مقارنة تطبيقية لعوامل تعقيم مختلفة على الملوثات السطحية في أجنة نخلة التمر (*Phoenix dactylifera* L.) المزروعة خارج الجسم الحي

عبد المنعم حسين علي الموسوي
قسم علوم الحياة ،كلية العلوم ،جامعة البصرة،البصرة ، جمهورية العراق.

الملخص

فحصت فعالية بعض محاليل التعقيم (هيبوكلورات الصوديوم ،وهيبوكلورات الصوديوم المضاف لها١٠% من الكحول الأثيلي ، وهيبوكلورات الصوديوم المعدلة الرقم الهيدروجيني إلى ٦ والكحول الأثيلي ٧٠%) في التخلص من الملوثات السطحية على أجنة نخيل التمر المزروعة خارج الجسم الحي . بينت الدراسة أن افضل محلول للتعقيم هو الكحول ٧٠% حيث بلغت نسبة التلوث صفر % بينما جاء محلول الهيبوكلورات المعدل الرقم الهيدروجيني إلى ٦ في المرتبة الثانية حيث كانت نسبة التلوث ٣٣% فيما لم تظهر المحاليل الأخرى كفاءة ملحوظة في التعقيم .

المقدمة

نخلة التمر هي إحدى نباتات العائلة **Arecaceae** وهو اسم مرادف لعائلة النخيل **Palmeae** والتي تشتمل على ٢٢٥ جنساً و ٢٦٠٠ نوعاً تقريباً (مطر،١٩٩١). وتعد هذه العائلة من العوائل الضاربة في التأريخ ولعلها أقدم عوائل النباتات المزهرة حيث سجلت التنقيبات متحجرات منها يعود تأريخها إلى ما يقارب ١٢٠ مليون سنة (**Corner,**١٩٦٦).

يحقق أعتماد تقنية زراعة الأنسجة النباتية في إكثار النخيل مردودات إيجابية عديدة في إنتاج نباتات خالية من المسببات المرضية وبذلك يمكن تصديرها دون اللجوء إلى الحجر الزراعي، وتكون النباتات المنتجة بهذه الطريقة صغيرة الحجم مما يسهل عمليات الخدمة المطلوبة مقارنة بالفسائل الكبيرة الحجم. (سيد محمد ومبشر ،١٩٩١).

بدأت المحاولات الأولى للاستزراع خارج الجسم الحي في نخلة التمر بأجزاء مختلفة مستأصلة من البذور والفسائل ، فقد أعتمد العديد من الباحثين (١٩٧٠) **Schroeder** و(١٩٧٥) **Smith** و **Eeuwens &** **Black** (١٩٧٧) و(١٩٧٨) **Eeuwens** و (١٩٧٩) **Reynoledes & Murashige** و(١٩٨٣) **Mater** و الصالح وجماعته(١٩٨٦) و (١٩٨٨) **Omar** و (١٩٨٩) **Calero** الأجنة الجنسية المعزولة من البذور وأجزاء أخرى مستأصلة من البادرات الناتجة منها.بينما ركز آخرون (١٩٧٩ ,**Tisserat**) و **Sharmah *et al*** (١٩٨٤).، و (١٩٨٥) **Drira & Benbadis** و (١٩٨٦) **Mater** و الطه (١٩٨٧) و عثمان (١٩٨٧) و مطر (١٩٨٨) و (١٩٨٨) **Uta- UR- Rehman *et al*** و(١٩٨٩) **Kacker *et al*** والموسوي (١٩٩٤) و

Almari & Al-Gamdi (١٩٩٧) و العطبي،(١٩٩٨) و (١٩٩٩), Jasim و (٢٠٠١) Jasim & Ahamed, جهودهم في استئصال الأنسجة الخضرية من أصناف مختلفة من الفسائل والمتمثلة في البراعم الطرفية والجانبية والزهرية وزراعتها على أوساط متنوعة لإنتاج نباتات مطابقة وراثياً للنبات الأم.

يعد التلوث الميكروبي أحد أهم المشاكل والصعوبات التي تواجه الزراعة خارج الجسم الحي لأنسجة نخيل التمر ، وقد أستخدم محلول هايبوكلورات الصوديوم مضافاً له عامل الترطيب والانتشار كأحد العوامل الفعالة في التعقيم السطحي للتخلص من التلوث الميكروبي في معظم مختبرات الزراعة النسيجية(مطر،١٩٩١). وللحفاظ على الأنسجة المزروعة بعيداً عن التلوث فقد لجأ الباحثين إلى عدة طرق ،إذ قام الباحث (١٩٨٦) ,Mater بتجزئة البرعم الطرفي إلى أربعة أرباع ، وذلك لتقليل الخسائر الناجمة عن تلف القطعة بأكملها (البرعم الطرفي). وقد أيده في ذلك الباحثان Jasim & Ahamed (٢٠٠١), . بينما زاد الموسوي (١٩٩٤) من فعالية التعقيم نتيجة اعتماد تفريغ الهواء لإزالة الفقاعات من سطح النسيج والسماح لمحلول التعقيم بالدخول إلى مناطق أعمق من البرعم الطرفي بالإضافة إلى تقليص حجم النسيج المزروع إلى (٨ × ٣ملم) وزيادة فترة التعقيم إلى عشرين دقيقة وتقسيم البرعم الطرفي إلى أربعة أرباع .وقد أيده في ذلك العطبي(١٩٩٨). واعتقد (١٩٩١),Tisserat والباحث McCubbin *et al.* (٢٠٠٠) أن استخدام محلول هيبوكلورات الصوديوم في التعقيم لمرة واحدة غير كافي لقتل جميع المايكروبات وخصوصاً البكتريا، وان تغطيس النسيج المعقم مرة ثانية في محلول مركز من الهيبوكلورات ولمدة خمس دقائق فقط دون إجراء عملية الغسل بالماء المقطر المعقم قد خفض نسبة التلوث بالمزارع النسيجية إلى ٣٠% .كما استنتج(٢٠٠٠) McCubbin *et al.* أن استخدام مادة(Bronocid (dichlorobenzyl-alcohol بمفردها او بعد التعقيم بالهيبوكلورايت والكحول بتركيز ٨٠%غير فعالة في التعقيم إذ بلغت نسبة التلوث في المزارع النسيجية (٦٠- ٩٠%).

تهدف الدراسة الحالية إلى مقارنة كفاءة محاليل تعقيم مختلفة على الملوثات السطحية في أجنة النخيل المستأصلة من البذرة والمزروعة خارج الجسم الحي.

المواد وطرائق العمل

استئصال الأجنة الجنسية من البذور وأجراء معاملات التعقيم :

جمع محصول التمر نوع "حلاوي" من نخيل بالغ في قضاء أبي الخصيب جنوب مدينة البصرة خلال الموسم (٢٠٠١- ٢٠٠٢). فصلت البذور عن التمر و أزيل الغلاف أو الغشاء السكري الذي يحيط بالبذور .نقعت البذور في ماء مقطر لمدة خمسة أيام . استأصلت الأجنة على شكل مكعب يحتوي على جزء من الأندوسبيرم بمقدار (٢- ٣ملم) ،شكل-١. حفظت الأجنة المستأصلة بالثلاجة لحين

إجراء عملية التعقيم السطحي .جزأت الأجنة المستأصلة إلى أربعة مجا ميع وذلك لإجراء معاملات التعقيم السطحي المختلفة عليها وكالآتي:

المعاملة الأولى (السيطرة) : عقمت الأجنة المستأصلة باستخدام محلول هيبوكلورات الصوديوم بتركيز ٢٠% (حجم إلى حجم) مضافاً لها قطرتين من عامل الترطيب والانتشار **Tween ٢٠** لمدة ١٥ دقيقة ،ثم وضع الكأس الحاوي على المحلول المعقم والأنسجة داخل وعاء التجفيف **Desiccators** وفرغ الهواء باستخدام مضخة تفريغ هواء لمدة دقيقة واحدة .
(قيس الأس الهيدروجيني للمحلول المعقم وكان بمقدار ٨،وذلك لمقارنته مع محلول التعقيم في المجموعة الثالثة.)

المعاملة الثانية : عقمت الأجنة المستأصلة باستخدام محلول هيبوكلورات الصوديوم بتركيز ٢٠%(حجم إلى حجم) مضافاً أليها ١٠% من الكحول وقطرتين من عامل الترطيب والانتشار ولمدة ١٥ دقيقة دون إجراء التفريغ؛إذ يقلل الكحول من الفقاعات المتواجدة على السطح الخارجي وبذلك يزيد من كفاءة التعقيم(**Xinging & John, ١٩٩٦**).

المعاملة الثالثة: عقمت الأجنة المستأصلة بمحلول هيبوكلورات الصوديوم بتركيز ٢٠%(حجم إلى حجم) بعد أن نظم الأس الهيدروجيني للمحلول إلى ٦ ± ٠,١ وأضيف إليه قطرتين من عامل الترطيب والانتشار ولمدة ١٥ دقيقة مع التفريغ.

المعاملة الرابعة: عقمت الأجنة المستأصلة بالكحول الأثيلي تركيز ٧٠% ولمدة ٥ دقائق دون أجراء عملية التفريغ.

بعد الانتهاء من عملية التعقيم السطحي ، أخذت الكؤوس الحاوية على الأجنة ووضعت داخل غرفة الزرع النسيجي المعقمة مسبقاً بالكحول . غسلت الأجنة في جميع معاملات الهيبوكلورات بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات على التوالي لتخليصها من آثار المحلول المعقم،و لم تغسل الأجنة المعاملة بالكحول الأثيلي ٧٠% بالماء المقطر المعقم . وضعت جميع الأجنة المعاملة بمحاليل التعقيم المختلفة في صحون بتري متفرقة قطرها ٢٠سم والمعقمة مسبقاً داخل غرفة الزرع ، ثم زرع كل جنين بصورة مستقلة في وعاء زرعي (أنبوبة زجاجية) سعة ٢٠٠ X ٢٥ ملم يحتوي على ٢٥ سم^{3} من الوسط الغذائي .كررت العملية بعمل خمسة أنابيب على الأقل لكل معاملة . وبعد أجراء عملية زرع الأجنة حفظت كافة الأوعية المزروعة داخل غرفة النمو Growth chamber المنظمة على درجة حرارة ٢٥°م مع وجود ضوء شدته ١٠٠٠ لوكس وفترة ضوئية يومية مقدارها ١٦ ساعة.

تحضير الوسط الغذائي:

حضر الوسط الغذائي من أملاح مرا شيكي وسكوك (Murashige &Skoog , ١٩٦٢) وأضيفت له المواد التالية(ملغم/لتر) من الوسط الغذائي: السكروز ٣٠٠٠٠، فوسفات الصوديوم الحامضية $NaH_2Po_4.2H_2O$، الميزوأنيسيتول(Meso-inositol) ١٠٠، الثيامين – حامض الهيدروكلوريك(Thiamine-HCl) ٠,٥، مسحوق الفحم المنشط ٣٠٠٠، والآكر النقي ٨٠٠٠، أما الهرمونات الداخلة في هذا الوسط فهي البنزيل الأدنين(٦-Benzyl-adenine) ٥ملغم/لتر، والنفثالين حامض الخليك(Naphthaline acetic acid) ١٠ ملغم /لتر.نظم الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي الى ٥,٨(±٠,١) وذلك باستخدام واحد عياري من(HCl) و(NaOH) .ثم صب الوسط الغذائي في أنابيب سعة ٢٠٠ X ١٥٠ ملم وبمعدل ٢٥ سم^{3} /أنبوبة . عقم الوسط بجهاز المعقم البخاري تحت ضغط ١,٥كغم /سم^{3} ودرجة حرارة ١٢١°م.

النتائج والمناقشة

يبين(الشكل –٢) أن افضل محاليل التعقيم هو الكحول الأثيلي ٧٠% إذ بلغت نسبة التلوث صفر % ومما يذكر أن الباحث **McCubbin *et al*** (٢٠٠٠) لاحظ أن استخدام الكحول بتركيز ٨٠% لمدة (٥) دقائق قد رفع نسبة التلوث البكتيري إلى ٩٠% في أنسجة النخيل المزروعة خارج الجسم الحي ،وقد يعود سبب ذلك إلى استخدام التركيز العالي من الكحول (٨٠%). هذا واعتقد **Dodds & Robers** (١٩٨٥) أن مثل هذا التركيز لا يقتل البكتريا بصورة جيدة علاوة على أنه يخفي سبوراتها دون أن يؤدي إلى قتلها، لذلك كان استخدام التركيز ٧٠% من الكحول ملائم جداً لقتل البكتريا والفطريات وسبوراتها . لكن من الجدير ذكره، أن هذا التركيز قد سبب قتل الأجنة أيضا ولم يحصل الإنبات حتى بعد مرور أربعة أسابيع من زراعة الأجنة في الوسط الغذائي . ويأتي محلول الهيبوكلورات معدل الرقم الهيدروجيني إلى (٦) في المرتبة الثانية من حيث فعالية التعقيم حيث بلغت نسبة التلوث ٣٣% فقط مقارنة مع محلول الهيبوكلورات غير معدل الرقم الهيدروجيني(مجموعة السيطرة) حيث كانت نسبة التلوث ٧٥%. أما الإنبات فقد حصل بعد مرور أسبوع واحد فقط من زراعة الأجنة على الوسط الغذائي وواصلت نموها لحين بلوغها مرحلة النبيتات الكاملة وتؤيد هذه النتائج ما ذكره(**Behgal,**١٩٧١) من أن الهيدروكلوريدات (العامل الفعال في التعقيم) المنفصلة كلياً بعد تخفيف المحلول المركز من الهيبوكلورات تكون اقل فعالية عند الرقم الهيدروجيني (٨) فأكثر لذلك فأن تنظيم الرقم الهيدروجيني لمحلول الهيبوكلورات إلى الرقم (٦) يجعلها أكثر فعالية في التعقيم. أما محلول الهيبوكلورات المحتوي على ١٠% من الكحول لم يحقق أي نتيجة إيجابية حيث بلغت نسبة التلوث ١٠٠%. بينما توصل **Xianggan and John** (١٩٩٦) إلى استنتاج آخر، إذ أن إضافة الكحول بهذه النسبة لم يزد من فعالية التعقيم مقارنة مع استخدام التفريغ لإزالة الفقاعات من سطح النسيج. كما أن معظم نسب التلوث المسجلة في الدراسة الحالية كانت تعود إلى

الفطريات وان نسبة التلوث البكتيري كانت قليلة جداً مما يدل على إن البكتريا تتأثر بشدة بمحلول الهيبوكلورايت مقارنة مع سبورات الفطريات التي كانت مقاومة له،بينما كان تأثر سبورات الفطريات والبكتريا متساوياً عند استخدام الكحول ٧٠% ولم تظهر أي مقاومة له.

المصادر

- الصالح ،عباس حمد وصالح محسن وآمنه ذا النون الجراح ومها القاضي ،(١٩٨٦). دراسة مقارنة مورفولوجية بين البادرات الناتجة من زراعة الأجنة والبذور في نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* **L.**) . مجلة نخلة التمر ٤(٢): ١٥٣-١٦١.
- الطه، عبد الكريم (١٩٨٧) تأثير الهرمونات النباتية على أستخداث ونمو كالس نخلة التمر خارج الجسم الحي.رسالة ماجستير ،جامعة البصرة.
- العطبي ، صبيح داود(١٩٩٨) دراسة الإكثار الخضري لنخلة التمر (***Phoenix dactylifera* L.**) خارج الجسم الحي وتاثير اضافة أزهارها وبذورها على النمو في المراحل المختلفة لتكوينها الشكلي .رسالة دكتوراه ،جامعة البصرة.
- الموسوي ، عبد المنعم حسين علي (١٩٩٤) دراسة تشريحية لمراحل نشوء وتطور نسيج الكالس الى أجنة خضرية ونباتات كاملة في نخلة التمر المزروعة خارج الجسم الحي . رسالة ماجستير .جامعة البصرة.
- سيد محمد، عبد المطلب ومبشر صالح عمر(١٩٩٠) المفاهيم الرئيسية في زراعة الأنسجة والأعضاء للنبات،مطبعة دار الحكمة،جامعة الموصل.
- عثمان، حسن عبد الرزاق(١٩٨٧) تأثير الأملاح اللآعضوية والفيتامينات على نشوء ونمو كالس نخلة التمر خارج الجسم الحي، رسالة ماجستير،جامعة البصرة.
- مطر ،عبد الأمير (١٩٨٨)تاثير الاوكسين نفثالين حامض الخليك (**NAA**)والسايتوكاينين (**BA**)على تكوين الجذور العرضية ونمو الأفرع الأبطية في نباتات نخيل البلح المنتجة خارج القوارير .مجلة كلية الزراعة/جامعة الملك سعود .م(١٠) ع(٢):١٤٧-١٦٧.
- مطر ،عبد الأمير(١٩٩١). زراعة النخيل وإنتاجه. مطبعة دار الحكمة، جامعةالبصرة.

-Almari ,K.W & A.S Al-Gamdi,(1997). Micropropagation of five date palm cultivers through in vitro axillary proliferation. D.U.J.Agric.Sci. 13:55-71.

-Behagel,H.A,(1971) The pH and sterilization .In effect of sterilization on components in nutrient media ,ed.J.van Bragt.D.A.A Mossel,R.L.M.PP 117-200.

-Calero, N. (1989). Actions de radiation rougs et bleues sur I embryogenese somatique du palmeir dattier (***Phoenix dactylifera*** L.) en culture invitro et sur sateneur en leucoanthocyanes. C. R. Soc. Bio., 183:307-313.

-Corner,E.J.H(1966).The natural history of palms .Berkeley and LosAngeles:Univ.Cal.Press,U.S.A.

-Dodds, J.H and L.W. Robers (1985) Experiments in plant tissue culture. Second edition Cambridge University press. 233pp.

-Drira,N and A. Benbadis (1985). Vegetative multiplication of date palm (***Phoenix dactylifera*** L.) by reversion of in vitro cultured female flowers buds. J.plant physiol. 19(3): 227-235.

-Eeuwens, C.J (1978) effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from Coconut (***Cocos nucitera*** L.) and Date (***Phoenix dactylifera*** L.) palms cultured in vtro . Physiol.Plant.42: 1773-1788.

-Eeuwens, C.J and J. Blake (1977). Cultured of Coconut and Date palm tissue with view to vegetative propagation. Acta. Hort.78:277-286.

-Jasim, A. M. (1999). Response of different date palm cultivars to ***in vitro*** culture. Basrah-J. Agrec. Sci. 12 (2) : 9-17.

-Jasim, A. M and Ahmed A.S.,(2001) Effect of some media component on growth and somatic embryo formation and germination of date palm (***Phoenix dactylifera*** L.) cultured in vitro. Basrah Date Palm R.J 1(1): 1-7.

-Kacker,N.I; K.R.Solank; and S.P. Joshi (1989). Micropropagation of date palm (***Phoenix dactylifera*** L.) cv.(Khdrawy) using tissue culture technique .Annals of Aridzone 28(load2): 137-141.

-Mater,A.A,(1983).Plant regeneration from callus culture of (***Phoenix dactylifera*** L). Date Palm J.2:57-77.

-Mater, A.A (1986). Effect of naphthalene acetic acid and benzyl adenine on formation of adventitious roots and axillary buds in date palm plantlet produced in test tube. J. Agrec. Coll. Univ. King saud 10(2): 147-167. (In Arabic).

-McCubbin ,M.J ;A.Zaid;and J.Van Staden (2000). The effect of sterilization agents, plant growth regulators and explant type on somatic embryogensis in date palm (***Phoenix dactylifera*** L.) proceeding of the Date Palm Symposium .Namibia organized by: Ministry of Agriculture Water and Rural Development –Namibia .

-Murashige ,T.and E.Skoog(1962).A revised medium for rapid growth bioassays with Tobacco tissue culture . Physiol .Plant 15: 473-497.

-Omar, M. S (1988). Callus initiation a sexual embryogensis & plant regeneration in(***Phoenix dactylifera*** L.) Date Palm J. 6(1): 265-275.

-Reynoldes, J.F & T.Murashige (1979). Asexual embryogensis in callus culture of palms .In Vitro 15(5):383-387.

-Sharma, D. R.; S. Dawra and J. B. Chowdhary. (1984). Somatic embryogensis and plant regeneration in date palm (***Phoenix dactylifera*** L.) CV. 'Khadraui' throw tissue culture. Indian. J. Exp. Biol 22: 596-598.

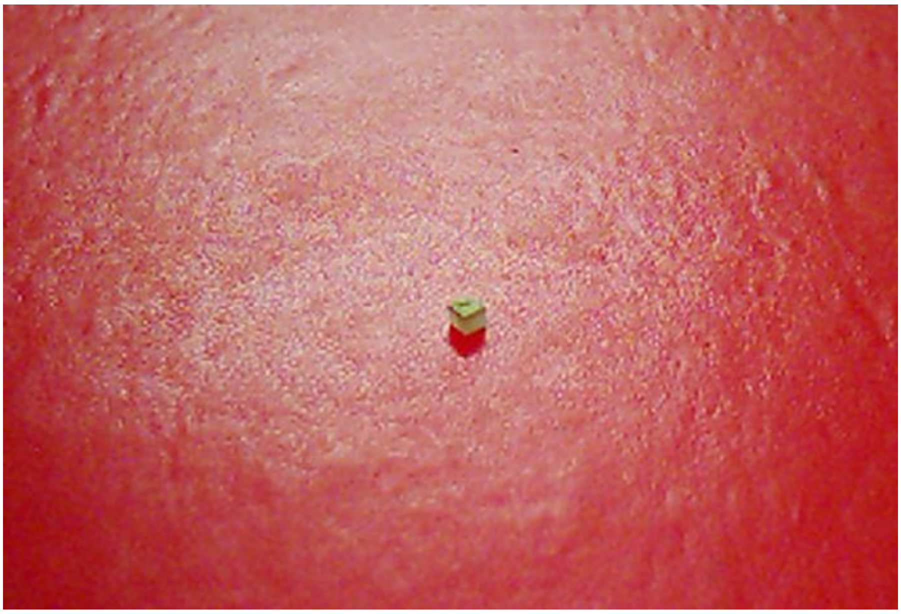
-Schroder , C.A,(1970). Tissue culture offshoot and seedling .Ann.Date Growers Inst. 47:25-27.

-Smith, S. N. (1975). Vegetative propagation of the Date palm by root tip culture. Bulletin d'Agroromie Sharienne. 1 No. 3: 67.

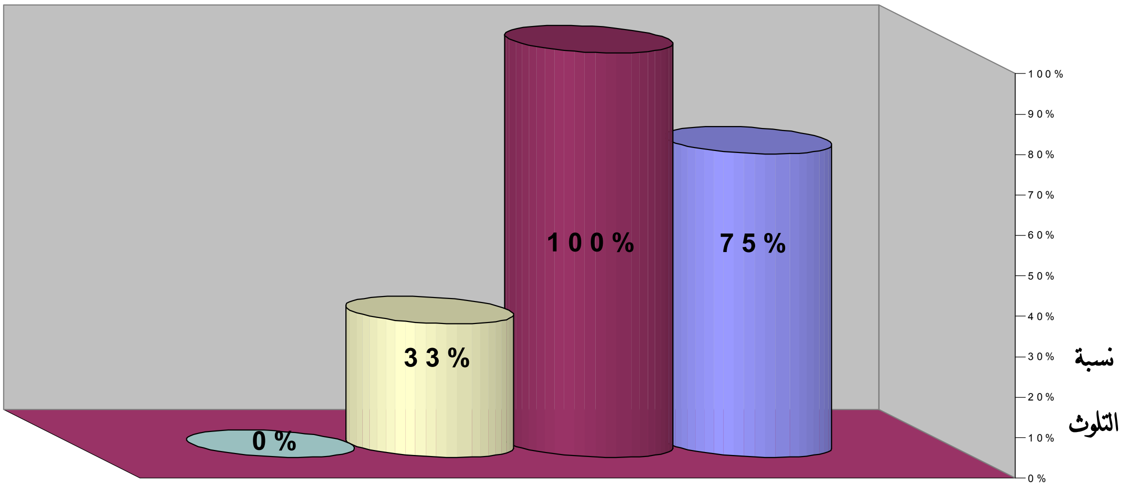
-Tisserat, B.(1979). Propagation of date palm (***Phoenix dactylifera*** L.) ***In vitro*** J. Exp.Bot. 30(19):1275-1283.

-Tisserat, B,(1991). Clonal propagation of palms. Plant tissue culture manual C_2:1-14.

-Uta-UR-Rheman,A.; H. Rashied;A.Qureshie and I.John,(1988). Effect of GA_3 on shoot proliferation in different date palm varities .Pak.J.Bot.20(2):221-225.
-Xianggan,L and G.L.John(1996).Tissue culture and plant regeneration of big cordgrass(***Spartina cynosuvides***): implication for wetland restoration .Wetlands.Vol. 16 (4):410-415.



شكل(١) استئصال الأجنة الجنسية من البذور على شكل مكعب قبل الزراعة خارج الجسم الحي



عوامل التعقيم

شكل(٢) معاملات التعقيم المختلفة على أجنة النخيل المزروعة خارج الجسم الحي

هيبوكلورات الصوديوم مع التفريغ

هيبوكلورات الصوديوم +١٠% كحول وبدون تفريغ

هيبوكلورات الصوديوم (المعدل الرقم الهيدروجيني الى٦) مع التغريغ

كحول ٧٠%

معاملات التعقيم

A Comparative Application Of Sterilizing Agents On Microbial Surface In Date Palm Embryo (*Phoenix dactylifera* L.) Cultured *In Vitro*

Abdulmunam H.Ali Almusawi
Biology Dept., Science College, Basrah University ,Basrah ,Iraq.

Abstract

The efficiency of several sterilizing agents(Sodium hypochlorite, sodium hypochlorite with 10% alcohol, sodium hypochlorite solution buffered on pH 6,and ethyl alcohol 70%) were examined to take ride of surface contamination on excised date palm embryo cultured ***in vitro*** .The study showed that the best

disinfected treatment was offered by 70% alcohol (0%) followed by sodium hypochlorite solution buffered at pH 6when the contamination was 33%. Other agents were less efficient in decontamination.