تأثير استخدام بنزوات الصوديوم ومستخلص نبات القرنفل *Syzygium aromaticum* على معدل التلوث بالفطريات ومعدلات النمو وعدد الاجنة والاسمرار لنسيج كالس نخلة التمر *Phoenix dactylifera L.* المنمى مختبريا.

لبيد عبدالله نجم
جامعة البصرة - كلية الزراعة - قسم وقاية النبات
E-Mail: la_alsaad@yahoo.com

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة إلى معرفة تأثير إضافة مادة بنزوات الصوديوم ومستخلص نبات القرنفل *Syzygium aromaticum* على معدلات التلوث بالفطريات المصاحبة لأكثار نخيل التمر *Phoenix dactylifera L.* بطريقة الزراعة النسيجية ومحاولة السيطرة على التلوث الابتدائي وكذلك معرفة مدى تأثير تلك المواد على نسيج الكالس وما هي إمكانية استخدامها كمواد حافظة. أظهرت نتائج الدراسة تلوث 75% من الوحدات التجريبية لمعاملة المقارنة بالفطريات والتي شملت *Aspergillus niger* و *Alternaria alternata* و *Ulocaldium atrum* و *Penicillium sp* و *Rhizopus sp* وبنسب ظهور 30.77% و 23.08% و 15.38% و 15.38% و 15.38% على التوالي، تفوقت بعض معاملات التجربة والتي شملت اضافة بنزوات الصوديوم بنسبة 0.5 غم/لتر و 1 غم/لتر و القرنفل بنسبة 5 غم/لتر و 10 غم/لتر في تأثيرها على نمو الفطريات حيث أدت إلى تثبيط نمو الفطريات بالكامل وحفظت نسيج الكالس طيلة فترة التجربة كما لم تؤثر هذه المعاملات معنويا على معدل عدد الأجنة ومعدل اسمرار الكالس، و لم تؤثر المعاملات بنزوات الصوديوم 0.5 غم/لتر و بنزوات الصوديوم 1 غم/لتر و قرنفل 5 غم/لتر على معدل الزيادة في وزن الكالس حيث أنها لم تختلف معنويا عن معاملة المقارنة بينما كانت هناك فروق معنوية بينها وبين معاملة القرنفل 10 غم/لتر.

المقدمة

تعد الزراعة النسيجية واحدة من أهم طرق التكاثر اللاجنسي المستخدمة في إكثار نخلة التمر والتي بدأت تنتشر بصورة واسعة في العديد من البلدان المنتجة للتمر نظراً لكفاءة هذه الطريقة العالية في إنتاج نباتات كاملة مماثلة وراثياً للأم وبأعداد كبيرة جداً نسبة للوحدة التكاثرية الواحدة ، و يعول على هذه الطريقة مستقبلاً في الإنتاج التجاري للفسائل خصوصاً للأصناف النادرة ذات الإنتاج عالي الجودة بزيادة الإنتاج والمقاومة للأمراض (6 و 8 و 11 و12) . تعتمد هذه الطريقة التكاثرية على الدقة والخبرة الفنية العالية في العمل لتلافي إفشال عملية الإكثار نتيجة للأخطاء التي قد تحدث في أية مرحلة من مراحل الإكثار والتي تسبب خسائر ليست بالقليلة بسبب الكلفة العالية للمواد والطرق المستخدمة في العملية ، ومن أهم المشاكل التي تعترض هذه العملية هو التلوث الميكروبي (Microbial contamination) والذي تسببه العديد من الأحياء المجهرية (Microorganisms) التي تعمل على إتلاف الأنسجة المزروعة أما عن طريق المواد السامة التي تفرزها أو نتيجة لقدرتها التنافسية العالية على المواد الغذائية المكونة للوسط الزرعي المستخدم لإكثار الكالس الجنيني مما يؤدي إلى حدوث هلاكات واسعة ويقلل من عدد النباتات المنتجة باستخدام الزراعة النسيجية على الرغم من عمليات التعقيم المختلفة (5 و 10 و 18 و 20) . تعد الفطريات من أهم الملوثات التي

تتعرض لها عملية إكثار الأنسجة نتيجة للحامضية العالية التي يتميز بها الوسط الزرعي المستخدم في الإكثار والذي يوفر لها بيئة ملائمة للتكاثر والنمو من خلال وفرة المواد الغذائية والـ Ph الحامضي الذي يلائم نموها وفي نفس الوقت يقلل من تنافس البكتريا التي قد لا تستطيع العيش في هذه البيئة (18 20). استخدم العديد من المواد الكيمياوية للحد من التلوث الفطري في الكثير الأوساط الغذائية شملت المبيدات والفطرية والمستخلصات النباتية وبعض المواد الكيمياوية حيث أظهر بعضها تأثيراً حافظاً خصوصاً في الأوساط الغذائية ذات البيئة الحامضية مثل مستخلص نبات القرنفل *Syzygium aromaticum* ومادة بنزوات الصوديوم وبتراكيز اختلفت حسب طبيعة الوسط وظروف التجربة (1 و 3 و 4 و 5) .

هدفت الدراسة إلى تقصي تأثير تغطيس الكالس الجنيني في تراكيز معينة من مستخلص نبات القرنفل *S. aromaticum* ومادة بنزوات الصوديوم على سرعة نموه وتطوره للتمكن من استخدامها كمواد حافظة للوقاية من تلوث الكالس الجنيني وبالتالي إعطاء فرصة أكبر لإنجاح عملية زراعة الأنسجة.

المواد وطرائق العمل

الوسط الزرعي المستخدم في الزراعة النسيجية

استخدم الوسط الزرعي المكون من إضافة أملاح M.S والتي تشمل النترات (KnO_3, NH_4NO_3) و الكبريتات ($CuSO_4.5H_2O$, $ZnSO_4.7H_2O$, $MnSo_4.H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$) و الفوسفات (KH_2PO_4) ، ($NaMo_4.2H_2O$, H_3BO_4) و الهاليدات ($CoCl_2.6H_2O$, KI,CaCl2.2H2O, Na_2 EDTA) والحديد المخلبي ($FeSO_4.7H_2O$) إلى الماء المقطر ومن ثم إضافة السكروز بمعدل (30 غم/ لتر) و الفحم المنشط بمعدل (3غم/لتر) و الثيامين بمعدل (0.0005 غم/لتر) و كبريتات الأدنين (0.040غم /لتر) و ميزواينوسيتول بمعدل (0.1غم/لتر) وأرثروفوسفات الصوديوم الحامضية بمعدل (0.17غم/لتر) (16 و 20). ثم عدلت حموضة الوسط إلى 5.7 عياري باستعمال محلول هدروكسيد الصوديوم وحامض الهدروكلوريك (0.1 عياري) وتم قياس الحموضة بمقياس الـ (Digital pH meter) نوع kenteil-3055 ، بعد ذلك أضيف الـAgar-Agar بمعدل (8 غم /لتر) ، وزع بعد ذلك الوسط في أنابيب اختبار بمعدل (20مل / أنبوبة) ، وأغلقت الأنابيب بسدادت من القطن الطبي وغلفت بورق الألمنيوم ثم عقمت بجهاز التعقيم البخاري على درجة حرارة 121م وضغط 15 بار ولمدة 15 دقيقة ، بعد ذلك بردت وبعد تصلب الوسط استخدمت لزراعة الكالس (5 و7 و9)

تأثير بنزوات الصوديوم ومستخلص نبات القرنفل في تلوث الكالس بالفطريات

الكالس الجنيني :

استخدم الكالس الجنيني لنخلة التمر صنف البرحي والمنمى على الوسط الزرعي الموصوف في الفقرة أعلاه وعلى درجة حرارة 27 ±2ولفترة ثمانية اشهر (13).

المعاملات :

شملت المعاملات تغطيس الكالس الجنيني قبل الزراعة بالمحاليل التالية وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة وحسب التراكيز المبينة أدناه ولمدة 5 ثواني لضمان تغطية سطح النسيج بالمادة لدراسة حالة الحماية التي توفرها هذه المواد للنسيج نظراً لما تتمتع به من قابلية لمقاومة الأحياء المجهرية (1 و 4) بالإضافة إلى دراسة تأثير هذه المواد وبتراكيزها المستخدمة على النسيج:-

1. التغطيس بالماء المقطر المعقم (المقارنة) .
2. التغطيس بمحلول بنزوات الصوديوم بتركيز 0.1 غم/لتر .
3. التغطيس بمحلول بنزوات الصوديوم بتركيز 0.5 غم /لتر.

4. التغطيس بمحلول بنزوات الصوديوم بتركيز 1 غم /لتر.
5. التغطيس بمحلول القرنفل والمحضر باضافة 2غم من مسحوق القرنفل/لتر.
6. التغطيس بمحلول القرنفل والمحضر باضافة 5غم من مسحوق القرنفل/لتر.
7. التغطيس بمحلول القرنفل والمحضر باضافة 10غم من مسحوق القرنفل/لتر.

بعد ذلك تم وزن الأنابيب الحاوية على الوسط الغذائي قبل الزراعة ثم وزنت بعد الزراعة وحسب الفرق بين الوزنين لاستخراج الوزن الابتدائي للكالس الجنيني وبعد انتهاء التجربة استخدمت المعادلات التالية لاستخراج مقدار الزيادة في وزن الكالس الجنيني لمعرفة مدى تأثير المواد التي عومل بها الكالس الجنيني على نموه وتطوره (7 و9).

النسبة المئوية للفقد = $\frac{\text{الوزن الأول – الوزن بعد نهاية التجربة}}{\text{الوزن الأول}} \times 100$

وزن الكالس في نهاية التجربة = $\frac{\text{النسبة المئوية للفقد × الوزن الحالي}}{100} + \text{الوزن الحالي}$

مقدار الزيادة في وزن الكالس = وزن الكالس في نهاية التجربة – وزن الكالس في بداية التجربة

العزل والتشخيص:

تم عزل الفطريات من الوحدات الملوثة على وسط الـ PDA المعقم بجهاز التعقيم البخاري (Autoclave) والمضاف إليه المضاد الحياتي Chloramphynicol بتركيز 250 ملغم/لتر وحضنت في الحاضنة على درجة حرارة 25±1 وتم تنقية العزلات عن طريق زرع سبور واحد single spore حسب طريقة (16). شخصت الفطريات اعتمادا على المفاتيح التصنيفية (14 و 15).

التلوث بالفطريات:

تم حساب عدد الوحدات التجريبية التي تعرضت للتلوث بالفطريات بشكل عام سواء كان هذا التلوث بنوع واحد أو عدة انواع من الفطريات وحسبت النسبة المئوية للتلوث حسب المعادلة التالية:

النسبة المئوية للتلوث = $\frac{\text{عدد الوحدات التجريبية الملوثة}}{\text{العدد الكلي}} \times 100$

كما استخدمت المعادلة التالية لحساب النسبة المئوية لظهور الفطر في الوحدات التجريبية:

النسبة المئوية للظهور = $\frac{\text{عدد مرات ظهور النوع أو الجنس}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$

التحليل الإحصائي:

نفذت التجربة حسب التصميم العشوائي الكامل The Completely Randomized Design (C.R.D) واختبرت المعنوية بين المتوسطات حسب اختبار أقل فرق معنوي Least significant Test L. S. D. تحت مستوى احتمال 0.05 (2).

النتائج والمناقشة

التلوث بالفطريات

أظهرت النتائج المبينة في الجدول(1) وجود العديد من الفطريات وبنسب ظهور عالية في معاملة المقارنة وهذا يعكس التأثير الكبير للفطريات على الزراعة النسيجية ، وقد يرجع سبب التلوث إلى عدم الدقة في إجراء عمليات نقل وتعقيم وزراعة الانسجة النباتية (18 19). وأظهرت معاملات بنزوات الصوديوم 0.5 غم/لتر و بنزوات الصوديوم 1 غم/لتر و قرنفل 5 غم/لتر و قرنفل 10 غم/لتر تثبيطا تاماً لنمو الفطريات طيلة فترة التجربة في حين بلغت نسبة التلوث بالفطريات في معاملة القرنفل 2غم/لتر و بنزوات الصوديوم 0.1 غم/لتر75% و 50% على التوالي ، وربما يعود ذلك إلى قدرة هذه المواد على التأثير على عمليات الأيض الحيوي للفطريات والذي يختلف على ما يبدو باختلاف تركيز تلك المواد (1 و 3 و 4)

جدول (1) : تأثير المعاملة بتراكيز مختلفة من محلول بنزوات الصوديوم والقرنفل على نسبة التلوث بالفطريات.

المعاملة	نسبة التلوث الفطري %*
المقارنة	**75 [a]
بنزوات الصوديوم 0.1 غم/لتر	50 [b]
بنزوات الصوديوم 0.5 غم/لتر	0 [d]
بنزوات الصوديوم 1 غم/لتر	0 [d]
قرنفل 2غم/لتر	25 [c]
قرنفل 5 غم/لتر	0 [d]
قرنفل 10 غم/لتر	[d] 0

*** حولت النسب المئوية تحويلا زاويا لغرض زيادة دقة التحليل الاحصائي لوجود فجوات**

المعاملة	النسبة المئوية لظهور الفطريات في العينات %

كبيرة بين النسب المئوية.
**** الحروف المتشابهة لا توجد بينها فروق معنوية حسب اختبار .L.S.D**

جدول (2) : تأثير المعاملة بتراكيز مختلفة من محلول بنزوات الصوديوم والقرنفل على النسبة المئوية لظهور الفطريات.

	Alternaria alternata	*Aspergillus niger*	*Ulocladium atrum*	*Penicillum spp*	*Rhizopus spp*
المقارنة	23.08	30.77	15.38	15.38	15.38
بنزوات الصوديوم 0.1 غم/لتر	25	25	12.5	25	12.5
بنزوات الصوديوم 0.5 غم/لتر	0	0	0	0	0
بنزوات الصوديوم 1 غم/لتر	0	0	0	0	0
قرنفل 2غم/لتر	33.33	33.33	0	33.33	0
قرنفل 5 غم/لتر	0	0	0	0	0
قرنفل 10 غم/لتر	0	0	0	0	0
$LSD_{0.05}$	4.82	3.69	2.14	3.26	2.9

ويبين الجدول (2) نتائج عزل الفطريات الملوثة للوحدات التجريبية حيث تم عزل عدة أنواع من الفطريات تعود للأجناس *Alternaria alternata* و *Aspergillus niger* و *Ulocaldium atrum* و *Penicillium sp* و *Rhizopus sp* وبمعدلات ظهور اختلفت باختلاف المعاملات ، وهذا قد يرجع إلى تباين استجابة هذه الأجناس لعوامل التثبيط نتيجة امتلاكها آليات معينة تمكنها من المقاومة أوالتحمل واللذان قد يختلفان باختلاف الجنس والنوع (1 و 4 18 و 19).

تاثير المعاملات المختلفة في وزن الكالس وعدد الأجنة والاسمرار

بينت النتائج الموضحة في الجدول(3) تفوق معاملتي بنزوات الصوديوم 0.1 غم/لتر والقرنفل 2 غم/لتر على باقي معاملات التجربة في معدل الوزن الطري للكالس الجنيني ولم تكن هناك أية فروق معنوية بينها وبين معاملة المقارنة كما لم تظهر فروق معنوية بين معاملات التجربة بالنسبة لمعدل عدد الأجنة ومعدل الاسمرار وقد يرجع ذلك لانخفاض فعالية هذه المواد بمرور الزمن وهذا يعد من النقاط الجيدة حيث أنها تمنع التلوث الابتدائي والذي يعد من أهم مشاكل زراعة الأنسجة حاليا (10 و 18 و 19) .

جدول (3) : تأثير المعاملة بتراكيز مختلفة من محلول بنزوات الصوديوم والقرنفل على نمو الكالس الجنيني وعدد الأجنة لنخلة التمر صنف البرحي.

المعاملة	معدل الزيادة في وزن الكالس غم	معدل عدد الأجنة	معدل الاسمرار

0.333	20.750	3.419	المقارنة
1,000	20.250	3.763	بنزوات الصوديوم 0.1 غم/لتر
0.666	20.750	3.229	بنزوات الصوديوم 0.5 غم/لتر
0.666	20.750	3.165	بنزوات الصوديوم 1 غم/لتر
0.333	22,000	3.601	قرنفل 2غم/لتر
0.666	20.750	3.095	قرنفل 5 غم/لتر
1,000	20.500	2.339	قرنفل 10 غم/لتر
N.S	N.S	0.386	$\mathbf{LSD_{0.05}}$

*** حسب معدل الاسمرار وفق المفتاح الآتي: لا يوجد تلون(0) ، تلون خفيف (1) ، تلون متوسط (2) ، تلون قوي (3) .**

المصادر

1. الأسود ، ماجد بشير وعمر فوزي عبدالعزيز وأمجد يوسف سولاف (1993)، مبادئ الصناعات الغذائية . جامعة الموصل ،وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . الموصل.العراق .324 ص.
2. الراوي. خاشع محمود ومحمد عبد العزيز خلف الله (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل .العراق. 488 ص.
3. الرجب ، وفاء جاسم و حسن محمد علي القزاز (1982) ، أساسيات علم الأحياء المجهرية والغذائية . كتاب مترجم تأليف ماريون فيلدس. جامعة الموصل. 253 ص.
4. السعد ، لبيد عبدالله (1997) . تقويم كفاءة بعض الطرق الفيزياوية والكيمياوية لإزالة المركب Alternariol Monomethyl Ether في الطماطة وبعض منتجاتها . رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة البصرة . 34 ص.
5. الكعبي. أنسام مهدي صالح (2004). تأثير بعض المضادات الحياتية والمبيدين الفطريين Score 50%ٍ و Carbendazim 60% في نمو الكالس الجنيني لنخلة التمر *Phoenix dactylifera L* . مجلة البصرة لأبحاث نخلة التمر . المجلد 2 . العدد 1. 97 - 109.
6. الكناني ، فيصل رشيد ناصر (1987) . زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل . العراق.
7. سعد ، أحمد عبدالله (2001) . تأثير نوع الوسط الغذائي والسايتوكاينين في نشوء الكالس وتكون الأجنة الخضرية في نخيل التمر *Phoenix dactylifera* صنف الأشقر . رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة البصرة. البصرة. العراق.105 ص.
8. سلمان ، محمد عباس (1988). أساسيات زراعة الخلايا والأنسجة النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. العراق.

9. محسن. خيون علي (2004). دراسات في تحسين تكوين الأجنة الجسمية وإنباتها خارج الجسم الحي لنخيل التمر *Phoenix dactylifera L.* صنف البرحي . رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة البصرة. العراق.

10. محمد ، عبدالمطلب سيد ومنير صالح عمر. (1990) . المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأعضاء للنبات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل. العراق.

11. مطر ، عبدالأمير مهدي (1991) . زراعة النخيل وإنتاجه. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة البصرة . مطبعة دار الحكمة. البصرة . العراق. 420 ص.

12. Al-Ghamidi, A. S. (1993). True – to- Date Palm (*Phoenix dactylifera L.)* procedure through tissue culture techniques. CV. Safry.3rd. Symp. Date Palm. KFU. Saudi Arabia. Vol(1): P 1-13.

13. Al-Utbi, S. D.(2000). Some observation on *in vitro* propagation of date palm (*Phoenix dactylifera L.)* CV. Guntar, Basrah J. Sci., Vol. 18 No.1, 91-96.

14. Domsch, K.H.(1983). , Gams, W. and Anderson, T .H. (1980). Compendium of soil fungi. V(1). Academic Press. London. 859 pp.

15. Elis, M. P. (1976). Dematiaceous hyphomycetes. Common wealth Mycological Institute . London.

16. John F. Leslie and Brett A. Summerell. (2006). The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing. USA. 388PP

17. Murashig, T. and Skoog, F. (1962). A received medium from rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

18. Omamor I. B., A.O. Asemota, C. R. Eke and E. I. Eziashi.(2007). Fungal contaminants of the oil palm tissue culture in Nigerian institute for oil palm research (NIFOR). African Journal of Agricultural Research Vol. 2 (10), pp. 534-537.

19. Shroeder, G.A. (1970). The culture of shoots and seedlings. Date Grower's, Inst. Rep., 47:25-27.

20. Subathra Devi, C. and Mohana Srinivasan V. (2006). Studies on various Microorganisims affecting the plant tissue culyure explants. American Journal of Plant Physiology 1(2):205-209.

21. Tisserat,B. and Zaid, A.(1985).In vitro shoot tip differentiation in *Phoenix dactlifera* . Date Palm J., 2(2): 163-182.

THE EFFECT OF SODIUM BENZOATE AND *SYZYGIUM AROMATICUM* EXTRACT ON *IN VITRO* FUNGAL CONTAMINATION, GROWTH, NUMBER OF EMBRYOS AND BROWNING AVERAGES OF DATE PALM *PHOENIX DACTYLIFERA L.* CALLUS.

Labeed Al-Saad
University of Basrah - college of agriculture – Plant Protection Dept.
E-Mail: la_alsaad@yahoo.com

SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of sodium benzoate and *Syzygium aromaticum* crud extract as anti-contamination agents to prevent fungal contamination which is attendant with date palm tissue culture. The results showed that 75% of control units were affected with the fungi of *Aspergillus niger ,Alternaria alternata, Ulocaldium atrum, Penicillium sp* and *Rhizopus sp* with an occurance percentages of 30.77%, 23.08%, 15.38%, 15.38% and 15.38% respectively. The Sodium benzoate (0.5 and 1)gm/L and *Syzygium aromaticum* (5 and 10)gm/L treatments were absolutely prevent fungal contamination along experiment period ,also there were no significant effects on callus browning and the number of embryo averages by these treatments. Sodium benzoate (0.5 and 1)gm/L and *Syzygium aromaticum* 5gm/L did not significantly effect on the c callus growth average compared with control treatments while there were

significant differeces between these tretments and *Syzygium aromaticum* (10gm/L) tretment.