تاثير حرارة التعقيم البخاري في بعض مكونات الوسط الغذائي MS لمزارع انسجة نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. صنف الاشقر

أسامة علي محسن العبادي
كلية التربية – جامعة ميسان
أنسام مهدي الكعبي
أوراس طارق ياسين
مركز ابحاث النخيل – جامعة البصرة

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة في مركز ابحاث النخيل – جامعه البصرة بهدف إيضاح تأثير درجات الحرارة المرتفعة المستخدمة في التعقيم البخاري Autoclaving على ثبات بعض المكونات الأساسية في مزارع أنسجة نخيل التمر صنف الاشقر وبالتالي التأثير على خصائص الكالس الجنيني . في هذة الدراسة تم تعقيم المكونات الأساسية للوسط الغذائي MS)) التي تشمل الفيتامينات (الثيامين ، البايوتين ، البايردوكسين ، حامض النيكوتين) ومنظمات النمو النباتية (الاوكسين NAA والسايتوكاينين 2ip) والمركبات العضوية الأخرى (كبريتات الادنين و ميزوانسيتول) باستعمال المرشحات الدقيقة Millipore Filters ، اذ تم حساب الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني و عدد وطول الأجنة الخضرية ومقارنتها مع تلك النتائج المستحصلة من استعمال جهاز التعقيم البخاري Autoclave في التعقيم .

اظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي في الوزن الطري والجاف للكالس الجنيني عند استعمال كلا طريقتي التعقيم .فيما تفوق الوسط الحاوي على

كبريتات الادنين و ميزوانسيتول المعقمة بالمرشحات الدقيقة على بقية المعاملات من حيث عدد الأجنة ، إذ بلغت (33.67) جنين . بينما أعطى الوسط الحاوي على الفيتامينات المعقمة بالمرشحات الدقيقة أعلى معدل لطول الأجنة وبفارق معنوي عن بقية المعاملات ، إذ بلغ (4.33) سم .

بينت النتائج انه لا يفضل تعقيم الفيتامينات ، كبريتات الادنين و ميزوانسيتول باستعمال جهاز التعقيم البخاري وإنما يفضل استعمال المرشحات الدقيقة ، فيما أظهرت منظمات النمو النباتية NAA و 2ip استقراراً تجاه درجات الحرارة المرتفعة.

المقدمة:

يعد الإكثار الخضري الدقيق لنخلة التمر كحل افضل لبعض المعوقات التي تعترض زراعة وإكثار النخيل بالطرق التقليديه وأهمها قلة عدد الفسائل وتأخر الإنتاج . إذ بالإمكان استغلال فسيلة واحدة وذلك باستئصال برعمها القمي واستخدامه كمصدر لإنتاج نسيج الكالس الجنيني القادر على التمايز differentiation الى آلاف الأجنة الخضرية ومن ثم مئات النباتات الكاملة في أوساط غذائية اصطناعية (7).

ان مكونات الوسط الغذائي المستخدم هي احد العوامل المحدده لانجاح عملية الاكثار الخضري الدقيق. ويحتاج استحداث الكالس في العديد من النباتات اضافة كميات قليلة جداً من الفيتامينات التي تعمل عاملاً مساعداً لمختلف الانظمة الانزيمية في القطع النباتية المزروعة على الاوساط النباتية الخاصة ، اذ يعد فيتامين B1(Thiamine) من المركبات المهمة التي تحتاجها معظم القطع النباتية في عملية استحداث الكالس ونموة (6). كما ان منظمات النمو النباتية الاوكسينات والسايتوكاينينات احد اهم مكونات الوسط الغذائي المؤثرة في انجاح الزراعة النسيجية ،اذ تشجع الاوكسينات نشوء

الكالس وتطورة الى اجنة خضرية وانباتها بينما تحفز السايتوكاينينات استحثاث الاجنة الجسميـــة (.(12

وفي معظم مختبرات زراعة الانسجة يتم تعقيم الاوساط الغذائية بوساطة الحرارة العالية والضغط باستعمال جهاز التعقيم البخاري autoclave ، وحديثاً استخدم جهاز المايكرويف في تعقيم البيئات خاصه في حالة الكميات الضئيلة. ومن الضروري التاكد من كفاءة اجهزة التعقيم وحساب مدة التعقيم بدقة لأن اختزال مدة التعقيم تؤدي الى قلة كفاءة التعقيم وبالتالي يحدث التلوث ،كما ان زيادة مدة التعقيم تؤدي الى انحلال العديد من مكونات البيئة خاصة منظمات النمو والفيتامينات او على الاقل تؤدي الى تحولها الى صور اخرى غير مرغوبه تؤثر على النتائج النهائية (1).

لذا ونظراً لاهمية بيئات الزراعة في مختبرات زراعة الانسجة و للجوانب العديدة التي يجب مراعاتها للحصول على بيئات معقمة وبدون اي تغير في مكوناتها، فقد هدفت هذة الدراسة لمعرفة تاثير الحرارة العالية التي تستخدم عند التعقيم بال autoclave على بعض مكونات الوسط الغذائي الخاص باكثار نخلة التمر صنف الاشقر والتي تشمل منظمات النمو (الاوكسين NAA والساتوكاينين 2ip) ، الفيتامينات ، المركبات العضوية الاخرى مثل كبريتات الادنين و ميزوانيستول.

المواد وطرائق العمل:

استخدم في هذه الدراسة الوسط الغذائي (10) (MS). اذ اضيف 10 سم ^{3} من كل مجموعة من محاليل الاملاح اللاعضوية (MS) الى 700 سم ^{3} من الماء المقطر في دورق حجمي سعة 1 لتر، ثم اضيفت المواد الآتية : السكروز (30 غم/ لتر)، ميزوانيستول (100 ملغم/ لتر) ، اورثو

فوسفات الصوديوم الحامضية (170 ملغم/ لتر) ،كبريتات الادنين (40 ملغم/ لتر) ،ثيامين (0.5 ملغم/ لتر) وفحم منشط (3 غم/ لتر) (11).

تم ضبط درجة الحموضة الى 5.7 باستخدام 1) NaOHعياري) و HCl 1)عياري) . ثم أضيف الاجار بمقدار 8 غم/ لتر وسخن الوسط الى 90 °م وبعد تجانس الوسط الغذائي وزع في أنابيب زجاجية حجم (2.5 × 18) سم وبمقدار 25 سم ^{3} لكل أنبوبة وأغلقت الأنابيب بسدادات من القطن الطبي وغُلفت بورق المنيوم وعقُمت بجهاز التعقيم البخاري autoclave بدرجة حرارة 121 °م وضغط 1.5 كغم/ لتر لمدة 15 دقيقة ، وعند انخفاض درجة حرارة الوسط الى 45 °م تم إضافة المواد قيد الدراسة وذلك بعد تعقيمها بإمرارها من خلال مرشحات بكتيرية دقيقة من نوع (Milipore filter) مسامية (0.45 مايكرومتر) ، كالاتي:

المعاملة 1: منظمات النمو وتشمل NAA و 2ip

المعاملة 2: الفيتامينات وتشمل الثيامين

المعاملة 3: المركبات العضوية الأخرى وتشمل كبريتات الادنين و ميزوانيستول

المعاملة 4: وتشمل المواد المذكوره في المعاملات 1و 2 و 3.

المعاملة 5: المقارنه (تعقيم المواد بال Autoclave)

بعد تبريد انابيب الاختبار المحتويه على الاوساط الغذائيه زرعت بـ 100 ملغم كالس جنيني محضر مسبقاً عن طريق زراعة نسيج القمة النامية لنخلة التمر صنف الاشقرولمدة 8 اشهر ، ثم حضنت داخل غرفة النمو Growth Chamber بدرجة حراره 1±27 °م وبمعدل اضاءه 16 ساعه/يوم واجريت له عمليه الزراعه الثانويه كل 6 اسابيع . وقد تم دراسة الصفات الاتيه :

1. حساب الوزن الطري للكالس الجنيني وكالاتي :

1- وزن أنبوبة أساس تحتوي على الوسط الغذائي تترك حتى نهاية التجربة دون زراعة.

2- وزن كل أنبوبة مخصصة للمعاملات مع الوسط الغذائي.

جـ- وزن كل أنبوبة مع الوسط الغذائي بعد زراعة الكالس الجنيني فيه.

د- تحسب النسبة المئوية للفقد في وزن الوسط الغذائي كالآتي:

$$\%\text{للفقد} = \frac{\text{الوزن الأول} - \text{الوزن الحالي}}{\text{الوزن الأول}} \times 100$$

هـ- يحدد الوزن الفعلي لكل أنبوبة مع المحتويات وذلك بوزن كل أنبوبة معاملة مع احتساب نسبة الفقد ،كما ياتي:

$$\text{الوزن الفعلي للأنبوبة} = \frac{\text{الوزن الحالي} \times \%\text{للفقد}}{100} + \text{الوزن الحالي}$$

و- يحسب وزن الكالس من المعادلة :

وزن الكالس = الوزن الفعلي للأنبوبة – الوزن الأول في بداية التجربة (3)

2. حساب عدد الأجنة الخضرية.

3. قياس طول الأجنة الاسطوانية.

التحليل الإحصائي:

نفذت التجربة حسب التصميم العشوائي الكامل (C.R.D) Completely Randomized Design وكررت الوحده التجريبيه ثلاث مرات واختبرت المعنوية بين المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي R.L.S.D Revised Least Significant Differences وبمستوى احتمال 5% (2).

النتائج والمناقشة:

يبين الجدولان (1) و (2) عدم وجود فروق معنوية في الوزن الطري والوزن الجاف للكالس الجنيني بين جميع المعاملات وضمنها المقارنة وذلك بعد 45 يوماً من الزراعة . إذ على الرغم من أن المعاملة (1) أعطت أعلى معدل للوزن الطري والجاف ومقداره (1.804) غم و (0.197) غم ألا أنها لم تختلف معنوياً عن المقارنة . هذة النتيجة تدل على عدم تأثر المكونات الأساسية للوسط الغذائي بدرجات الحرارة المرتفعة الناتجة عن استخدام جهاز التعقيم البخاري autoclave في التعقيم ، وهذه المكونات هي ألاوكسين NAA والسايتوكاينين 2ip في المعاملة (1) ، الفيتامينات الثيامين والبايوتين و البايرودوكسين وحامض النيكوتينك في المعاملة (2) ، كبريتات الادنين وميزوانسيتول في المعاملة (3) وجميع المكونات السابقة في المعاملة (4) ،إذ عقمت جميع هذه المكونات باستعمال المرشحات الدقيقة Millipore filters فيما تم تعقيم المقارنة باستعمال جهاز التعقيم البخاري وبدون تغيير في ظروف التحضير .

أما الجدول (3) يظهر تفوقاً معنوياً للمعاملة (3) على باقي المعاملات وبضمنها المقارنة ، إذ أعطى أعلى عدد للأجنة الخضرية وبلغ (33.67) جنين . وفي هذه المعاملة تم تعقيم كبريتات الادنين والميزوانسيتول باستعمال المرشحات الدقيقة مما يبين أن هذه المكونات يمكن ان تكون قد فقدت جزء

من فعاليتها نتيجة التعرض للحرارة العالية عند استخدام جهاز التعقيم البخاري في التعقيم ، وهذا يتوافق مع ما أشار إليه (4) من تأثر بعض مكونات الوسط الغذائي بدرجات الحرارة المرتفعة . إذ من المعروف أن الميزوانسيتول هي مادة منظمة حيوية تدخل في تركيب phospholipids والمواد البكتينية pectins في الغشاء الخلوي وفي الغشاء البلازمي ، أما كبريتات الادنين فأنها تضاف إلى الوسط لتحسن من نمو وتكون الأفرع (5). في حين يبين الجدول(4) تأثير المعاملات المختلفة على طول الأجنة الخضرية لنخيل التمر ، إذ أظهرت المعاملة (2) تفوقاً معنوياً على باقي المعاملات وبضمنها المقارنة وبلغ معدل طول الأجنة (4.333) سم فيما كان اقل طول للأجنة في معاملة المقارنة وبلغ (0.533) سم . ان المعاملة (2) تمثل الفيتامينات التي تم تعقيمها باستعمال المرشحات الدقيقة مما يبين عدم استقرار الفيتامينات تجاه الحرارة المستعملة في جهاز التعقيم البخاري. وهذا يتفق مع ما ذكره (4) من أن للفيتامينات درجات ثبات مختلفة تجاه درجات الحرارة ، لذا لا ينصح بإضافة الفيتامينات الى الوسط ثم تعقيمه بالحرارة ، و إنما ينصح بالتعقيم في درجة حرارة الغرفة باستعمال المرشحات الدقيقة . كما وجد (13) ان تسخين المحلول المائي للثيامين Thiamine-HCl إلى درجة حرارة 110°م وعند pH (5.5) أدى إلى تحطيم الفيتامين بسرعة ، كذلك يتحطم الفيتامين Calcium Pantothenate عند تعقيمه بجهاز التعقيم البخاري.

من النتائج اعلاه يمكن إن نستنتج انه لا يفضل تعقيم الفيتامينات او كبريتات الادنين والميزوانسيتول باستعمال جهاز التعقيم البخاري و إنما يفضل تعقيمها باستعمال المرشحات الدقيقة سواء كانت ذات مسامية µm0.45 أو µm 0.22 كونها تتأثر بدرجات الحرارة العالية وبالتالي تؤثر على طبيعة الكالس

الجنيني لنخيل التمر خصوصا عدد وطول الأجنة الخضرية ، لذا ينصح بتعقيم الفيتامينات خلال المرشحات ثم تضاف بالماصة إلى البيئة المعقمة الدافئة (1) .

فيما أظهرت منظمات النمو النباتية NAA و 2ip استقراراً حرارياً تجاه التعقيم بجهاز التعقيم البخاري وهذا يتفق مع ما ذكره (9) من أن NAA و IAA و D–2,4 تعتبر ثابتة حرارياً ، وبالتالي فان هذه المنظمات اكثر استقراراً من الجبرلين والزياتين وحامض الابسيسيك التي تتأثر بالحرارة العالية والتي لا يمكن تعقيمها بواسطة جهاز التعقيم البخاري (6) .

الجدول(1) تاثير المعاملات المختلفة على الوزن الطري للكالس الجنيني

المعاملات	الوزن الطري (غم)
1	1.804
2	1.566
3	1.241
4	1.668
المقارنة	1.333
R.L.S.D	لا يوجد فرق معنوي

الجدول (2) تاثير المعاملات المختلفة على الوزن الجاف للكالس الجنيني

المعاملات	الوزن الجاف (غم)

1	0.1970
2	0.1593
3	0.1617
4	0.1920
المقارنة	0.1527
R.L.S.D	لا يوجد فرق معنوي

الجدول (3) تاثير المعاملات المختلفة على عدد الاجنة الخضرية

المعاملات	عدد الاجنة
1	b 15.33
2	b 20.67
3	a 33.67
4	b 19.67
المقارنة	b 16.00
R.L.S.D	11.71

* الأحرف المختلفة تدل على وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال (0.05)

الجدول (4) تأثير المعاملات المختلفة على طول الأجنة الخضرية

المعاملات	طول الأجنة (سم)
1	b 0.866
2	a 4.333
3	b 1.000
4	b 0.700

المقارنة	b 0.533
R.L.S.D	0.62

* الأحرف المختلفة تدل على وجود فرق معنوي عند مستوى احتمال (0.05)

المصادر :

1- البحر ، محمد كمال ؛ احمد ، فؤاد عبد الرحيم و صقر ، محمود محمد (1999) التكنولوجيا الحيوية النباتية زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية . الشركة العربية للنشر والتوزيع . القاهرة . 220 ص .

2- الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ، محمد عبد العزيز (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل .488 صفحة.

3- سعد ، احمد عبد الله (2001). تاثير نوع الوسط الغذائي والسايتوكاينين في نشوء الكالس وتكون الاجنه الخضريه في نخيل التمر *Phoenix*

dactylifera L. صنف الاشقر ،رسالة ماجستير،قسم البستنه والنخيل، كلية الزراعه، جامعة البصره– العراق.

4- سلمان ، محمد عباس (1988).أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعه بغداد . 416 صفحة .

5- الكناني ، فيصل رشيد ناصر (1987). زراعة الأنسجة والخلايا النباتية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مديرية دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل . 480 صفحة.

6- محمد ، عبد المطلب سيد و عمر ، مبشر صالح (1990). المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأعضاء للنبات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، مطبعة جامعة الموصل – العراق.

7- مطر ،عبد الامير مهدي (1991). زراعة النخيل وانتاجة . مطبعه دار الحكمة ، جامعه البصرة – العراق.

8- Bragt, J.Van. and Pierik,R.L.M.(1971).The effect of autoclaving on gibberellin activity of aqueous solution containing gibberellin GA_3 . In J.Van Bragt, D.A.A.Mossel, R.L.M.Pierik and H.Veldstra (ed.) effect of sterilization on components in nutrient media , Wageningen: H. Veenman and Zonen N.V.

9- Dodds,J.H. and Roberts , L.W. (1982). Experiment in plant tissue culture. Cambridge University press. Cambridge.

10-

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). Arevised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, physiol. Plant, 15:473-497.

11- Tisserat, B. (1981). Production of free living date palm through tissue culture. Date palm J. 1(1):43-54.
12- Tisserat , B. (1991). Clonal propagation of palms. Plant Tissue Culture Manual, C2 :1-14.
13- Windholz, M. (ed)(1979). The Merck Index .An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, 9th ed , Rahway: merck.

Effect of Temperature of Autoclaving on Some Components of Medium (MS) in Date Palm Tissue Cultures *Phoenix dactylifera* L. cv. Ashkar

Usama A.M. Al-Abadi
College of Education - Missan University
Ansam M.S. Al-kaabi
Oras T. Yassein
Date Palm Research Center - Basrah University

Abstract:

This study was conducted at Tissue culture Lab. –Date Palm research Center Basrah University to elucidate the

effect of high temperature which used in sterilization by autoclaving on stability of main components in nutrient media in date palm tissue culture cv. Ashkar ,and consequently the effect on characteristics of embryogenic callus.

In this study the main components of nutrient media which include vitamins (thiamine, biotin, pyridoxine and nicotinic acid), plant growth regulators (auxin NAA and Cytokinin 2ip) and other organic compounds (Adenine sulfate and mesoinositol) were sterilized by Millipore filters and by Autoclaving.

Fresh and dry weight of embryogenic callus, number and length of somatic embryos were determined and compared to the results which obtained from using autoclave in sterilization.

The results showed there was no significant difference in fresh and dry weight of embryogenic callus between the two sterilization methods. The medium which has adenine sulfate and mesoinositol sterilized by Millipore filters showed a superior significantly compared to other treatments in term of number of somatic embryos which was (33.67) embryos, while the media which has vitamins sterilized by Millipore filters gave a highest average of embryo's length which was (4.33) cm which differs significantly than other treatments.

The results demonstrated that's unfavorable to sterilize vitamins, adenine sulfate and mesoinositol by autoclaving, while its preferable to be sterilized by Millipore filter. The plant growth regulators NAA and 2ip showed a stability toward the high temperature.