تقييم كفاءة بعض طرائق التعقيم في الحد من تلوث الاجزاء النباتية لنخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) صنف بريم المزروعة خارج الجسم الحي

نهلة حمودي حسين ابراهيم   حسام سعدالدين محمد خيرالله
كلية الزراعة /جامعة بغداد

الخلاصة :

أجريت الدراسة الحالية بهدف تقييم كفاءة بعض طرائق التعقيم في الحد من تلوث الاجزاء النباتية لصنف النخيل بريم خارج الجسم الحي. أستخدمت أربعة أنواع من الأجزاء هي القمة النامية وبادئات الاوراق والبراعم الابطية وانسجة الجمار. اشتملت التجارب أستخدام تراكيز مختلفة من القاصرالتجاري Clorox هي (0 أو30 أو40 أو50 %) ولمدة 15 دقيقة كما جرى استخدام برمنكنات البوتاسيوم بالتراكيز (0 أو200 أو300 أو400 ملغم/ لتر) فضلا"عن استخدام التعقيم تحت التفريغ وللاوقات (10 أو15 أو20 أو25 دقيقة) . تم تقييم النتائج بحساب النسبة المئوية لتلوث الأجزاء النباتية كما تم تقييم كفاءة كل تجربة باجراء الفحص المايكروبي بطريقة العد بالاطباق القياسية Plate Standard Count (SPC) . بينت النتائج ان استخدام 50% من هايبوكلورات الصوديوم مضافا" اليها 300 ملغم /لتر من برمنكنات البوتاسيوم وتحت ظروف التفريغ الهوائي ولمدة 20 دقيقة أعطت اقل نسبة مئوية للتلوث بلغت 10 % في كل من البراعم الجانبية وانسجة الجمار فيما لم تظهر اي حالة تلوث في كل من القمة النامية وبادئات الاوراق ولم تظهر أي خلايا بكتيرية في الاجزاء المذكورة مقارنة بالبرعم الجانبي وانسجة الجمار التي بلغت اعداد الخلايا البكتيرية فيها 1.88 و0.92 log_{10}cfu على التتابع في حين بلغت النسبة المئوية لتلوث هذه الاجزاء 17.5% لكل منهما. نستنتج من النتائج أعلاه أن الطريقة المتبعة كفوءة في الحد من تلوث الاجزاء النباتية لنخيل التمر صنف بريم المزروعة خارج الجسم الحي.

Evaluate the Efficiency of Some Sterilization Methods in Reducing Expalnt's Contamination for Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Bream *in Vitro*

Nahla H. Hussein   Hussam S. M. Khierallah

Abstract:

This research was implemented to evaluate some methods for explants sterilization to reduce contamination for date palm cv. Bream. Four types of explants were used as an explants source: shoot tips, leaf primordia, axillary buds and mantel meriestems. Various concentrations of colorox (Soduim Hypochlorite) (0, 30, 40 and 50%) and potassium permanganate ($KMn0_4$) (0, 200, 300 and 400 mg/L were used for (10, 15, 20 or 25 min) under vacuum. Contamination percentage and Total Bacterial Count (TBC) were calculated. Results showed that treatment with 50% NaOCl combined with 300 mg/l $KMnO_4$ for 20 min reduced contamination to 10% in axillary buds and mantle meristems as TBC recording 1.88, 0.92 log_{10} cfu respectively with 17.5% contamination for each. The TBC was zero in shoot tips and leaf primordia as bacterial

بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

ISSN 2072-3875

colonies were completely disappeared. As a conclusion, we can adopt the above results as a surface sterilization method in the micropropagation protocol of date palm cv. Bream.

المقدمة :

لعل الاكثار السلالي الواسع Clonal mass propagation هو اكثر تطبيقات زراعة الانسجة النباتية انتشارا" فهو الطريقة الملكية لاكثار النباتات خضريا كما يصفها Gautheret (1985) والتي تتم باتباع طرائق مختلفة للتمايز والتكوين الشكلي مثل تكوين البراعم العرضية وتحفيز نمو البراعم الابطية، وتحفيز نشوء الاجنة الجسمية والتي أستخدمت كطريقة للأكثار خارج الجسم الحي في اكثر من 60 نوعا"من الاشجار الخشبية ممثلة لحوالي 25 عائلة نباتية (الرفاعي والشوبكي،2002) ومن اكثر هذه العوائل فائدة للانسان هي العائلة النخيلية Arecaceae والتي تضم أكثر من 200 جنس وحوالي 4000 نوع (مطر ، 1988). وتعد الرتبة Arecae من أهم الرتب النباتية المعروفة إذ تنتسب إليها أنواع كثيرة من النخيل من ابرزها نخيل التمر(*Phoenix dactylifera* L.) (البكر، 1972). إن الاحياء الدقيقة Micro organisms المقترنة مع الجزء النباتي في طبقاته الخارجية أوالداخلية هي السبب الرئيس لتلوث الزراعة النسيجية، اذ تم عزل اكثر من 129 نوعا" بكتيريا" يعود لـ 54 جنسا" من النسيج الداخلي لنبات سليم ومن اكثر الاجناس الشائعة التي عزلت *Pseudomans* ، *Bacillus* ، *Enterobacter* ، *Agrobaterium* (Mundt وHinkle، 1976 و Gardner واخرون ، 1982 و Mclnroy واخرون ، 1995 و Sturz ، 1995 و Hallmann واخرون، 1997 و Mahafee وKloepper ، 1997).

وفضلا"عن البكتريا فقد وصفت الفطريات والخمائر كملوثات لزراعة الانسجة النباتية وقد يكون مصدرها الهواء او الغبار (Boxus و Terzi ، 1987)، فخيوط الفطر من الممكن ان تغطي نسيج الزراعة بعد ايام قليلة من مرحلة النشوء. وجدت الشامسي (2006) في دراسة أستعملت فيها تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم وبرمنغنات البوتاسيوم فضلا"عن مبيد الفطريات (Aliette) وخلال مدد زمنية مختلفة(15 و20 أو25) دقيقة ان 40% من هايبوكلورات الصوديوم مضافاً اليه 3 غم/لتر مبيد الفطريات و 30% من هايبوكلورات الصوديوم مضافاً اليه 400 ملغم/لتر من برمنغنات البوتاسيوم تعد من افضل التراكيز المستعملة في مرحلتين متتاليتين للتقليل من الاعداد البكتيرية في نخيل التمر اذ بلغت قبل التعقيم 1.41 $\log_{10}$ cfu وانخفضت اعداد الخلايا البكتيرية الى 0.27 $\log_{10}$ cfu خلال 15 دقيقة و0.37 $\log_{10}$ cfu خلال 20 دقيقة واختفت الخلايا البكتيرية عند زيادة وقت التعقيم الى 25 دقيقة. واشـار Al-Khayri (2005) إلى أن القمة النامية للنخيل تغمر بالايثانول بتركيز 70% لمدة دقيقة واحدة ثم توضع في محلول يحتوي على هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1.6% يحتوي على قطرتين من Tween 20 لكل 100 مل محلول. واوضحJunaid و Khan (2009) ان خطوات التعقيم تبدأ بغمر القمة النامية بمبيد فطري Benlate بتركيز 5 غم/لتر لمدة 20 دقيقة ثم بمحلول يحتوي على القاصر التجاري بتركيز 33% لمدة 25-30 دقيقة. لذا فأن هذه الدراسة تهدف الى تقييم كفاءة بعض طرائق التعقيم في الحد من تلوث الاجزاء النباتية بهدف الحصول على مزرعة نسيجية معقمة لنخيل التمر صنف بريم.

المواد وطرائق العمل :

تم تنفيذ البحث في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابعة لقسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد وقد جرى العمل وفق المراحل التالية :

1. تحضير الاجزاء النباتية

لغرض الحصول على الاجزاء النباتية تم اختيار فسائل من الصنف بريم بعمر 2-3 سنة جلبت من احد البساتين الاهلية في قضاء الصويرة / محافظة واسط وقد روعي اختيار الفسائل من امهات نشطة وخالية من الاصابات المرضية والحشرية مظهريا"، وازيلت الاوراق (السعف) تدريجياً من قواعدها من الاسفل الى الاعلى بمسار لولبي لحين ازالة اخر ورقة محيطة بقلب الفسيلة والوصول الى القمة النامية بطول 20 سم. وعند ازالة كل ورقة تم

ISSN 2072-3875

استئصال البرعم الابطي ان وجد اذ تم اختيار البراعم بطول 0.5 – 1 سم. ونقلت القمة النامية والبراعم الابطية الى محلول مبرد مانع للاكسدة مكون من حامض الستريك بتركيز 150 ملغم / لتر وحامض الاسكوربيك بتركيز 100 ملغم / لتر معاً لحين الزراعة (Tisserat، 1981). وتم استخدام القمم النامية Shoot Tips والبراعم الابطية Axillary Buds وبادئات الاوراق Leaf Primordia وانسجة الجمار Mantel meristem كأجزاء نباتية لزراعة الأنسجة.

2. التعقيم:

اجريت عمليات التعقيم للأجزاء النباتية في منضدة الانسياب الهواء الطبقي Laminer air flow hood وفق مراحل هي:

1.2 التعقيم السطحي للاجزاء النباتية

بهدف الوصول الى افضل معاملة يمكن اتباعها للحصول على زروعات نظيفة وخالية من التلوث والتي تمثل الهدف الاساسي للمرحلة الاولى من مراحل الاكثار الدقيق والتي تدعى بمرحلة النشوء Initiation Stage. ولغرض القضاء على الملوثات السطحية للجزء النباتي المدروس اجريت ثلاثة تجارب وتم تقييم كفاءة كل تجربة باجراء الفحص المايكروبي بطريقة العد بالاطباق القياسية Plate Standard Count (SPC) وذلك بأخذ 1 غم من كل من الاجزاء النباتية المستخدمة الى الفحص المايكروبي في كل مرحلة وتم اخذ عينة لاول مرة قبل اجراء عمليات التعقيم والتي شملت على المراحل التالية :

2.2 التعقيم بمحلول المبيد الفطري Carbendazim

غمرت القمة النامية بطول 20 سم والبراعم الجانبية في محلول التعقيم المكون من المبيد الفطري Carbendazim بتركيز 1.5 غم/لتر لمدة 15 دقيقة بعدها غسلت القمة النامية والبراعم الجانبية بالماء المقطر المعقم ثم وضعت في طبق زجاجي معقم وازيلت طبقة من الاوراق الخارجية و طبقة من المنطقة السفلى والمناطق الجانبية من الجمار والمعرضة للمبيد وذلك باستخدام ملاقط وشفرات جراحية معقمة مع مراعاة تغيير الاطباق الزجاجية عند ازالة كل ورقة.

3.2 تأثير هايبوكلورات الصوديوم

اشتملت هذه التجربة على دراسة تأثير تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم NaOCl الذي مصدره القاصر التجاري كلوركس وبالتراكيز (30 أو 40 أو 50%). (حجم:حجم) مع اضافة بضعة قطرات من Tween 20 أذ جرى غمر الاجزاء النباتية في هذه المحاليل حسب التركيز ولمدة 15 دقيقة ، بعدها غسلت الاجزاء النباتية بالماء المقطر المعقم لثلاث مرات ثم أخذت عينة بوزن1 غم من كل نوع من الاجزاء النباتية المستخدمة الى الفحص المايكروبي ثم زرعت الاجزاء في الاوساط المخصصة لها . تم زراعة ثمانية مكررات لكل معاملة وبواقع انبوب اختبار لكل مكرر.

4.2 تأثير برمنكنات البوتاسيوم

اشتملت هذه التجربة على دراسة تأثير تراكيز مختلفة من برمنكنات البوتاسيوم $KMnO_4$ وهي (200 او 300 او 400 ملغم/لتر) مع اضافة بضعة قطرات من Tween 20 وجرى غمرالاجزاء النباتية في كل من هذه المحاليل ولمدة 15 دقيقة، بعدها غسلت الاجزاء النباتية بالماء المقطر المعقم لثلاث مرات ثم اخذت عينة بوزن 1 غم من كل من الاجزاء النباتية المستخدمة للفحص المايكروبي. بعدها زرعت الاجزاء في الاوساط المخصصة لها. تم زراعة ثمانية مكررات لكل معاملة وبواقع انبوب اختبار لكل مكرر.

ISSN 2072-3875

5.2 تأثير مدة التعقيم ظروف التفريغ الهوائي بالهايبوكلورات وبرمنكنات البوتاسيوم

بعد تحديد المعاملة المثلى من التجربتين السابقتين تم استخدامهما معا" في التعقيم ولمدد زمنية مختلفة وهي (10 او 15 او 20 أو 25 دقيقة) وكلاً على حدة بعدها غسلت الاجزاء النباتية بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ثم اخذت عينة بوزن 1 غم من كل من الاجزاء النباتية المستخدمة وأوقات التعقيم الثلاثة للفحص الميكروبي بعدهازرعت الاجزاء في الاوساط المخصصة لها وتم زراعة ثمانية مكررات لكل معاملة وبواقع انبوب اختبار لكل مكرر.استخدم الوسط الغذائي المكون من مجموعة املاح Murashige و Skoog ، 1962(MS) والخالي من منظمات النمولزراعة الاجزاء النباتية في تجارب التعقيم المختلفة.

6.3 الفحص الميكروبي

اخذت العينات الممثلة للاجزاء النباتية المختلفة من كل مرحلة من مراحل التعقيم اعلاه ووضعت في اكياس بولي اثيلين معقمة وتم تجنيس العينة (عمل مستحلب) وذلك بأخذ 1 غم من كل جزء نباتي ووضع في جفنة خزفية معقمة ثم اضيف المحلول المغذي الببتون Pepton اذ تم اضافة 9 مل للحصول على التخفيف العشري الاول (10^{-1}) وتم تحضير الببتون بتركيز 1 غم / لتر وتعقيمه في جهاز المؤصدة Autoclave لمدة 20 دقيقة على درجة 121˚ وضغط 1.04 كغم / سم^2. بعد ذلك تم رج العينات المهروسة في محلول الببتون ومن ثم اخذ 1 مل و 10 مل ووضعت في اطباق بلاستيكية معقمة وتم اجراء سلسلة من التخافيف العشرية Seiral dilution وتم نقل 1 مللتر من كل تخفيف الى القنينة التي تليها للحصول على التخفيفين 10^{-3} , 10^{-2} ,وتم نقل 1 مل و 10 مل من كل تخفيف الى طبق معقم (3 مكررات لكل تخفيف) ومن ثم اضافة الوسط الزرعي الاكار المغذي Nutrient Agar والذي تم تحضيره مسبقاً باذابة 28 غم في لتر ماء مقطر وعقم في جهاز المؤصدة Autoclave لمدة 15 دقيقة وثم مزجت الاطباق بصورة جيدة وذلك بتحريكها باتجاهين لضمان المجانسة. اضافة الى التخلص من الفقاعات الهوائية وتركت الاطباق في منضدة الانسياب الهواء الطبقي Laminer air flow hood التي جرت بداخلها عمليات التخفيف والزراعة لتمام التصلب ثم حضنت في الحاضنة بدرجة 35 – 37˚م لمدة 24-48 ساعة بعدها تم حساب اعداد الخلايا البكتيرية Total Bacterial Count (TBC) من كل معاملة مقدرة بـ Colony forming unit (cfu/g) وهي وحدة تكوين المستعمرات البكتيرية في الغرام الواحد وذلك حسب Marth (1978) ووفقاً للقانون التالي :

اعداد الخلايا البكتيرية = متوسط عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف

ولتبسيط الأرقام تم اعتماد اللوغاريتم للأساس 10 ($\log_{10}$) للأعداد البكتيرية لغرض تحليل البيانات احصائياً . كما تم حساب النسبة المئوية لتلوث الزروعات بعد تحضين الزروعات في الظلام الكامل لمدة 4 اسابيع من الزراعة وبدرجة حرارة 27 ± 2˚م بالاعتماد على المشاهدة العينية وعلى النحو الاتي :

$$\% \text{ للتلوث} = \frac{\text{عدد الانابيب المتلوثة}}{\text{عدد الانابيب الكلي}} \times 100$$

3- التحليل الاحصائي

تم تصميم تجارب الدراسة كتجارب عاملية باستخدام التصميم العشوائي الكامل (CRD) Completely Randomized Design وتم تحليل النتائج باستخدام البرنامج الاحصائي SAS ، 2004. وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي (Least Significan Differences) LSD وعلى مستوى احتمال 5% (الساهوكي ووهيب ، 1990).

ISSN 2072-3875

4 - النتائج والمناقشة :

4-1 تأثير تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم في اعداد الخلايا البكتيرية TBC

تبين النتائج المدرجة في جدول (1) تأثير تراكيز مختلفة من القاصر Clorox الحاوي على هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 5.25% في اعداد الخلايا البكتيرية مقدرة ($\log_{10}$ cfu) للاجزاء النباتية المختلفة المستأصلة من فسائل نخيل التمر صنف البريم. وتشير النتائج الى انخفاض اعداد الخلايا البكتيرية معنوياً بزيادة تركيز القاصر الى 30 و 40 و 50% اذ بلغ 2.99 و 2.29 و 1.50 $\log_{10}$ cfu على التتابع ويلاحظ ان اعلى معدل لاعداد الخلايا البكتيرية قبل التعقيم بلغ 3.63 $\log_{10}$ cfu . اما بالنسبة لنوع الجزء النباتي فقد اظهرت نتائج الجدول نفسه اختلافاً معنوياً في اعداد الخلايا البكتيرية فتفوقت القمة النامية التي كان معدل الاعداد فيها اقل ما يمكن وبلغ 2.05 $\log_{10}$ cfu اعلى معدل للاعداد في البرعم الجانبي اذ بلغ 2.93 $\log_{10}$ cfu والذي اختلف معنوياً عن باقي الاجزاء المستخدمة وهي بادئات الاوراق وانسجة الجمار اللذان كانا 2.76 $\log_{10}$ cfu و 2.66 على التتابع واللذان لم تختلفا عن بعضهما معنوياً. وبالنسبة للتداخل بين نوع الجزء النباتي وتركيز القاصر فيتضح ان هنالك اختلافات معنوية في اعداد الخلايا البكتيرية اذ بلغ اقل معدل لأعداد للخلايا في القمة النامية 0.85 $\log_{10}$ cfu عند التركيز 50% من القاصر. وقد تم اعتماد هذه المعاملة في المرحلة اللاحقة من تجارب التعقيم السطحي للأجزاء النباتية.

جدول (1) تأثير التعقيم بتراكيز مختلفة من القاصر التجاري Clorox لمدة 15 دقيقة في اعداد الخلايا البكتيرية TBC مقدرة (log cfu/g) للاجزاء النباتية للنخيل صنف بريم المزروعة خارج الجسم الحي.

Clorox %	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
0	3.52	3.98	3.40	3.60	3.63
30	2.50	2.92	3.32	3.22	2.99
40	1.35	2.22	2.76	2.82	2.29
50	0.85	2.61	1.55	1.00	1.50
المعدل	2.05	2.93	2.76	2.66	

قيمة LSD : 0.05 للاجزاء النباتية = 0.26 للتراكيز = 0.26 للتداخل = 0.52

4-2 تأثير تراكيز مختلفة من برمنكنات البوتاسيوم في الاعداد البكتيرية TBC

يتضح من الجدول (2) تأثير اضافة تراكيز مختلفة من برمنكنات البوتاسيوم الى محلول التعقيم الحاوي على 50% من القاصر Clorox في اعداد الخلايا البكتيرية اذ يلاحظ اختلاف اعداد الخلايا البكتيرية النامية باختلاف تراكيز البرمنكنات واعطى التركيز 400 ملغم / لتر اعلى معدل لاعداد الخلايا البكتيرية بلغ 1.83 $\log_{10}$ cfu وتفوق معنوياً على باقي التراكيز وهي 0 و 200 و 300 ملغم / لتر وكانت 1.50 و 1.01 و 0.50 $\log_{10}$ cfu على التتابع. وفيما يخص الاجزاء النباتية اعطت انسجة الجمار وبادئات الاوراق والقمم النامية معدل اعداد بلغت 1.38 و0.94 و 0.50 $\log_{10}$ cfu على التتابع. أما البرعم الجانبي فاعطى اعلى معدل لاعداد الخلايا البكتيرية النامية بلغ 2.01 $\log_{10}$ cfu. اما التداخل بين تراكيز البرمنكنات ونوع الجزء النباتي فقد كان معنوياً في تأثيره في اعداد الخلايا البكتيرية اذ اعطت القمة النامية وبادئات الاوراق افضل النتائج عند التركيز 300 ملغم / لتر برمنكنات اذ لم يلاحظ أي نمو بكتيري في الاوساط الغذائية. وقد تم اعتماد هذه المعاملة التجارب اللاحقة للتعقيم.

ISSN 2072-3875

جدول (2) تأثيرالتعقيم بتراكيز مختلفة من برمنكنات البوتاسيوم لمدة 15 دقيقة في اعداد الخلايا البكتيرية TBC مقدرة (log cfu/g) للاجزاء النباتية للنخيل صنف بريم المزروعة خارج الجسم الحي.

$KMnO_4^-$ ملغم/لتر	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
0	0.85	2.61	1.55	1.00	1.50
200	0.52	1.61	1.00	0.92	1.01
300	0	1.24	0	0.76	0.50
400	0.70	2.58	1.20	2.82	1.83
المعدل	0.52	2.01	0.94	1.38	

قيمة LSD : 0.05 للاجزاء النباتية = 0.14 للتراكيز = 0.14 للتداخل = 0.23

3-4 تأثير التعقيم تحت ظروف التفريغ الهوائي بالهايبوكلورات وبرمنكنات البوتاسيوم في اعداد الخلايا البكتيرية TBC

اظهرت نتائج الجدول (3) تأثير مدة التعقيم تحت ظروف التفريغ الهوائي بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 50% مع 300 ملغم/لتر من برمنكنات البوتاسيوم وهي النتائج الافضل المستحصل عليها من التجارب السابقة في اعداد الخلايا البكتيرية. ويتضح من النتائج ان معدل اعداد الخلايا البكتيرية قد انخفض معنوياً بزيادة وقت التعقيم اذ اعطت المعاملة 10 دقيقة اعلى معدل لاعداد الخلايا البكتيرية بلغ 0.98 $\log_{10}$ cfu والذي اختلف معنوياً عن باقي التراكيز في حين بلغت اعداد البكتريا عند الاوقات 15 و 20 و 25 دقيقة 0.50 و 0.83 و 0.54 $\log_{10}$ cfu على التتابع. وفيما يخص الاجزاء النباتية فقد اعطى البرعم الجانبي اعلى معدل لاعداد الخلايا البكتيرية وبلغ 1.88 $\log_{10}$ cfu، واختلفت معنوياً عن انسجة الجمار اذ بلغ 0.92 $\log_{10}$ cfu فيما لم يلاحظ اي نمو بكتيري في بادئات الاوراق والقمة النامية .اما بخصوص التداخل فقد اعطى البرعم الجانبي المعقم لمدة 10 دقائق اعلى معدل لاعداد الخلايا البكتيرية وبلغ 2.57 $\log_{10}$ cfu. ويلاحظ عدم وجود أي خلايا بكتيرية عند القمة النامية وبادئات الاوراق وبغض النظر عن مدة التعقيم المستخدمة.

جدول (3) تأثير مدة التعقيم تحت التفريغ في اعداد الخلايا البكتيرية TBC مقدرة (logcfu/g) لاجزاء نباتية مختلفة لنخيل التمر صنف بريم مزروعة خارج الجسم الحي.

وقت التعقيم دقيقة	الاجزاء النباتية				المعدل
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
10	0	2.57	0	1.36	0.98
15	0	1.24	0	0.76	0.50
20	0	2.48	0	0.85	0.83
25	0	1.24	0	0.90	0.54
المعدل	0	1.88	0	0.92	

قيمة LSD : 0.05 للاجزاء النباتية = 0.20 للوقت = 0.20 للتداخل = 0.42

ISSN 2072-3875

4-4 تأثير مدة التعقيم تحت التفريغ الهوائي في النسبة المئوية لتلوث الاجزاء النباتية

اظهرت نتائج الجدول (4) تأثير مدة التعقيم تحت ظروف التفريغ الهوائي بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 50% مع 300 ملغم / لتر من برمنكنات البوتاسيوم وهي النتائج الافضل المستحصل عليها من التجارب السابقة في اعداد الخلايا البكتيرية. ويتضح من الجدول ان النسبة المئوية لتلوث الاجزاء النباتية قد انخفضت معنوياً بزيادة مدة التعقيم اذ اعطت المعاملة 10 دقيقة اعلى نسبة مئوية للتلوث وبلغت 20% ولم تختلف معنوياً عن المدة 15 دقيقة التي اعطت نسبة تلوث 10% في حين اختلفت عن المدتين 20 و 25 دقيقة واعطت نسبة تلوث 5 % لكل منهما. وفيما يخص الاجزاء النباتية فقد اعطى البرعم الجانبي وانسجة الجمار اعلى نسبة مئوية للتلوث بلغت 17.5% لكل منهما واختلفت معنوياً عن القمة النامية وبادئات الاوراق التي اعطت 2.5% لكل منهما.

جدول (4) تأثير مدة التعقيم تحت التفريغ في النسبة المئوية للتلوث لاجزاء نباتية مختلفة لنخيل التمر صنف بريم مزروعة خارج الجسم الحي.

وقت التعقيم دقيقة	الاجزاء النباتية				متوسطات الوقت
	القمة النامية	البرعم الجانبي	بادئات الاوراق	انسجة الجمار	
10	10	30	10	30	20
15	0	20	0	20	10
20	0	10	0	10	5
25	0	10	0	10	5
متوسط الاجزاء النباتية	2.5	17.5	2.5	17.5	

قيمة LSD : 0.05 للاجزاء النباتية = 7.34 للوقت = 7.34 للتداخل = 12.1

اما التداخل فقد اعطى البرعم الجانبي وانسجة الجمار المعقمة لمدة 10 دقائق اعلى نسبة مئوية للتلوث وبلغت 30% لكل منهما والتي اختلفت معنوياً عن باقي التداخلات . ويلاحظ عدم وجود أي نسبة مئوية للتلوث عند الاوقات 15 و 20 و 25 دقيقة للقمة النامية وبادئات الاوراق. لقد اظهرت نتائج التجارب الخاصة بالتعقيم امكانية الحد من التلوث الداخلي باستخدام محلول تعقيم مكون من 50% (حجم:حجم) من القاصر التجاري Clorox الحاوي على هايبوكلورات الصوديوم NaOCl و300 ملغم/لتر برمنكنات البوتاسيوم $KMnO_4^-$ مضاف اليه قطرات من Tween 20 لمدة 15 دقيقة وتحت ظروف التفريغ الهوائي. لقد اوضحت النتائج كذلك وجود نسبة من التلوث بلغت 10% في كل من القمة النامية وبادئات الأوراق بالرغم من ان نتيجة الفحص الميكروبي قد اوضحت خلوها تماماً من اي خلايا بكتيرية والسبب في ذلك يعزى الى كون مصدر التلوث لم يكن الجزء النباتي فقد يكون مصدره اوعية الزراعة او الجو الخارجي لمحيط العمل او الشخص القائم بالعملية وهذا يؤكد على ضرورة اتخاذ كل التدابير الوقائية اللازمة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية من محيط الزراعة وادوات العمل والاشخاص القائمين بعمليات التعقيم واعادة الزراعة لضمان تقليل مصادر التلوث الى ادنى حد ممكن. أن التأثير المعقم لهايبوكلورات الصوديوم في الأنسجة النباتية يعود إلى حامض الـ Hypochlorous acid (HOCl) الذي يتفكك بدوره الى حامض الهيدروكلوريك والأوكسجين الذري الذي يعد مادة مؤكسدة قوية ، إذ يتكون هذا الحامض نتيجة ذوبان الكلور بالماء كما في المعادلة (Ramawat، 2004):

$$Cl_2 + H_2O = HCl + HOCl$$

$$HOCl = HCl + [O]$$

كما ان ذوبان برمنكنات البوتاسيوم في الماء سينتج عنه ايون البرمنكنات السالب كما في المعادلة:

$$KMnO_4 = \underline{K^+} + \underline{MnO_4^-}$$

ISSN 2072-3875

وهو مادة مؤكسدة للعديد من المكونات الخلوية كالجدار الخلوي والعديد من الأنزيمات ولذلك فهو يهاجم العديد من الأحياء المجهرية كالبكتريا والفطريات والخمائر ايضا"Webber و Posselt ،1972). ان الفعل المؤكسد لكلا المادتين معا يبدو انه كان ضرورياً في احداث التعقيم المطلوب والقضاء على الأحياء المجهرية المسببة للتلوث كما ان استخدام اسلوب التفريغ الهوائي قد زاد من فعالية التعقيم وسمح للمواد المعقمة في التغلغل في المسافات البينية للخلايا والتي تكون موبوؤة عادة في انسجة نخيل التمر بالمسببات المرضية (مطر، 1988) ان اصابة الجزء النباتي بالبكتريا الداخلية الكامنة يمكن ان يسبب خسارة كبيرة في مراحل متأخرة من نشوء الزروعات (Cooke واخرون، 1994). ان اكثر الخمائر والفطريات والاحياء الدقيقة تستبعد خلال عملية التعقيم السطحي ولكن البكتريا الداخلية تنمو وتتضاعف بنجاح لانها غير معرضة لمواد التعقيم خلال المعاملة (Bun و Tan، 2002). كما اوضح Cassells (1990) ان تأخير ظهور التلوث البكتيري يعود الى وجود التانين في خلاصة عصارة النبات، والذي من الممكن ان يثبط او يؤخر نمو الاحياء الدقيقة اذ ان هناك بعض انواع البكتريا الداخلية تكون كامنة او خاملة لا تنتج أي اعراض خلال وجودها في وسط الزراعة ولا تنمو خلال دورة اعادة الزراعة، وان هناك انواعا" اخرى من البكتريا الداخلية غير خاملة يلاحظ نشوءها كهالة حول قاعدة الجزء النباتي في وسط الزراعة. ان هذه النتائج تتفق مع ما وجده أبحمان (1999) و حميد (2001) و الشامسي (2006) و Bader وآخرون (2007).

المصادر :

أبحمان، العربي. 1999. الأكثار السريع للنخيل بأستعمال الانسجة الزهرية وقائع المؤتمر الدولي عن نخيل البلح. نوفمبر1999. جامعة اسيوط- مصر ص385-388.

البكر، عبد الجبار. 1972 نخلة التمر- ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وتجارتها. مطبعة العاني. بغداد-العراق.

حميد، محمد خزعل. 2001. اكثار بعض اصناف نخيل التمر(*Phoenix dactylifera* L.) خضرياً بأستخدام تقانة زراعة الانسجة. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة، جامعة بغداد.

الرفاعي ،عبدالرحيم توفيق و الشوبكي ، سمير عبد الرزاق. 2002 .تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة الانسجة .دار الفكر العربي. مصر.

الساهوكي، مدحت ووهيب ،كريمة احمد.1990 تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.العراق.

الشامسي، موزه ناصر. 2006 . زراعة انسجة نخيل التمر أنواع التلوث وتحسين طريقة التعقيم. رسالة ماجستير علوم البيئة. جامعة الامارات العربية المتحدة.

مطر، عبد الامير مهدي .1988. تأثير الاوكسين نفثالين حامض الخليك NAA والسايتوكاينين BA على تكوين الجذورالعرضية ونمو الافرع الابطية في نبات نخيل البلح المنتجة داخل القوارير. مجلة كلية الزراعة ، جامعة الملك سعود 10 (2) ص 147-167 .

AL-Khayri, J. M. 2005. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) In:Jain S.M. and Gupta P.K. (eds.), Protocols for Somatic Embryogenesis in Woody Plant, Springer, Netherland, pp. 309-319.

Bader, S. M., Baum, M., Khierallah, H. S. M. and W. Choumane. 2007. The use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of date palm plantlets derived from *in vitro* culture of inflorescence. J. Edu. & Sci., Vol. 20(3) 149-159.

Boxus, P. H. and J. Terzi M., 1987. Big loss due to bacterial con- tamination scheme. Acta Hort., 212: 91-93.

ISSN 2072-3875

Bun, E. and B. Tan. 2002. Microbial contaminant in plant tissue culture propagation . In: Sivasithamparam K., Dixon K. W. and Barrert R.L., Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Cassells, A. C. 1990. Techniques for detection and diagnosis in plant pathology .In :Duncan J. M. and Torrance, L., London, Butterworth, 197-212.

Cook, D. L., Waites, W. M. and C. Leifert . In: Lematter S., Freigoun, S., Rudolph, and Swing J. G., (eds.),1994. Plant Pathogenic Bacteria .Versailles Cedex , INRA Editions,183-194.France.

Gardner, J. M, Feldman A.W. and Zablotowics R. M. 1982. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. Appl. Environ. Microbiol ,43 : 1335-1342.

Gautheret, R. J. 1985. History of Plant Tissue and Cell Culture: A Personal Account, In: I. K., Vasil (Ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants,Vol. 2:Cell Growth, Nutrition, Cytodiffere-ntiation and Cryopressrvation . Academic Press, Inc., Orlando, pp.1-59.

Hallmann, J. R., Rodriguez-Kabana and J.W. Kloepper, 1997. Indigenous rhizosphere and endophytic microorganisms associated with chitin –induced nematode. Suppressiveness. Nematropica (Abstr).

Junaid, A. and S. A. Khand. 2009. *In vitro* micropropagation of Khalas date palm (*Phoenix dactylifera* L.) an important fruit plant .Journal of fruit and Ornamental Plant Research Vol. 17(1):15-27.

Mahafee, W. F. and Kloepper J. W. 1997. Microbial changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza. Micro .Ecol., 12(2): 126-132.

Marth, E. H. 1978. Standard method for examination of dairy products.14 th ed.Washington , DC :Am. Pubi. Heath Assoc.

Mclnroy, J. A. and J. W. Kloepper. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant Soil 173:337-342.

Mundt, J. O. and N. F. Hinkle. 1976. Bacteria within ovules and seeds. Appl. Environ. Microbiology. 32:694-698.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Ramawat, K. G. 2004. Plant Biotechnology. Reprint of the Second Edition . S. Chand and Company. Ltd. New Delhi. India.

Struz, Av. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potao tuberization. plant soil ;175:257-263.

Tisserat. B. 1981. Date palm tissue culture. Adv. Agric Tech. Reg. Ser. 17, USDA, ARS. pp. 1-50.

Webber, W. J., Jr., and H. S. Posselt. 1972. “Disinfection.” Physicoch-emical Processes in Water Quality Control. John Wiley & Sons, New York, NY.

ISSN 2072-3875