**استخدام العسل كبديل للمضادات الحيوية والتعقيم في زراعة الأنسجة النباتية**

**Use of honey in plant tissue culture technology as an alternative to antibiotics and sterilization**

**الباحثون**

**1- د. هادي عبد الجليل نعاس**

**جامعة الفرات الاوسط التقنية- الكلية التقنية/المسيب- قسم المقاومة الاحيائية**

**com.hadi@atu.edu.iq** **E.mail:**

**موبايل : 07735401413**

 **2- د.عمر حمد عبيد**

**جامعة الفرات الاوسط التقنية- الكلية التقنية/المسيب- قسم تقنيات**

**الانتاج النباتي**

**Omarobaid46@gmail.com****E.mail:**

 **موبايل : 0773401625**

 **3- د. محمد مهدي محسن**

**جامعة الفرات الاوسط التقنية- الكلية التقنية/المسيب- قسم تقنيات**

**الانتاج النباتي**

**E.mail: mohammedmehdi@atu.edu.iq**

 **موبايل:07735401654**

**4- د. صدام حكيم جياد**

**جامعة بغداد - كلية علوم الهندسة الزراعية - قسم المحاصيل الحقلية**

**E-mail:** **saddam.hakeem@coagri.uobaghdad.edu.iq**

**موبايل : 07805223908**

**1-استخدام العسل كبديل للمضادات الحيوية والتعقيم في زراعة الانسجة النباتية**

1. **الموجز**

تم اختبار فعالية العسل في الوسط الغذائي المستخدم في زراعة الأنسجة النباتية كمضاد حيوي ولإنتاج وسط مقاوم للتلوث واختبار مدى فعاليته دون المرور بمراحل التعقيم باستعمال تراكيز

(0 و2 و4 و6 و8 غم/ لتر-1) بدون استخدام الاوتوكليف و باستخدام الاوتوكليف للمقارنة، بعدها تم زراعة الأنابيب الزراعية بأجزاء نباتيه مختلفة (الكالس والبذور قمة نامية) لنبات الخروع.

أثبتت النتائج إن إضافة العسل إلى الوسط الغذائي له تأثير كبير في حفظ الوسط من التلوث بدون استخدام الاوتوكيف عند التراكيز (4 و6 و8 غم لتر-1) من العسل حيث لم يحدث أي تلوث خلال فترة الحضن إلى20) يوماً)،وهي التراكيز نفسها التي لم تتلوث بعد زراعة الأجزاء النباتية ، فيما لم تتلوث الأوساط المعقمة بالاوتوكليف على كل تراكيز العسل،أثرت التراكيز العالية في اتجاه نمو الأجزاء والأنسجة النباتية في التراكيز (6 و8 غم لتر-1) في أنبات البذور ونمو الجذور في القمة النامية وتحفيز نمو الكالس. في حين لم يظهر التركيز 4غم لتر-1تأثيرمعنوي على اتجاه النمو بالإضافة إلى كونه وسط مقاوم للتلوث.

**1- Use of honey in plant tissue culture technology as an alternative to antibiotics and sterilization**

**2- Abstract**

In this experiment, honey was tested in the medium used in plant tissue culture as an antibiotic and for the production of a medium resistant to contamination and tested its effectiveness without passing traditional sterilization stages without passing autoclave phase by use deferent concentrations of honey (0, 2, 4, 6 and 8) g/ L without use autoclave, without autoclave and then was incubation with different explants (callus, shot tip and seeds) of castor plan.

The results showed that the addition of honey to medium has a significant effect in the conservation medium of contamination without use of autoclave at the concentrations (4, 6 and 8) g/ L of honey where there was no contamination during the incubation period 20 days and in same concentrations of honey (4, 6 and 8) g/ L that have not contaminated after incubation of the explants. While the autoclaved medium did not contaminate at all the honey concentrations, the high concentrations effected in direction explants growth and tissues in the concentrations (6 and 8) g/ L failed in seed germination, rooting shoot tip growth and stimulated callus growth while concentration did not appear 4 gm/L impact on the direction of growth in addition to being a medium resistant to contamination.

1. **المفصل**
2. **المقدمة**

تعد مشكلة التلوث من المشاكل الاساسية التي تواجه زراعة الأنسجة والتي بسببها تتخذ العديد من الإجراءات من تعقيم الوسط والجزء النباتي والعديد من إجراءات التعقيم و التدابير الوقائية لنقل الجزء النباتي المعقم إلى الوسط الغذائي المعقم في أجواء خالية من المسببات المرضية (Hussein and Khierallah, 2013) كل هذا الاجراءت المعقدة والدقيقة تزيد من تكاليف الإنتاج في زراعة الانسجة، وكذلك تعد عامل مؤثر في التجارب العلمية لما للمواد المعقمة من تأثير على تضرر او تلف الجزء النباتي وعلى سير الإنتاج والتجارب العلمية، وبالرغم من كل هذه الإجراءات المكلفة لا يخلوا الكثير من المعامل والمختبرات من نسبة من التلوث، كما إن بعض الأجزاء النباتية يكون سبب التلوث داخلي لا يمكن التخلص منه بواسطة التعقيم السطحي وقد يظهر بعد عدة ايام من زراعة الجزء النباتي على الوسط الغذائي. كما ان إضافة المضادات الحيوية كان له اثر فعال في التخلص من التلوث الداخلي للأجزاء النباتية لكنه لا يشمل كل الملوثات في مقاومة هذه الحالة بالذات التلوث الداخلي للجزء النباتي أو الملوثات بعد الزراعة (McCloskey et al., 2019).

كما ان استخدام الاوتوكليف يعد خطوة مكلفة بسبب كلفة جهاز الاوتوكليف وما يحتاجه لتشغيل، بالإضافة الى خطورة العمل به، كما ان هذا الجهاز يعمل على إتلاف الكثير من المركبات الكيميائية ومنظمات النمو من خلال الحرارة العالية والضغط العالي التي تعمل على تكسيرها او تحويلها الى مركبات أخرى غير مطلوبةIbrahim,2017)) كما ان استخدام المضادات الحيوية يؤثر على نمو الأنسجة وتكوين الاجنة الجسمانية ونموها او قد يؤدي الى موتها كما قد يستمر تأثير المضادات الحيوية لمدة طويلة ([**Navdeep**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chandel%20NS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23825300)**and** [**Budinger**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Budinger%20GR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23825300)**,2013)**. لذلك اصبح البحث عن طرائق واساليب ومواد تحافظ على سلامة الانسجة النباتية من التلوث او التدهور اثناء مراحل زراعة وتنمية النسيج النباتي وتحل بديل عن المضادات الحيوية، كما ان المعقمات الكيميائية يمكنها ان تصل الى الانسجة الداخلية للجزء النباتي وتتلف الجزء النباتي من الداخل او جزء منه وهو من الامور المهمة والضرورية في نمو وتطور الجزء النباتي، وقد تم التوسع بهذا الموضوع مؤخراً عن طريق استخدام بعض الطرائق الفيزيائية كالتعقيم بالموجات الصوتية او الاشعة او استخدام الطرائق الكيميائية كاستخدام المواد ذات الاصل العضوي مثل المستخلصات النباتية التي تحوي في تركيبها على مواد لها القابلية على تطهير وتعقيم الاوساط الزراعية او منع انتشار اي اصابة جرثومية في الوسط.

ان استخدام المركبات او المواد الطبيعية التي تمتلك خواص المواد المطهرة بالإضافة الى خواص اخرى مفيدة يتحقق عن طريقها تحقيق اكثر من هدف يعد ابتكاراً وابداعاً يمكن استخدامها في مجال الزراعة النسيجية مما يسهم في تطوير العمل في هذا المجال وزيادة كفاءة وكمية الانتاج عن طريق تقليل نسب التلوث بهذه الانسجة. ويمكن ان ينطبق هذا الوصف على عسل النحل لما اثبتته العديد من الابحاث والدراسات وحتى المخطوطات القديمة اهمية استخدم العسل لعلاج الجروح المصابة منذ فترة طويلة اي قبل 2000 عام من اكتشاف البكتيريا لتكون وصف Dioscorides استخدام العسل في القضاء على الاصابات الفطرية والبكتيرية الداخلية والخارجية ،اذ توصلت العديد من الدراسات الى أن العسل له تأثير مثبط لنحو 60 نوعًا من البكتيريا بما في ذلك الأيروبينات (aerobes) والبكتريا اللاهوائية (anaerobes)، والبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (gram-positives and gram-negatives )، كما لوحظ للعسل تأثيراً مضاداً للفطريات وعلى بعض الخمائر وأنواع التابعة للـ Aspergillus و Penicillium.لذلك قد يمكن استعماله كمضاد حيوي في زراعة الانسجة وإنتاج وسط خالي من الملوثات اذا تم استعماله بالكمية والطريقة المناسبة ،وعليه هدفت هذه التجربة الى معرفة امكانية استخدام العسل كبديل للمضادات الحيوية وطرائق التعقيم التقليدية في مجال الزراعة النسيجية وتحديد افضل تركيز مضاف الى الوسط يجعله خالي من الملوثات.

**ب-الفن السابق**

يتكون العسل بالدرجة الاساس من السكر والماء ومواد اخرى مختلفة، وهو سائل سكري لزج يحتوي 95-99 ٪ من السكريات، وهي سكريات بسيطة مثل الفركتوز (38.2 ٪) والكلوكوز(31.3 ٪) ، والذي يمثل 85-95 ٪ من إجمالي السكريات (Moundoi et al., 2001). وتشكل الأحماض العضوية 0.57 ٪ من العسل وتشمل حامض الكلوكونيك وهو منتج من التحلل الأنزيمي للكلوكوز وهي المسؤولة عن حموضة العسل وتسهم إلى حد كبير في الذوق المميز. اما المعادن الموجودة في العسل فنسبتها صغيرة جدا(0.17 ٪)، وتشمل عنصر البوتاسيوم وهو الأكثر وفرة من المعادن الاخرى مثل الكالسيوم والنحاس والحديد والمنغنيز والفوسفور. وتحتوي على المركبات النيتروجينية التي من بينها الانزيمات مثل Invertase (Saccharase) وDiastase(Amylase) Glucose oxidase ، والفيتامينات مثل فيتامينC وB(Thiamine) وفيتامين B2complex و B6(Olaitan et al., 2007).

تم التعرف على الخاصية المضادة للبكتيريا من العسل لأول مرة في عام 1892 من قبل Van Ketel،اذ تجدر الاشارة الى آن اغلب أنواع العسل لها قدرة عالية على قتل الجراثيم او منع نموها وهو مضاد فعال للجراثيم الموجودة في الجروح (Dixo, 2003; Molan, 2001; Kingsley, 2001). استعمل العسل منذ العصور القديمة على نطاق واسع في المجالات الطبية ومعالجة اثار الاصابة الجرثومية وكثير من انواع الامراض الاخرى، وهذا ما أكدته الدراسات السريرية على قابلية العسل في القضاء على الجراثيم مختبريا وعلاج الجروح، بسبب الخواص الفيزيائية والكيميائية التي يمتلكها العسل ومنها درجة الحموضة والازموزية ومضادات للالتهابات(Molan, 2002). وجد ان معاملة الجروح بمحلول طبي يحتوي على العسل بتركيز 10% كان لهُ تأثيراً فعالاً في علاج الجروح وقتل الجراثيم Cooper et al. 2002)). وفي دراسة اخرى اثبتت نتائجها فعالية كبيرة للعسل في القضاء على الجراثيم الموجودة في الفم (Molan, 2001).كما أثبتت فعالية العسل في علاج التهابات المعدة بصورة خاصة والجهاز الهضمي بصورة عامة(Gharzouli et al. 2001; Bilsel et al. 2002; Aysan et al. 2002)، وفي شفاء فروة الرأس من المسببات المرضية(Al-Waili, 2001)، بالاضافة الى قدرة العسل على رفع قابلية العقل على التجذير بنسبة أكثر من 90%Federal, 2017))، كونه يعمل كهرمون طبيعي للتجذير، كما يمكنه تحفيز تكوين الكالس في التراكيز العالية (Oluwagbenga, 2015)،

تمت صياغة مصطلح "inhibine number" كمقياس للفعالية النسبية المضادة للبكتيريا في مختلف أنواع العسل ، حيث يمثل عدد الخطوات التي يمكن بها تخفيف العسل ولا تزال تمنع نمو البكتيريا (Dold et al., 1955).تتجلى أهمية للنشاط المضاد للبكتيريا في العسل للمقارنات بين الآثار العلاجية للعسل والسكر. ويرجع سبب زيادة فعالية العسل الى ان عملية تخفيفه تؤدي الى تحرير إنزيم ينتج بيروكسيد الهيدروجين(White et al., 1963). اذ يمثل بيروكسيد الهيدروجين العامل المضاد للميكروبات، وقد تم اكتشاف فعاليته المضادة للبكتيريا والمطهرة للأنسجة الحية (Turner, 1983). واعتبر من المركبات الفعالة في معالجة الالتهابات وتلف الأنسجة الحية (Salahudeen et al., 1991; Halliwell, 1994; Saissy et al., 1995).

يفرز إنزيم الكلوكوز أوكسيديز من الغدة البلعومية للنحلة إلى الرحيق للمساعدة في تكوين العسل منن الرحيق والذي ينتج عنه تكوين بيروكسيد الهيدروجين وكما في المعادلة الاتية:

Glucose + H2O + O2 \_\_\_\_ Gluconic acid + H2O2 (Al Somai et al., 1994).

ومع ذلك ، فإن تركيز بيروكسيد الهيدروجين الناتج في العسل الذي يتم تنشيطه بالتخفيف يبلغ حوالي 1 ملي مول لتر-1(Molar, 1992) ، أي حوالي 1000 مرة أقل من محلول 3٪ المستخدم عادة كمطهر. يتم تقليل الآثار الضارة لبيروكسيد الهيدروجين بشكل أكبر لأن محلول العسل له القدرة على تقييد وتعطل الحديد الحر الذي يحفز تكوين الجذور الحرة للأوكسجين التي تنتجها بيروكسيد الهيدروجين (Bunting, 2001).ومما تجدر الاشارة اليه ان نتائج كثير من الدراسات اشارت الى بيروكسيد الهيدروجين ليس العامل الوحيد المسؤول عن النشاط المضاد للبكتريا بل تم تحديد عوامل اخرى غير البيروكسيد لها مفعول مضادة للبكتيريا (Begolanov, 1984; Molan and Russel, 1988).

بالإضافة إلى ذلك ، قد يساعد محتوى العسل من الكلوكوز و pHالحامضي للوسط (عادة بين 3-4) في عمل مضادات البكتريا المعروفة باسم bacteria-destroying action Ryan and (Maino, 1977)، مما يزيد من قدرة العسل على ان تكون مضاد حيوي فعال ضد البكتريا الممرضة. ان مصادر تغذية نحل العسل ونوع الأزهار المختلفة التي يسحب منها الرحيق وحبوب اللقاح وغيرها من مصادر تغذية النحل تؤثر بشكل كبير في صفات العسل المنتج وكمية ونوعية المركبات المضادة للميكروبات الموجودة في تركيبه، اذ وجدت دراسة استقصائية شملت 345 عينة من عسل نيوزيلندا 26 مصدر مختلفة في نوعية الازهار المنتشرة فيه ان 36% من انواع العسل المفحوصة غير مطابقة لبقية مصادر العسل مما يؤكد وجود تباين بمدى فعالية العسل كمضادات حيوية تبعا لمصدره(Allen et al., 1991). كما اشارت نتائج الدراسة التي قام بها Allen et al.(2000) الى ان السلالات المقاومة للمضادات الحيوية ووجد أنها حساسة للعسل مثل السلالات الحساسة للمضادات الحيوية من النوع نفسه. وفي ضوء المعطيات السابقة جاءت فكرة هذه الدراسة لمعرفة امكانية احلال العسل بدل عملية التعقيم بالاوتوكليف كمادة مطهرة ومعقمة للوسط الزرعي للأنسجة النباتية في المختبر.

**ت-تفاصيل الفكرة**

**المواد وطرائق العمل:**

في هذه التجربة تم اختبار العسل لمقاومة التلوث او كمضاد حيوي في المزارع النسيجية باستخدام الاوتوكليف او بدون استخدام الاوتوكليف، كما تم اختبار زراعة الاجزاء النباتية لنبات الخروع (الكالس والبذور قمة نامية) على وسط غير معقم. تم الحصول على العسل من مناحل احد الاساتذة المختصين بإنتاج عسل النحل الطبيعي لضمان عدم التعرض للغش التجاري. تم إضافة العسل الى الوسط الغذائي (MS) بتراكيز مختلفة (0 و2 و4 و6 و8) غم/لتر. تم حساب نسبة التلوث للأوساط بدون استخدام الاوتوكليف بعد كل خمسة أيام وصولاً الى 20 يوماً(5 و10 و15 و20 يوماً). جرت الحسابات نفسها على الأوساط بعد التعقيم بالاوتوكليف كما أعيدت الحسابات على نسبة التلوث بعد زراعتها بالجزء النباتي، كما تم حساب نسبة التلوث بدون تعقيم الجزء النباتي وحساب مدى مقاومة الأوساط المزود بتراكيز العسل المختلفة للتلوث على فترات مختلفة.

تم استخدام طرق التعقيم التقليدية في الزراعة النسيجية حيث غمرت الاجزاء النباتية (قمم نامية وبذور) في الكحول بتركيز 70% لمدة 15 دقيقة ثم اضيف لها الهايبوكلورات بتركيز 20% لمدة 20 دقيقة(Obaid, 2018)، لم يتم تعقيم الكالس باعتباره خالي من المسببات المرضية كونه نقل من انابيب غير ملوثة.

تمت زراعة الاجزاء النباتية حسب معاملات الدراسة للأجزاء النباتية المعقمة او غير المعقمة المعقمة وكذلك الاوساط غذائية المعقمة وغير المعقمة تحت ظروف مسيطر عليها في جهاز انسياب الهواء الطبقي (Hood)، ثم حضنت الزروعات في ظروف مسيطر عليها من درجة حرارة 25±2 واضاءة 16 ساعة ضوء و8 ساعات ظلام.

تم تنمية الكالس من عقل غضة بعمر سنة واحدة اخذت من اشجار الخروع ووضعت في وقت سابق في وسط زرعي خاصة لتحفيز نمو الكالس وبعد وصول الكالس الى وزن 100 ملغم تقريباً ادخل في التجربة تحت تأثير مستويات التعقيم المختلفة. تم تقييم نمو الكالس من خلال حساب الوزن الطري بعد 28يوم من الزراعة من حساب كتلة كل كألس بواسطة ميزان حساس (خمس مراتب بعد الفارزة)، ثم تم تقدير نمو الكالس بالطرح بعد 28 يوم من الزراعة من خلال وزن الكالس مع الانبوب الزرعي ثم الانبوب الزرعي من غير كألس وحسب المعادلة الاتية:

**وزن الكالس = الانبوب الزرعي مع الكالس – وزن الانبوب من غير كألس**

وضعت بذور الخروع المحصودة في السنة نفسها مع مراعاة ان تكون متقاربة بالحجم واستبعدت البذور الشاذة، في اطباق البتري مع الاوساط الزرعية بمختلف معاملات التعقيم وتم حساب نسبة الانبات في الاطباق وتحويلها الى نسبة مئوية بحسب المعادلة الاتية:

**نسبة الانبات (%) = عدد البذور النابتة \ عدد البذور الكلي المزروع× 100.**

اما عملية حساب القمم النامية المتحفزة فتم ذلك بقطع قمم نامية من اشجار الخروع بطول 1سم، وضعت بأنابيب الاختبار حسب معاملات التجربة وحسبت القمم المتحفزة كما في المعادلة الاتية:

 **نسبة القمم النامية المتحفزة (%) = عدد القمم المتحفزة \ عدد القمم الكلي المزروعة في الوسط الزرعي×100 .**

**التحليل الاحصائي**

وزعت الوحدات التجريبية داخل المختبر على وفق تصميم تام التعشية (CRD) وبعشرة تكرارات بترتيب التجارب العاملية (بعاملين) مثل العامل الاول تراكيز العسل المستخدمة في الوسط الزرعي ، اما العامل الثاني فمثل عدد الايام لحساب نسب التلوث بالنسبة للتجربة الاولى. اما التجربة الثانية فقد تم توزيع وحداتها التجريبية وفق التصميم ذاته (CRD) وبعشرة تكرارات ولعامل مفرد. تم اختبار المتوسطات باستخدام اقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى احتمالية 0.05 (Steel et al., 1997).

**النتائج**

**التجربة الاولى : تأثير استخدام العسل في الاوساط والانسجة النباتية المعقمة وغير المعقمة.**

1. **تأثير استخدام العسل في نسب التلوث في الوسط الزرعي (MS) بدون استخدام الاوتوكليف.**

نلاحظ من نتائج الجدول (1) ان اضافة العسل ومدد الفحص والتداخل بينهما قد اثرت معنوياً في نسب التلوث للوسط الزرعي بدون استخدام الاوتوكليف.

اذ يلاحظ ان زيادة تراكيز العسل المضافة قد خفضت معنوياً من نسب التلوث لتصل الى ادنى متوسط لها (1.0%) عند التركيز 8 غم/لتر والذي لم يفرق معنوياً عن كلا التركيزين 6 و4 غم/لتر . في حين يلاحظ ان نسب التلوث كانت كاملة (100%) في الاوساط الزرعية بدون استخدام العسل (معاملة المقارنة). ويتبين من نتائج الجدول نفسه ان نسب التلوث كانت اقل ما يمكن في الخمسة ايام الاولى (20.0%)، ثم ازداد تدريجياً بمرور الوقت الى ان وصل الى اعلى نسبة له (38.8%) بعد مرور 20 يوماً.

كما تشير نتائج الجدول ان التداخل بين تراكيز العسل المضافة للوسط الزرعي ومدد الحضن قد اختلف معنوياً وان وان تراكيز العسل الاربعة (2 و4 و6 و8 غم/لتر) قد اعطت نسبة تعقيم كاملة من دون وجود تلوث بعد مرور خمسة ايام واستمر هذا الحال للتركيز 8غم/لتر الى اليوم العاشر وبقيت نسب التلوث بشكل مقبول للتركيز الاعلى من العسل الى نهاية مدة الحضن من دون ان يختلف معنوياً مع التركيزين 6 و4 غم/لتر. في حين نلاحظ ان الوسط الخالي من العسل والذي لم يمر بجهاز التعقيم الاوتوكليف قد اعطى تلوث كامل للوسط الزرعي (100%) منذ اليوم الخامس للحضن وصولاً الى اليوم العشرين.

**جدول 1)) تأثير العسل في نسبة التلوث (%) في الأوساط الزراعية خلال مدد الفحص بدون استخدام الاوتوكليف.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **عسل(غم/لتر)****H** | **زراعة النسيج بدون استخدام الاوتوكليف** | **متوسط تاثير العسل** |
| **عدد ايام الفحص (يوم) D** |
| **5** | **10** | **15** | **20** |
| **0** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| **2** | 0.0 | 20.6 | 40.6 | 80.2 | 35,4 |
| **4** | 0.0 | 6.0 | 8.0 | 8.0 | 5,5 |
| **6** | 0.0 | 2.0 | 4.0 | 4.0 | 2,5 |
| **8** | 0.0 | 0.0 | 2.0 | 2.0 | 1,0 |
| **LSD 0.05 (H×D)** | **8.7** | **LSD 0.05 (H)****7.1** |
| **متوسط مدد الفحص** | 20,0 | 25.7 | 30,9 | 38,8 |
| **LSD 0.05 (D)** | **6.6** |  |

1. **تأثير استخدام العسل في نسب التلوث في الوسط الزرعي (MS) باستخدام الاوتوكليف.**

يتبين من نتائج الجدول (2) ان اضافة العسل ومدد الفحص والتداخل بينهما قد اثرت معنوياً في نسب التلوث للوسط الزرعي باستخدام الاوتوكليف. يتضح ان كفاءة التعقيم في الاوتوكليف في كل التراكيز ثابتة لان العامل التأثير هو التعقيم بالاوتوكليف ولا وجود لتأثير تراكيز العسل ولا تأثير لعامل التلوث لإثبات كفاءة التعقيم على جميع التراكيز في نفس الظروف.

**جدول )2) تأثير العسل في نسبة التلوث في الأوساط الزراعية خلال مدد الفحص باستخدام الاوتوكليف.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **عسل(غم/لتر)****H** | **زراعة النسيج باستخدام الاوتوكليف** | **متوسط تاثير العسل** |
| **نسبة التلوث بالأيام (% / يوم) D** |
| **5** | **10** | **15** | **20** |
| **0** | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| **2** | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| **4** | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| **6** | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| **8** | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| **LSD 0.05 (H×D)** | **NS** | **LSD 0.05 (H)****NS** |
| **متوسط مدد الفحص** | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| **LSD 0.05 (D)** | **NS** |  |

**NS: لا يوجد فرق معنوي.**

3**-تأثير استخدام العسل في نسب التلوث في الوسط الزرعي (MS) باستخدام الاوتوكليف عند زراعة النسيج النباتي غير المعقم.**

نلاحظ من نتائج الجدول (3) ان اضافة العسل ومدد الفحص والتداخل بينهما قد اثرت معنوياً في نسب التلوث للوسط الزرعي باستخدام الاوتوكليف عند زراعة النسيج النباتي غير المعقم.

اذ يلاحظ ان زيادة تراكيز العسل المضافة قد خفظت معنوياً من نسب التلوث لتصل الى ادنى متوسط لها (6.4 %) عند اعلى تركيز للعسل (8 غم/لتر) ، وبفارق نسبي بلغ 92.86% مقارنة بمعاملة المقارنة التي اعطت اعلى متوسط لنسبة التلوث بلغت 89.6% .

 وتشير نتائج الجدول نفسه الى ان نسب التلوث كانت اقل ما يمكن في الخمسة ايام الاولى (46.3%)، ثم ازداد تدريجياً وبنسب بسيطة بمرور الوقت الى ان وصل الى اعلى نسبة له (61.4 %) بعد مرور 20 يوماً.كما يلاحظ من نتائج الجدول ان التداخل بين تراكيز العسل المضافة للوسط الزرعي ومدد الحضن قد تباينت معنوياً وان تركيز العسل الاعلى في الوسط الزرعي (8 غم/لتر) قد اعطى نسبة للتعقيم طيلة ايام الحضن (5 و10 و15 و20 يوماً) دون ان تختلف جميع مدد الفحص فيما بينها معنوياً. اما اعلى قيم للتلوث فهي لمعاملة المقارنة من اليوم العاشر وصولاً الى اليوم العشرين من دون ان يكون بينها اي فارق معنوي.

**جدول (3).تأثير العسل على نسبة التلوث في الأوساط الزرعية خلال مدد الفحص باستخدام الاوتوكليف بعد زراعة النسيج النباتي غير المعقم.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **عسل(غم/لتر)****H** | **زراعة النسيج النباتي غير المعقم** | **متوسط تاثير العسل** |
| **نسبة التلوث بالأيام (% / يوم) D** |
| **5** | **10** | **15** | **20** |
| **0** | 80.2 | 84.5 | 93.7 | 100 | 89.6 |
| **2** | 74.4 | 83.3 | 86.6 | 88.7 | 83.25 |
| **4** | 58.7 | 60.2 | 70.2 | 78.2 | 66.83 |
| **6** | 12.8 | 18.0 | 22.4 | 33.5 | 21.67 |
| **8** | 5.5 | 6.7 | 6.7 | 6.7 | 6.4 |
| **LSD 0.05 (H×D)** | **5,8** | **LSD 0.05 (H)****4,3** |
| **متوسط مدد الفحص** | 46,3 | 50,5 | 55,9 | 61,4 |
| **LSD 0.05 (D)** | **3,1** |  |

**4-تأثير استخدام العسل في نسب التلوث في الوسط الزرعي (MS) باستخدام الاوتوكليف عند زراعة النسيج النباتي المعقم.**

تشير نتائج الجدول (4) الى ان اضافة العسل ومدد الفحص والتداخل بينهما قد اثرت معنوياً في نسب التلوث للوسط الزرعي باستخدام الاوتوكليف عند زراعة النسيج النباتي المعقم.

اذ يتبين ان نسبة التلوث بلغت 27.0% عند معاملة المقارنة ، والتي تناقصت فيها نسب التلوث تدريجياً مع زيادة تراكيز العسل المضافة الى ان وصلت الى التعقيم الكامل (100%) دون وجود اي تلوث عند التركيز الاعلى من العسل (8 غم/لتر).ويلاحظ من نتائج الجدول (4) ان نسب التلوث كانت اقل ما يمكن في الخمسة ايام الاولى (4.1 %)، ثم ازداد تدريجياً والتي وصلت الى 4 اضعاف ما كانت عليه بعد مرور 20 يوماً اذ اعطت متوسط للتلوث بلغ 16.4%. اما نتائج التداخل فتظهر البيانات بين تراكيز العسل المضافة للوسط الزرعي ومدد الحضن قد تباينت معنوياً وان تركيز العسل الاعلى في الوسط الزرعي (8 غم/لتر) قد اعطى نسبة للتعقيم

**جدول 4)) تأثير العسل على نسبة التلوث في الأوساط الزرعية باستخدام الاوتوكليف بعد زراعة الجزء النباتي المعقم.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **عسل(غم/لتر)****H** | **زراعة النسيج النباتي غير المعقم** | **متوسط تاثير العسل** |
| **نسبة التلوث بالأيام (% / يوم) D** |
| **5** | **10** | **15** | **20** |
| **0** | 15.4 | 25.7 | 33.2 | 33.6 | 27,0 |
| **2** | 5.2 | 18.9 | 24.5 | 28.7 | 19,3 |
| **4** | 0.0 | 2.3 | 6.7 | 11.3 | 5,1 |
| **6** | 0.0 | 0.0 | 4.5 | 8.3 | 3,2 |
| **8** | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0,0 |
| **LSD 0.05 (H×D)** | **4,2** | **LSD 0.05 (H)****2.8** |
| **متوسط مدد الفحص** | 4,1 | 9,4 | 13,8 | 16,4 |
| **LSD 0.05 (D)** | **2,0** |  |

كاملة (100%) طيلة ايام الحضن (5 و10 و15 و20 يوم)، واعطت التداخلات الاخرى النسبة ذاتها كذلك (تركيز العسل 6 غم/لتر استمر الى نصف مدة الحضن الكلية، بالاضافة الى التركيز 4 غم/لتر خلال الخمسة ايام الاولى من الحضن) من دون ان تختلف جميع تلك التداخلات فيما بينها معنوياً. اما اعلى قيم للتلوث فهي لمعاملة المقارنة من اليوم الخامس عشر وصولاً الى اليوم العشرين من دون ان يكون بينها اي فارق معنوي.

**التجربة الثانية: تأثير اضافة العسل في النشاط الفسيولوجي للانسجة النباتية(الكالس والبذور قمة نامية)**.

يلاحظ من بيانات الجدول (5) ان اضافة العسل بتراكيز مختلفة قد اثر معنوياً بالنشاط الفسيولوجي للاجزاء النباتية المختلفة الداخلة في الدراسة.

اذ ادت زيادة تراكيز العسل الى حصول زيادة في كتلة الكالس المتكونة فبعد ان بلغت في معاملة المقارنة 100 ملغم نلاحظ انها قد تزايدت بنسب مختلفة وصلت نسب الزيادة فيها مقارنة بمعاملة المقارنة 19 و28 و78 % لتراكيز العسل 2 و4 و6 غم/لتر بالتتابع، الا ان نسبة الزيادة الاكثر تميزاً هي 188% عند تركيز العسل 8 غم/لتر.

كما نلاحظ اتراكيز العسل 2 و4 غم/لتر ادى الى حصول زيادة طفية ولا تفرق معنوياً عن معاملة المقارنة. في حين نلاحظ ان التركيزين 6 و8 غم/لتر قد اديا الى تثبيط الانبات بشكل كامل، الا ان من الملاحظات التي تم تسجيليها هو ان البذور عن التركيز 6غم/لتر قد ادى الى حصول انتفاخ للبذور فقط من دون حصول انبات، بينما التركيز 8 غم/لتر فقد ادى الى تحفيز تكوين الكالس من انسجة البذور المنتفخة.

**جدول (5) تأثير إضافة العسل بتراكيز مختلفة في الوسط الغذائي على الوزن الطري للكالس (ملغم) ونسب انبات البذور (%) ونسب القمم النامية المتحفزة (%).**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| تركيز العسل(غم/لتر) | الوزن الطري للكالس (ملغم) | انبات البذور(%) | القمم النامية المتحفزة (%) |
| 0 | 100 | 87 | 0 |
| 2 | 119 | 91 | 0 |
| 4 | 128 | 90 | 0.5 |
| 6 | 178 | 0 (انتفاخ البذور) | 2.5 |
| 8 | 288 | 0 (تكون كالس) | 3.5 |
| **LSD 0.05** | **17** | **13** | **0.3** |

كما تشير نتائج الجدول (5) الى ان تحفيز القمم النامية حصل عند التركيز 4 غم /لتر عسل صعوداً فبعد ان بلغت (0%) عند معاملة المقارنة والتركيز 2 غم/لتر عسل، ازدادت الى ان وصلت الى 3.5% عند التركيز الاعلى من العسل (8 غم/لتر).

**المناقشة**

يتبين من نتائج هذه الدراسة ان وجود العسل في الاوساط الزرعية غير المعقمة بالاوتوكليف قد خفض من نسب التلوث بشكل كبير مع زيادة تراكيز العسل المضافة ووصلت الى نسبة 99.99% عند تركيز العسل 8 غم/ لتر مقارنة بمعاملة القياس وهي نسبة ممتازة جداً . في حين لم يظهر تاثير للعسل في الوسط المعقم بالاوتوكليف لان جميع المعاملات لم تظهر اي نسبة للتلوث طيلة مدد الحضن.اما في حالة وضع النسيج النباتي من غير تعقيم او بعد تعقيمه فنلاحظ ان العسل قد خفض من نسب التلوث بدرجة كبيرة ايضا مع زيادة تراكيزه ليعطي اقل نسب للتلوث وصلت الى مايقارب الـ 93% للانسجة غير المعقمة و100% بالنسبة للانسجة المعقمة عند التركيز 8 غم/لتر من العسل المضاف الى الوسط مقارنة بمعاملة القياس.وهذا يدل على قابلية العسل للعمل كمضاد حيوي في تأخير تلوث الأجزاء النباتية كما ان له قابلية على منع التلوث في التراكيز العالية بحيث لم يكن إي تلوث في التراكيز (6و8 )غم/لتر بالرغم من ان الأجزاء النباتية كانت ملوثه وبالرغم من تعقيم الوسط ألا أنها لم تجدي نفعا في تجاوز التلوث.ان التأثير الكبير للعسل كمادة مطهرة ومعقمة للوسط الزرعي والانسجة النباتية قد يرجع الى مادة بيروكسيد الهيدروجين التي تتحرر عند تخفيف العسل والتي اثبتت العديد من الدراسات فعاليته المضادة للبكتيريا والمطهرة للانسجة الحية (Turner, 1983). واعتبر من المركبات الفعالة في معالجة تلوث وتلف الأنسجة الحية (Salahudeen et al., 1991; Halliwell, 1994; Saissy et al., 1995). بالاضافة الى وجود مركبات اخرى بالعسل غير البيروكسيد لها مفعول مضادة للبكتيريا (Begolanov, 1984; Molan and Russel, 1988). كما قد يساعد محتوى العسل من الكلوكوز و pHالحامضي للوسط في عمل مضادات البكتريا (Maino, 1977).

في نتائج التجربة يتبين لنا ان افضل تركيز كان 4 غم/ لتر من حيث كونه مضاد للتلوث ومن كونه غير مثبط للنمو و غير مؤثر على تحفيز انتاج الكالس كما كان له دور في تعزيز مقاومة التلوث بعد زراعة الاجزاء النباتية وتتيح هذه التقنية زراعة الاجزاء النباتية دون المرور الوسط الغذائي بمرحلة الاوتوكليف (التعقيم بالحرارة).

نلاحظ من نتائج التجربة الثانية ان كمية الكالس لم تتأثر في معاملة المقارنة في حين اثر العسل المضاف الى الوسط والتي تضاعف انتاجها الى ان الى الضعف عند التركيز 6 غم/لتر والضعفين بالتركيز 8 غم /لتر . ان الزيادة الحاصلة في وزن الكالس في التراكيز القليلة (119-128) ملغم كونها متأثرة بزيادة في كمية الكاربوهيدرات او زيادة في الطاقة، في حين لم يكن الزيادة في التركيزين الاخيرة (6 و8 )غم/لتر على معنويا (178-288) ملغم ,فهذا يدل على التأثير الهرموني للعسل (Mariola et al. 2019; Kapil et al. 2017).

كما إن نسبة الإنبات كانت طبيعية ولم تتأثر بالتراكيز القليلة للعسل حتى وصلت الى التركيز 6 غم/ لتر حيث بدأت البذور بالانتفاخ فقط في حين لوحظ تكون كالس في التركيز 8 غم/لتر قد يكون التركيز العالي للعسل قد اثر على الإنبات لكن لم يستطع ان يعمل كمحفز لتكوين الكالس في حين عمل العسل على تثبيط نمو الجنين البذري وعمل كهرمون لتكون الكالس من الاجنه(Mariola et al. 2019; Kapil et al. 2017) .

كما ان العسل يحفز تكوين الجذور تأثرت بشكل بسيط (0.5%) عند التركيز 4 غم/لتر من العسل المضاف الى الوسط الزرعي. والذي ارتفع مع زيادة تركيز العسل. وهذا يثبت ان التركيز 4 غم/لتر من العسل هو التركيز المثالي للإضافة الى الوسط كونه لا يعمل كمحفز بل يعمل كمضاد حيوي وكمقاوم للتلوث في حين عملت التراكيز العالية على تحفيز تكوين الجذور في التركيزين 6 و8 غم/ لتر والتي يمكن اعتبارها هرمونات تكون الجذور(Oluwagbenga, 2015).

1. **التطبيقات**
2. تطبق هذه التقنية في كافة الاختبارات والفحوصات البكترولوجية وفي الاوساط الزرعية المختبرية الاخرى.
3. تطبق هذه التقنية في الجامعات والمراكز البحثية.
4. تطبق هذه التقنية في مختبرات مراكز الزراعة النسيجية.
5. تطبق هذه التقنية في مختبرات الصحية لاختبارات العزل والتشخيص.
6. تطبق هذه التقنية كبديل عن التعقيم بجهاز الاوتوكليف (Autoclave ).
7. **المميزات**
8. يعد العسل من المنتجات الطبيعية المتوفرة في بلدنا ويمكن الحصول عليه بسهولة وتعد رخيصة الثمن بالتراكيز القليلة المستخدمة مقارنة بالمواد الاساسية المستخدمة في عملية التعقيم.
9. هذه الدراسة الاولى من نوعها باستخدام العسل كمضاد حيوي في التخلص من التلوث حيث لم تجدي باستخدام المضادات الحيوية التي لها تأثير تثبيطي للنمو والتحفيز وصعوبة السيطرة عليها ، كما انها تتلف بالحرارة العالية.
10. تعطي تراكيز العسل المستخدمة اكثر من فائدة ، اذ تعطي بالإضافة الى تأثيرها المطهر تأثير التحفيز لمضاعفة انتاج الكالس في الانسجة النباتية .
11. يعد استخدام العسل في الوسط الزرعي اكثر سهولة ولا تحتاج الى تدريب اضافي واجهزة تعقيم مقارنة بالطرق التقليدية.
12. برزت هذه الدراسة القدرة على التحكم بكمية العسل المضاف والتحكم بتأثيره تبعا لذلك.
13. **الادعاءات**
14. استخدام العسل كبديل للمضادات الحيوية والتعقيم في زراعة الانسجة النباتية.
15. اشارة الى عنصر الحماية رقم (1) تم اختبار صلاحية العسل كمادة معقمة ومضاد حيوي في الوسط الزرعي MS.
16. اشارة الى عنصر الحماية رقم (1) تم اختبار صلاحية تراكيز العسل كبديل للمواد المطهرة وكان التركيز 8 غم/لتر هو الافضل في تحقيق اعلى مستوى للتعقيم.
17. اشارة الى عنصر الحماية رقم (1) تم اختبار صلاحية العسل عند التركيز 4 غم/ لتر في الوسط الزرعي والذي يحقق افضل النتائج من حيث كونه مضاد للتلوث وغير مثبط للنمو ولايؤثر على تحفيز انتاج الكالس.
18. **المصادر:**

Adcock D. (1962) The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. *J Apic Res*; **1**: 38-40.

Al Somai N Coley KE Molan PC Hancock BM. (1994).Susceptility of Helicobacter pylori to the antibacterial activity of Manuka Honey. Russian Medical Journal; 87:9-12.

Allen KL, Hutchinson G, Molan PC. (2000) The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. First World WorldHealing Congress; Melbourne, Australia.

Allen KL, Molan PC, Reid GM. (1991) A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol*; **43**(12): 817-22.

Aysan E.Ayar E.Aren A. andCifter C. (2002)The role of intra - peritoneal honey administration in preventing post - operative peritoneal adhesions. Eur J ObstetGynecolReprod Biol. Sep. 10;104(2):152 – 5.

Bilsel Y Bugra D Yamaner S Bulut T Cevikbas U andTurkoglu U. (2002) Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey prednisolone and disulfiram on inflammation nitric oxide and free radical formation. Dig Surg;19(4):306 – 11.

Bogdanov S. Characterisation of antibacterial substances in honey. *LebensmWissTechnol* 1984; **17**(2): 74-6.

Bunting CM. The production of hydrogen peroxide by honey and its relevance to wound healing. MSc thesis. University of Waikato. 2001.

Cooper RA Halas E Molan PC. (2002) The efficacy of honey in inhibiting strains of Pseudomonas aeruginosa from infected burns. J Burn Care Rehabil Nov - Dec;23(6):366 – 70.

Dixon B. (2003) Bacteria can’t resist honey. Lancet Infect Dis Feb;3(2):116.

Dold H, Witzenhausen R. EinVerfahrenzurBeurteilungderrtlicheninhibitorischen (keimvermehrungshemmenden) Wirkung von HonigsortenverschiedenerHerkunft [Method of evaluation of the local inhibitory (antibacterial) substances of honeys from various origins]. *Z HygInfektionskr* 1955; **141**: 333-7.

Federal Register, ehta, P (2013) Natural homemade rooting hormones.vol. 80, no. 30, Feb. 13, 2015.

Gharzouli K GharzouliA Amira S Khennouf S. Prevention of ethanol - induced gastric lesions in rats by natural honey and glucose - fructose - sucrose - maltose mixture. Pharmacol Res 2001 May;43(5):509.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 1994; **102 Suppl 10**: 5-12.

Kapil Malik Deepshikha Birla Honey Yadav Manish SaingerDarshna Chaudhary Pawan K. Jaiwa (2017) Evaluation of Carbon Sources, Gelling Agents, Growth Hormones and Additives for Efficient Callus Induction andPlant Regeneration in Indian Wheat (*Triticumaestivum*L.) Genotypes Using Mature Embryos [Journal of Crop Science and Biotechnology](https://link.springer.com/journal/12892), 20(3): 185–192.

 Kingsley (2001), The use of honey in the treatment of infected wounds: case studies. Br J Nurs Dec;10(22 Suppl):S13 - 6 S18 S20.

Mariola DregerRafał MólAleksandra DejaEwa RajGrażyna MańkowskaKarolina Wielgus (2019) Improved plant regeneration in callus cultures of *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Volume 55, [Issue 2](https://link.springer.com/journal/11627/55/2/page/1), pp 190–198.

Molan PC (2001) Potential of honey in the treatment of wounds and burns. Am J ClinDermatol;2(1):13-9.

Molan PC, Russel KM. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *J Apic Res* 1988; **27**: 62-7.

Molan PC. (2001). The potential of honey to promote oral wellness. Gen Dent Nov - Dec;49(6):584 – 9.

Molan PC. (2002). Re - introducing honey in the management of wounds and ulcers - theory and practice. Ostomy Wound Manage Nov;48(11):28 – 40.

Molan PC. (1992) The antibacterial activity of honey. 1.The nature of the antibacterial activity. *Bee World*; **73**(1): 5-28.

Moundoi MA Padila-Zakour OI Worobo RW. (2001) Antimicrobial activity of honey against food pathogens and food spoilage microorganisms. Department of Food Sciences and Technology, Cornell University, NYSAES, W North St, Geneva, NY 14456;.1: 61-71.

Obiad, O.H. 2018. Induction of Embryogenic Callus From Matured Embryo and in Viro Selection of Abiotic Stress Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). Ph.D. Thesis Dep. Of Botany-Univ. Coll. Sci. Osmania. Hyderabad. India.

Olaitan, PB., AdelekeOE. and OlaIO.(2007) Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. African Health Sciences. 7(3): 159-165.

Oluwagbenga, D.(2015)Gabriel Ajiboye, TaiwoAdeyemo

Ryan GB, Majno G. (1977) *Inflammation*. Michigan: Upjohn.

Saissy JM, Guignard B, Pats B, Guiavarch M, Rouvier B. (1995) Pulmonary edema after hydrogen peroxide irrigation of a war wound. *Intensive Care Med*; **21**(3): 287-8.

Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. (1991) Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest*; **88**(6): 1886-93.

Steel, R. G., J. H. Torrie and D. A. Dickey .1997. Principles and Procedures of Statistics, a Biometrical Approach, McGraw Hill Book, Singapore, 3rd ed., McGraw Hill Book, Int. Co., New York, US.

Turner FJ. (1983) Hydrogen Peroxide and Other Oxidant Disinfectants (3rd ed). Philadelphia: Lea and Febiger.

White JW, Subers MH, Schepartz AI. (1963) The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *BiochimBiophysActa*; **73**: 57-70.

# [Navdeep S. Chandel](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Chandel%20NS%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23825300) and [G. R. Scott Budinger](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Budinger%20GR%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=23825300) , 2013The Good and the Bad of Antibiotics [Sci Transl Med. Jul 3; 5(192): 192fs25.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&retmode=ref&cmd=prlinks&id=23825300)

McCloskey Molly C. , Shareef Shaheen, Lesley Rabago, Matthew A. Hulverson, Ryan Choi, Lynn K. Barrett & Samuel L. M. Arnold, (2019) Evaluation of in vitro and in vivo antibiotic efficacy against a novel bioluminescent Shigella flexneri[Scientific Reports](https://www.nature.com/srep) volume 9, Article number: 13567 .