعة التقليدية لنبات القهوة *Coffea arabica* Berthouly *et al*., 1995; Berthouly and Etienne, (2005).

الجدول رقم (٢). تأثير نوع الوسط الغذائي على توالد الأجنة الجسدية لنخيل التمر صنف البرحي المكثر نسيجيا .

نوع الوسط الغذائي	عدد الاجنة/ ٥٠٠ ملغم كالس جنيني، بعد		وزن الاجنة الجسدية "g" بعد 10 أسبوع	المدة اللازمة لظهور الاجنة (يوم)	متوسط أطوال الأجنة سم	متوسط اقطار الأجنة سم
	٨ اسبوع	١٠ اسبوع				
المفاعل الحيوي مع نظام الغمر المؤقت "(TIS)	56 a	١١٢a	١,٤٨٣a	٤٥ a	١.٧ a	٠.١٩ a
الصلب	١٢ b	٢٧ b	٠,٩٠٩ b	٦٠ b	٠.٩ b	٠.١٠ b

*المعدلات التي يتبعها الحرف نفسه لا تختلف عن بعضها معنوياً واختلافها دلالة على وجود فروق معنوية على مستوى احتمالية 5٪



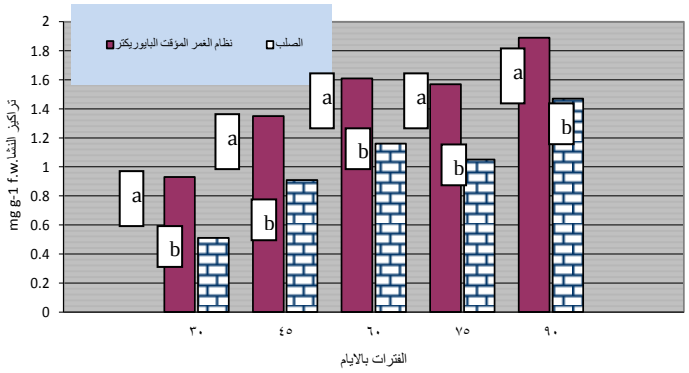
لوحة (٣). تأثير نوع الوسط على صفات الاجنة الجسدية في الطور الفلقي المتولدة لنخيل التمر صنف البرحي A) الأجنة المتولدة في المفاعل الحيوي Bioreactor بنظام الغمر المؤقت B) الأجنة المتولدة عند الوسط الصلب.

إن الكفاءة في تكاثر الأجنة الجسدية لنخلة التمر بنظام الغمر المؤقت مقارنة بالوسط الصلب، يؤكّد نتائج سابقة اجريت على اصناف مختلفة لنخلة التمر من قبل Fki *et al.*, (2003)، حيث حصل على اعلى عدد من الاجنة في الوسط السائل بنظام الغمر المؤقت بلغ ٢٠٠ جنين لكلّ ١٠٠ ملغم كالس جنيني مقارنة بـ ١٠ اجنة فقط في الوسط الصلب. بينما ادى زراعة نسيج الكالس الجنيني لصنفي Bousthami noir وJihel في الوسط السائل إلى إنتاج ٧٢ جنين لكلّ ١٠٠ مليلتر من وسط الزراعة خلال شهرين مقارنة بتلك المزروعة على الوسط الصلب أنتج ١٦ جنينا بعد ٤ شهور (Zouine *et al.*,2005).

٣-٣: تأثير نوع الوسط في محتوى الأنسجة النباتية من النشا خلال تطور الأجنة الجسدية.

من تتبع التغيرات في محتوى الانسجة من النشا خلال تطور الأجنة الجسدية لنخيل التمر صنف البرحي في كلا الوسطين تبين أن الأجنة النامية في Bioreactor بنظام الغمر المؤقت كانت متفوقة في محتواها من النشا طيلة فترات الدراسة (٣٠ و٤٥ و٦٠ و٧٥ و ٩٠) يوم مقارنة بتلك النامية في الوسط الصلب(شكل ٢). .

إن التوجه صوب الزراعة بأنظمة الغمر المؤقت تكمن في منع ترسيب المغذيات والسماح بالنمو الأمثل للأنسجة النباتية (Scragg ,1992). حيث يعتبر محتوى العناصر الكبرى المسؤولةُ عن التراكم النشوي وتشكيل الأجنة الجسدية. كما ان توفر الكربوهيدرات في وسط الزراعة يمكن أن يسبب في زيادة المستويات الداخلية للنسيج النباتي منها(Borisjuk *et al.*, 2004). وهذا ما اكده Sané *et al.*,(2006)بالكشف عن التراكم الهام من النشا والبروتين في انسجة نخلة التمر المزروعة بالأوساط السائلة. أن تقييم التغيرات الكيموحيوية المختلفة من الممكن ان تفسر استجابة تطوير الانسجة المزروعة بنظام الغمر المؤقت مقارنة بأنظمة الزراعة الأخرى.



الشكل رقم (٢). تأثير نوع الوسط الغذائي في محتوى الأجنة الجسدية من النشا بعد فترات زمنية مختلفة لنخيل التمر صنف البرحي.

٤- الاستنتاج

أثّرت فترات الغمر بنظام الغمر المؤقت TIS على نمو وتطور أجنة نخيل التمر صنف البرحي حيث سجلت فترة الغمر٢ دقيقة لكل ثماني ساعات أفضل النتائج من حيث عدد الأجنة ومعدل أوزانها الرطبة ، كما ان الزراعة بنظام الغمر المؤقت حققت تفوقا معنويا مقارنة بالوسط الصلب من حيث عدد الأجنة الجسدية وأوزانها الرطبة وفترة ظهورها فضلا عن تفوقها في المؤشرات الكيموحيوية والمتمثلة بمحتوى الأجنة من النشا.

٥- المراجع

Albarran J, Bertrand B, Lartaud M, Etienne H "Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (Coffea arabica) somatic embryos".(2005). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81,(2005),27-36. .

AlKhateeb, A.A. and Alturki, S.M " *A comparison of liquid and semi-solid cultures on shoot multiplication and rooting of three date palm cultivars* (*Phoenix dactylifera* L.) *in Vitro"*. Adv. Env. Biol. 8(16) Special (2014), 263-269

Al-Khalifah N.S. And ,Shanavaskhan AE." *Micropropagation of Date Palms. Asia PacificConsortium on Agricultural Biotechnology (APCOAB) and Association of gricultural*" . Research Institutions in the Near East and North Africa. (AARINENA). (2012),54.

Al-Mayahi, A W. " *An efficient protocol for indirect somatic embryogenesis and organogenesis from leaf segments of date palm* (*Phoenix dactylifera* L.) *cv. Quntar*. African J. of Agricultural research, 10(10), 2015, 1031-1042.

Anjaran, M., Bougerfaoui, M., Cheick, R. and Aitchitt, M. "*Production de in vitro plants de palmier datter parla techniqed organogenese in vitro. Experience marocaine Journeesintern ationales surle palmier dattier dons agriculture oisenne pays mediter aniens*" –Elche Espagne.,(1995),25-27.

Berthouly, M. and H. Etienne. "*Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation*". In: A. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.), pp. 165- 203. Liquid culture systems for in vitro plant propagation. Springer, Dordrecht, Netherlands. (2005).

Bhaskaran S. and. Smith, R. H. " *Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of Phoenix dactylifera cv. Barhee*". *Plant Cell Reports.* 12,1,(1992).,22–25

Borisjuk L.; Rolletschek H.; Radchuk, R.;Weschke W.; Wobus, U.; Weber, H. "*Seed*

Jayanthi M, Mandal P. K. " *Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis pf regenerated plants in Tylophora indica* (Burm.f.Merrill.)" *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 37,(2001),576-580.

Klimaszewska K., Grain E, Cardou M.B., Isabel N. and Plourde A. "*Effect of sugars, amino acid and culture technique on maturation of somatic embryos of Pinus strubus on medium with two gellan gum concentrations*". Plant Cell Tissue and Organ, Culture,(2000), 62:27-37.

McCready, R.M.; Guggolz, J.; Owens, H.S "*Determination of starch and amylose in vegetables*" . Analytical Chemistry, 22.(1950),1156-1158.

Mehrotra, S., Goel K. M., Kukreja A. K. and Mishra B. N. *" Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization*". Afr. J. Biotech. 6(13) ,(2007),1484-1492

Mazri M.A. "*Effect of liquid medium and in vitro pre-acclimatization stage on shoot elongation and acclimatization of date palm* (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda". J. of ornamental and Horticultural Plants 2(4), (2014),225-23.

Mazri M.A. and Meziani R. "*Micropropagation of Date Palm: A Review*". Cell Dev. Biol, 4(3) (2015),1-5.

Mujib A., Ali M., Isah T.and Dipti. " *Somatic embryo mediated mass production of Catharanthus roseus in culture vessel (bioreactor) - a comparative study*". Sau. J. of Bio.Sci. **,** (2014).

Murashige T, Skoog F "*A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*". Physiol. Plant. 15,(1962),473-497.

Othmani R. Mzid C., Bayoudh, , Trifi M., and Drira N. "*Bioreactors and Automation in Date Palm Micropropagation*". In: Date Palm Biotechnology , eds. Shri Mohan Jain *et al* , Sipringer, (2011) 119 -137.

Okere, A.U, Odofin, W.T Aladele, S.E, Fajimi, O, Adetunji, O.A, Gidado, R.M and Solomon, B.O. "*Cultivation of Phoenix dactylifera L. (Date Palm) for Combating Desertification and Enhanced Livelihood*": Nacgrab R and D Focus. (2010)http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic,2010,882.8

Roels S., Escalona M., Cejas I., Noceda S., Rodriguez R., Canal M.J., Sandoval J., Debergh P. "*Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system*". Plant Cell. Tissue. Organ Cult. 82,(2005),57-66.

Roels S., Noceda S., Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodriguez R, Debergh P. "*The development and differentiation: a role for metabolic regulation*". Plant Biology,6,(2004),375-386.

Ducos JP, Alenton R, Reano JF, Kanchanomai C, Deshayes A, Pétiard V. "*Agronomic performance of Coffea canephora P. trees derived from large-scale somatic embryo production in liquid medium*". Euphytica 131, (2003),215-223

Ducos JP ; Lambot ,C. and Pétiard V. "*Bioreactors for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis*" . Int. J. Plant Dev. Bio. 1(1), (2007),1-12.

Duval, Y., F. Engelmann. and T. Durand-Gasselin. "*Somatic embryogenesis in oil palm (Elaeis guineesis Jacq)*". In: Y. P. S. Bajaj (Ed.), pp. 235-352. Somatic embryogenesis and synthetic seed. Vol. 1. Springer, Berlin. .(1995).

Etienne H., Bertrand B., Anthony F., Côte F. & Berthouly M. L."*Embryogenèse somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier* " In: ASIC Publishers (eds) 17th International Scientific Colloquiun on Coffee, Nairobi. (1997a) ,457–465), Vevey.

Etienne, H., M. Lartaud, N. Michaux-Ferrière, M. P. Carron, M. Berthouly, and Teisson C." *Improvement of somatic embryogenesis in Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique". In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 33.(1997b), 81–87.

Etienne H., Berthouly M. "*Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Somatic embryogenesis and genetic transformation in Coffea arabica* L". Tiss. Org. Cult. 69(3). (2002), 215- 231.

Fki, L., Masmoudi, R.; Drira N. and Rival. A" An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L. cv. Deglet Nour". Plant Cell Rep. 21,(2003),517-524.

Gatica-Arias A.M., Arrieta-Espinoza G., Esquivel A.M.E. " *Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. ". J. Biotechnol., 11,(2008),1-12.

Ibraheem Y., Pinker I., and BÖhme M. "*A comparative study between solid and liquid cultures relative to callus growth and somatic embryo formation in date palm* (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Zaghlool". Emir. J. food Agric. 25(11), (2013), 883-898.

effect of headspace renewal in a Temporary Immersion bioreactor on plantain (Musa AAB) shoot proliferation and quality". Plant Cell. Tiss. Organ Cult. 84,(2006),155-163

Sané D., Aberlence- Bertossi F., Gassama-Dia Y. K., Sagna M., Trouslot M. F., Duval Y. , Borgel A. "*Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of Date Palm* (*Phoenix dactylifera* L.)". Ann Bot. 98,(2006), 301–308.

Scragg, A. H." *Large-scale plant cell culture: methods, applications and products*". Cur- rent Opinion Biotech. 3,(1992),105–109.

Snedecor, G M and Cochran, W.G. "*Statistical methods*". Iowa State Collage, Press, Amr Iowa, USA, (1967),

Tisserat B., Vandercook C.E." *Development of an automated plant culture system*". Plant Cell Tissue Organ. Cult. 5,(1985),107-117.

Tokuhara, K, Mii M " *Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of Phalaenopsis* (Orchidaceae). *In Vitro* Cell". Dev. Biol. Plant 37,(2001),457-461.

Welandar M. and Savegh A. " *A temporary immersion bioreactor method and relative product*" patent No. WO 2012044239 A1, (2012), Plant form: http:// www. plantform. se/pub/.

Zaid A., El-Korchi B. and Visser H. J. "*Commercial date palm tissue culture procedures and facility establishmen*t". In: S. M. Jain, J. M. Al-Khayri and D. V. Johnson (Eds.),(2011),137-180. Date Palm Biotechnology, Springer, Dordrecht, Netherlands.

Zouine J., El-Bellaj M., Meddich A. , Jean-Luc V. and El-Hadrami, I." *Proliferation and germination of somatic embryos from embryogenic suspension cultures in*
Phoenix dactylifera L.". Plant Cell Tiss. Org. Cult. 82,(2005),83- 92.

Using Temporary Immersion System (TIS) for Induction of Somatic Embryos in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) 'Barehi'

[1]Ahmed Madi Waheed Al-Mayahi [2] Abdulminam Hussien Ali,
(1) Department of Plant Tissue Culture, Date Palm Research Centre, University of Basra, Basra, Iraq
(2) Cell Research Unit, Science Collage, Basrah University, Basrah, Iraq.

(Received 19/1/1437H ; accepted for publication 10/8 /1437H)

Keywords: Temporary immersion system, Date palm, Somatic embryogenesis.

Abstract. This study was conducted to evaluate the temporary immersion system (TIS) for induction of somatic embryos in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) 'Barehi' at different immersion frequency at 2, 5 and 8 minute every 8 and 12 hours.
Two minutes immersion every 8 hours for 10 weeks culturing period significantly increased the numbers of somatic embryos (112) and their fresh weight (1.843g) as compared with solid culture at 27 and 0.953g, respectively. Moreover , a high frequency of normal formed of somatic embryos, their length and diameter rate and high level of starch content were recorded on embryogenic callus grown on TIS as compared with solid medium.