البكتريا المعزولة من الكالس المشوب ومن فسائل نخل التمر السليمة

*هديل توفيق الحديثي صبيح داود العطبي زينب جواد ماضي**

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة البصرة

الخلاصة

استهدفت الدراسة تشخيص الأجناس البكتيرية المسببة للتشوب المتمثل بظهور نمو ابيض على وحول ثلاث أنواع من عينات الكالس : البرحي والخضراوي والحلاوي وكذلك على القمم النامية لفسائل نخيل التمر السليمة عند إنمائها في وسط الزراعة النسيجية موراشيجي _ و سكوك . تم تشخيص ستة أجناس بكتيرية من التشوب الخارجي ، والمتمثل بظهور النمو البكتيري بعد مرور ٢٤–٤٨ ساعة من إنماء العينات ، وهذه الأجناس هي: *Staphylococcus* (28.8%) , *Bacillus* (33.5%) , *Serratia* (3. 6 %) , *Proteus* (12.8 %) , *Pseudomonas* (6.7 %) , *Agrobacterium* (14.4%) . عزل جنس الـ *Bacillus* لوحده في ٢٢% من العينات وجنس *Staphylococcus* أيضاً لوحده في ١٥% منها ولم يتواجد الاثنان سوية في أي من العينات . عزل الجنس *Bacillus* فقط من التشوب الداخلي ، والمتمثل بظهور النمو البكتيري بعد مرور ٤–٨ أسابيع من إنماء العينات . عند تشخيص أنواع ألـ *Bacillus* وجد انه يعود للنوعين *B.brevis , B. subtilis* في التشوب الخارجي وللنوع *B.circulans* في التشوب الداخلي كما لوحظ زيادة شدة ظهور البكتريا الداخلية في القمم النامية لفسائل نخيل التمر بزيادة سمك طبقة الجمار المحاذية للمرستيم القمي .

* مستلة من اطروحة ماجستير

المقدمة

تتطلب الزراعة النسيجية للنباتات توفر الظروف المعقمة للوسط الزرعى ولعملية الزرع ابتداء من زراعة أول نسيج مستأصل إلى آخر مرحلة وهي نقل النبيتات إلى تربة الأصص . وعلى الرغم من التطور الهائل في مجال زراعة الأنسجة النباتية ألا انه لا تزال هناك العديد من المشاكل والمعوقات التي تواجه هذه التقنية ومن أهمها التشوب بالأحياء المجهرية وخاصة إذا كان مصدر هذا التشوب هو الجزء النباتي المستخدم لإنشاء الزروعات ، إذ قد يظهر التشوب حتى بعد شهرين من إنشاء الزروعات إذا كان الجزء النباتي المستخدم للزراعة مشوبا داخليا ولا يستجيب للتعقيم السطحي (5) يعد هذا التشوب الأكثر خطورة وخاصة عند تواجد الأحياء المجهرية أو أنواعها في الأوعية والقصيبات النباتية والتي لا يتمكن حتى التعقيم الجيد من الوصول أليها .

وبناء على ما تقدم ، فان البكتريا الداخلية المتوطنة تعد مشكلة جادة تواجه الباحثين في مجال تقنية زراعة الأنسجة النباتية ؛ لذا اتجهت الأنظار للمعالجة للتخلص من هذا التشوب وتطوير الطرائق المختلفة لغرض أزالتها وتحجيم نموها (13)

أن الخطوة الأولى لمعرفة انجح الطرق للمعالجة للحصول على مزارع نسيجية خالية من التشوب تكمن في معرفة وتحديد الجنس أو الأجناس البكتيرية التي تستوطن السطوح الخارجية (7) وكذلك التي تنمو بعيدا عنها (5).لذا فان الهدف من الدراسة الحالية يشمل تشخيص الجنس أو الأجناس البكتيرية المصاحبة للكالس الناتج من زراعة انسجة نخلة التمر وكذلك من القمم النامية للفسائل السليمة

المواد وطرق العمل

جمع العينات

جمعت ١٥٧عينة كالس نخيل التمر لثلاثة أصناف : البرحي والخضراوي والحلاوي مأخوذة من فسائل نخيل التمر / أبي الخصيب في محافظة البصرة . كانت قد أصيبت هذه العينات بتشوب بكتيري بعد إنمائها في وسط الزراعة النسيجية موراشيجي وسكوك (11) المصلب بالاكار لتحفيز نشوء الكالس الأولي . توزعت العينات كآلاتي :

١- مائة عينة كالس تميزت بظهور تشوب بكتيري بعد مرور ٤٨ –٧٢ ساعة على زرع الكالس (تشوب بكتيري خارجي) ، ضمت : ٣٩ كالس صنف البرحي و ٣٦ كالس صنف الخضراوي و٢٥ كالس صنف الحلاوي .

٢-سبع وخمسون عينة كالس تميزت بظهور تشوب بكتيري بعد مرور ٤-٨ أسابيع على زرع الكالس (تشوب بكتيري داخلي) ، ضمت : ٢٧ عينة صنف البرحي و٢٤ عينة صنف الخضراوي و٦ عينات صنف الحلاوي .

اخذ ملء شراج ناقل من النمو البكتيري على قطعة الكالس ومن حولها لـــثلاث منـــاطق عشوائية ، ثم زرعت على الوسط الزرعي Complete Agar Medium (C A) (9) وبواقع مكررين لكل عينة. حضنت الأطباق بدرجة ٢٥ م لمدة ٢٤- ٤٨ ساعة .

إضافة للعينات السابقة فقد اختيرت ٩ فسائل نخيل التمر السليمة من الإصابة المرضية مثل الاصفرار او الذبول او التبقع او التنخر ، موزعة على الأصناف التالية : حلاوي (٢ فسيلة) ، زهدي (٢ فسيلة)، خستاوي(فسيلة واحدة) ، خضراوي (فسيلة واحـــدة) ،ســـاير (فسيلة واحدة) ، بريم (٢ فسيلة) ، تتراوح أعمارها ما بين ٢-٣ سنة . شـــرحت الفســـائل تصاعديا وصولا الى طرف الفرع التي تم استئصالها بسمك ٩ ملم وتعقيمها سطحيا بهايبوكلورات الصوديوم ١٠% لمدة ٢٠ دقيقة . ثم قسمت إلى أربعة أجزاء وغسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات في ظروف معقمة ، وضعت الأجزاء النباتية المستأصلة داخل الصفيحة الزجاجية المنقرة الحاوية على ١٠ تقعرات ، وضع كل ربع من أرباع القمة النامية في تقعـــر لوحـــده وســـحقت الأجزاء بوساطة قضيب زجاجي معقم مع قليل من الماء المقطر المعقم وبعد سحقها جيدا تركـــت هذه الاجزاء لمدة ٣٠ دقيقة داخل كابينة الزرع المعقمة اخذ ملء شراج ناقل من الماء المقطـــر المعقم الذي سحقت به العينات وزرع على الوسط الزرعي CA وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٢٥ م لمدة ٤٨ -٩٦. (10) .

فحصت المستعمرات النامية على الوسط الزرعى وسجلت صـــفات كـــل منهـــا واجريـــت الاختبارات التشخيصية لكل منها وشملت : صبغة كرام ، الحركة وانتاج أنزيمات الاوكســـيديز والكاتليز واليوريز ، اختبار الأكسدة والتخمر ، انتاج الاندول وكبريتيد الهايدروجيني والمثيـــل الأحمر والاستيل مثيل كاربينول واستهلاك السترات وانتاج الحامض من السكريات : الكلوكوز والزايلوز والارابينوز (8,4)

النتائج

التشوب الخارجي :

أظهرت الاختبارات التشخيصية الأولية لاجناس البكتريا المعزولة من الكالس المشوب خارجيا صورة (١) وجود اكثـــر من جنس بكتيـــري واحد (جدول ١) . سجل جـــنس

العصويات *Bacillus* أعلى نسبة مئوية (٣٣.٥%) في الأنواع الثلاثة لعينات كالس نخيل التمر، يلي ذلك جنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* وبنسبة ٢٨,٨% ثم الـ *Agrobacterium* (١٤,٤%) والـ *Pseudomonas* (١٢,٨%) اما جنسي الـ *Proteus* والـ *Serratia* فقد سجلا أوطأ نسبة (٦,٧% و٣,٦% على التوالي) .

عزل جنس الـ *Bacillus* لوحده من ٢٢% من عينات الكالس المشوبة خارجيا ،كما عزلت الـ *Staphylococcus* لوحدها من ١٥% من عينات الكالس ولم يسجل وجودهما معا في أي من العينات .

التشوب الداخلي :

عزل جنس ال *Bacillus* لوحده من عينات الانواع الثلاثة للكالس المشوب داخليا (أي التي ظهر فيها التشوب بعد مرور ٤-٨ اسابيع من التجزئة واعادة الزرع) للاصناف البرحي والخضراوي والحلاوي (صورة رقم ٢) .وكان جنس ال *B acillus* الوحيد ايضا الذي عزل من القمة النامية لفسائل نخيل التمر السليمة من الحقل للانواع : خضراوي ، حلاوي ،زهدي .

اظهرت الاختبارات التشخيصية لانواع جنس ال *Bacillus* وجود النوعين : *B. subtilis* بنسبة ٦١,٥% والنوع *B.brevis* بنسبة ٣٨,٥% في عينات الكالس المشوبة خارجيا .

اما في عينات الكالس المشوبة داخليا والانسجة الداخلية للقمة النامية لثلاث فسائل لنخيل التمر السليمة ،من بين تسع فسائل قيد الدراسة ، فقد وجد ان جنس ال *Bacillus* يعود لنوع واحد وهو *B. circulans* . لوحظ زيادة ظهور البكتريا الداخلية في القمم النامية للفسائل السليمة بزيادة سمك طبقة الجمار المحاذية للمرستيم القمي .

المناقشة

استخدم في هذه الدراسة عينات كالس نخيل التمر المزروعة على وسط موراشيجي -سكوك الخاص بالزراعة النسيجية ،بعد ان لوحظت على الكالس الاعراض التالية : تعفن طري ، لزوجة ، تحجيم في النمو ،فضلا عن اصابته بالتشوب البكتيري الذي ظهر على شكل نمو ابيض اللون على قطعة الكالس وحولها وعلى سطح الوسط الزرعي **(5)**. فاق نمو البكتريا على نمو الكالس وقد يعود ذلك الى انه من المعروف بان نمو البكتريا اسرع بكثير من نمو الكالس فضلاً عن ان الوسط الزرعي يحوي تراكيز عالية من السكروز ،وهو مصدر كاربوني ممتاز يشجع نمو العديد من الاحياء المجهرية واهمها البكتريا . عندما تصل البكتريا او سبوراتها

الى الوسط الزرعي سواء من البيئة المحيطة محمولة بالهواء اوالماء او بفعل تواجدها في داخل قطع النبات المستأصلة **(Explant)** المراد زراعتها ، فانها تزدهر وتنمو على حساب الجزء النباتي المزروع بسبب نموها السريع وبالتالي سرعة تكاثرها (اذ ان درجة حرارة حضن المزروعات ٢٨± ١ ْم وهي ملائمة لدرجة الحرارة اللازمة لنمو البكتريا الممرضة للنبات**(7)** وبالتالي منافسته على الغذاء . فضلا عن ذلك ،فان نواتج العمليات الايضية للبكتريا قد تكون سامة للجزء النباتي مما قد يؤدي الى موته **(3)**.سجل في هذه الدراسة ستة اجناس بكتيرية مسببة للتشوب الخارجي لكالس نخيل التمر المزروع خارج الجسم الحي (جدول ١) ، وهذه النتيجة تتوافق مع ما سجله **(14)** الذين تمكنوا من عزل خمسة اجناس بكتيرية من كالس نبات ***Heliconia*** المزروع خارج الجسم الحي . لم يلاحظ في دراستنا الحالية أي تأثير لصنف الكالس على الاجناس البكتيرية المعزولة ، اذ عزلت جميع الاجناس من كل انواع الكالس باستثناء بكتريا ***Agrobacterium*** لم تعزل من كالس الحلاوي.

سجل جنس العصويات ***Bacillus*** اعلى نسبة مئوية بين الاجناس المسببة للتشوب الخارجي وبنوعين فقط وهما : ***B.brevis & B.subtilis*** وقد عزل هذين النوعين ايضا من قبل **(2)** من مزارع نخيل التمر والموز خارج الجسم الحي كان النوع ***B. circulans*** هو الوحيد الذي عزل من التشوب الداخلي للكالس ،كما عزل ايضا من القمم النامية لفسائل نخيل التمر والذي ، باعتقادنا بأن مصدره هو من داخل قطعة النسيج النباتي المستأصلة من الفسيلة الام لغرض الزراعة النسيجية ، ومما يدعم ذلك : ١- طول الفترة التي بقي فيها الوسط الزرعي موراشيجي – سكوك خاليا من التشوب (فترة ٤ –٨ اسابيع) ، اذ كما هو معروف فإن النمو البكتيري يظهر عادة خلال ٢٤ –٤٨ ساعة عند توفر الوسط الزرعي ودرجة الحرارة الملائمة . ان هذا يدل على كفاءة عملية الزرع والتعقيم مؤكدا بذلك على التعقيم الجيد للسطح الخارجي لقطعة النبات المستأصلة وكونها او الوسط الزرعي او الظروف المحيطة ليس مصدر التشوب . ٢- اتجاه النمو البكتيري ، اذ كان ممتدا من قطعة النبات المزروعة نحو سطح الوسط الزرعي ان عزل النوع البكتيري ***B. circulans*** لوحده من التشوب الداخلي يتفق مع ماوجده **(10)** وكذلك **(1)** . وقد يرجع سبب ذلك الى ان ***B. circulans*** معروفة بظاهرة التضاد **Antagonism** اذ بين **(6)** قدرة هذه البكتريا على انتاج مواد ضد ميكروبية ، كماشار **(12),** الى قابليتها على انتاج الانزيمات الحالة للخمائر والفطريات او لربما كونها الجنس

الوحيد الذى يتمكن من البقاء داخليا على شكل سبور دون تأثير على النسيج الاصلي والكالس الاولي الصلبين والمتماسكين ، ولكن بما أن الكالس يصبح هشا بعد التجزئة واعادة الزرع ، فضلا عن توفر المغذيات في الوسط الزرعي فإن نمو هذه البكتريا يتعزز ويزدهر .

جدول(١): الاجناس البكتيرية المسببة للتشوب الخارجي ونسبها المئوية في عينات كالس نخيل التمر.

مصدر العزل N	عدد العزلات الكلي	الاجناس البكتيرية المعزولة					
		Bacillus n(%)	*Staphylococcus* n(%)	*Agrobacterium* n(%)	*Psetidoomonas* n(%)	*Serratia* n(%)	*Proteus* n(%)
كالس البرحي ٣٩	٨٦	٢٨ (٧١.٨)	٢٣ (٥٨.٩)	١٦(٤١.٠)	١١ (٢٨.٢)	٥ (١٢.٨)	٣ (٧.٧)
كالس الخضراوي ٣٦	٦٢	١٩ (٥٢.٧)	١٧ (٤٧.٢)	١٢ (٣٣.٣)	٩ (٢٥)	٣ (٨.٣)	٢ (٥.٢)
كالس الحلاوي ٢٥	٤٦	١٨ (٧٢)	١٦ (٦٤)	٠	٥ (٢٠)	٥ (٢٠)	٢ (٨)
المجموع	١٩٤	٦٥ (٣٣.٥)	٥٦ (٢٨.٨)	٢٨ (١٤.٤)	٢٥ (١٢.٨)	١٣ (٦.٧)	٧ (٨.٦)

N = عدد عينات الكالس ، n = عدد العزلات ، (%) = النسبة المئوية

صورة (١): A: كالس التمر صنف البرحي مشوب خارجياً بعد ٤٨ ساعة من التجزئة واعادة الزرع.

B: كالس نخيل صنف الخضراوي مشوب خارجياً بعد ٤٨ ساعة من التجزئة واعادة الزرع.

المصادر

1-Al- Hadithi , H .T (2001) – Characterization of Bacillus circulans isolated from In Vitro cultures of Date Palm *Phoenix dactylifera* L. cv . Barhee . Iraqi J. of Bio . 1 (1) : 187 – 192 .

2-Benjama , A. (1994) . Isolation of non – pathogenic bacterial contaminants of micropropagated Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) and Banana (*Musa* sp .) in Morocco Al – Awamia , No . 85 : 89 – 96 .

3-Bhojwani , S.S. and Razdan , M.K. (1983) . Plant tissue culture . Theory and Practice .pp : 502 Elsevier pub . The Netherlands .

4-Collee , J.G.; Fraser , A.J., Marmion , B. P. and Simmon , A. (1996) . Makie and McCarteny Practical Medical Microbiology . 14th ed . p: 978 . Churchill living stone . New York.

5-Collin, H.A. and Edwads ,S. (1998) . plant cell cuiture . pp : 158 .Bios . Sci. pub .

6-Egrove , N.S. (1985) . Antibiotics A Scientific Approach . p : 154 -174 . MIR publishers . Moscow .

7-Hartmann , H.T. and Kester , D.E. (1983) . Plant Propagation Principles and Practices . 4th Ed . Preintice Hast International . Inc. London .

8-Holt, J.G.; Krieg, N.R ; Sneath, P.H.; Staley, J. T. and Williams, S.T .(1994).Bergey's Manual of Determinative Bacteriology . 9th ed .Williams Baltimore.

9-Hostford , R.M .,(1982) .White blotch incited in wheat by . *B. megaterium* cereals phytoputhology , 72 : 1453-1459 .

10-Leary , J.V.; Nelson , N . ; Tisserat , B . and Allingham , E.A. (1986) . Isolation of pathogenic *B . circulans* from callus culture and healthy offshoots of Date Palm (*Phonenix dacty lifera* L) Appl. & Env. Microbiol. Vol. 52 , No.5 , 1173 – 1176 .

11-Murashige , T . and Skoog , F. (1962). Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture . Phsiol .Plants . 15 : 473 – 497 .

12-Nakajima , H.; Noguchi , K ; Yamamoto , M . ; Aono , R. and Horioshi , K. (1993) .
Expression of an 87 – KD –ß – 1, 3- glucanase gene of *Bacillus cirulans* 1AM._1165 in *saccharomyces cerevisiae* by low – temperature incubation . Bio Sci . Biotech . Biochem . , 57(12) : 2039 – 2042 .
13-Reed , B. M., Tanprasert , P. (1995) . Detection and control of bacterial contaminants of planttissue plant tissue culture . Areview of recent literature . Plant Tissue Culture . Biotech 1: 137- 142 .
14-Shiau , Y.J; Hseu, S.H.; Wang , T.Y. and Tsay , S.H. (1998) .
ldentification and control of bacterial contamination of explants cultured *In Vitro* .J . Agric . Res. China 47(4) : 364- 376.

ISOLATED BACTERIA FROM CONTAMINATED CALLUS AND HEALTHY DATE PALM OFFSETS

Hadeel T.AL hadithi Sabeh D.ALutbi Zainab J.Madhi
Department of Biology –University of Basrah College of Science

SUMMRY

This study was conducted to determine types of bacteria contaminating three types of callus of date palm cultivars: Al – Barhee , Al- Khudrawi & Al- Hillawi ; in addition to shoot tips of offsets of date palm grown in Murashige – Skoog tissue culture medium . Six genera of bacteria were identified from contamination detected 24 –48 h. after growing cultures (External contamination) . These are : *Bacillus* (33.5%) , *Staphylococcus* (28.8%) , *Agrobacterium* (14.4%) , *Pseudomonas* (12.8%) , *Serratia* (6.7%) & *Proteus* (3.6%) . *Bacillus* was found axenically in 22% of cultures and *Staphylococcus* was also found axenically but in 15% of them ; these two genera were never isolated together from the same sample . *Bacillus* was the only genus isolated from contamination detected 4-8 weeks after growing cultures (Internal contamination) . Identification of the genus Bacillus showed the prevalence of the two species : *B.subtilis* & *B. brevis* from external contamination , and the species *B . circulans* from internal contamination .

Intensity of internal bacteria has markedly increased in shoot tips of offsets of date palm with the increase of lawyer thickness adjacent to merrshimic shoot tips.