شناسایی آلودگی‌های قارچی در کشت درون شیشه‌ای نخل خرما (*Phoeneix dactylifera*) رقم کبکاب

سیده فاطمه موسوی*[۱]، محمد هدایت[۲]، فاطمه جمالی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر

[۲] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر

[۳] استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر

*نویسنده مسئول: mosavi67f@gmail.com

چکیده

آلودگی‌های میکروبی ایجاد شده در کشت درون شیشه‌ای ازجمله مهم‌ترین عوامل محدودکننده ریز ازدیادی به شمار می‌رود. از طرفی با توجه به ویژگی‌های منحصربه‌فرد نخل خرما در مدت‌زمان طولانی دوره کشت بافت، شناسایی آلودگی‌های محیط کشت بافت خرما جهت به‌کارگیری بهترین روش کنترل، حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش پنج جنس مختلف از قارچ‌ها به‌عنوان منبع آلودگی‌های قارچی در کشت بافت نخل خرما رقم کبکاب شناسایی شد. بیش‌ترین میزان آلودگی قارچی در محیط کشت بافت نخل خرما شامل *Aspergillus spp.* با ۴۳ درصد و پس‌ازآن به ترتیب قارچ‌های *Raizoctonia spp.* با ۲۱ درصد، *Fusarium spp.* و *Penicillium spp.* هرکدام با ۱۴ درصد، ارزیابی شد. قارچ *Caladosporiom spp.* با ۸ درصد کم‌ترین میزان آلودگی را ایجاد نمود. درمجموع این آلودگی‌ها سبب کاهش درصد موفقیت کشت بافت شدند.

***کلمات کلیدی:* کشت بافت، نخل خرما، آسپرژیلوس، رایزکتونیا، فوزاریوم**

مقدمه

نخل خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera L.* گیاهی تک‌لپه از تیره Palmaceae و بومی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آفریقا و جنوب آسیا می‌باشد. خرما از محصولات با ارزش غذایی، صنعتی و اقتصادی ایران و خاورمیانه محسوب می شود. بر اساس آمار سازمان خواربار کشاورزی سطح زیر کشت بارور خرما در ایران ۲۳۸۸۶۲ هکتار و میزان تولید آن ۹۹۶۷۷۰ تن گزارش شده است. محصول خرما از نظر سطح زیر کشت مقام اول جهان و در تولید مقام دوم دنیا را به خود اختصاص داده است. امروزه تقاضا برای میوه خرما در سراسر جهان افزایش یافته است. روش‌های تکثیر نخل شامل تکثیر از طریق بذر، پاجوش و کشت بافت صورت می‌گیرد. ازدیاد بذری ساده‌ترین و سریع‌ترین روش تکثیر بوده، اما با این روش‌ها ارقام شبیه به اصل (true to type) تولید نمی‌شود و این روش تنها برای مقاصد اصلاحی مدنظر است. بنابراین روش غیرجنسی به‌عنوان مهم ترین روش ازدیاد این درخت ارزشمند شناخته می‌شود. در روش‌های سنتی تکثیر غیرجنسی، استفاده از پاجوش بهترین راه ازدیاد به شمار می‌رود، اما دارای محدودیت‌هایی چون تعداد محدود پاجوش‌های هر درخت، زمان طولانی برای رشد و به بار رفتن و از همه مهم‌تر انتقال آلودگی‌های درونی را می‌توان برشمرد. روش جدید ازدیاد جهت کاهش مشکلات ذکر شده، روش کشت بافت بوده که نسبت به سایر روش‌های غیرجنسی دارای مزایایی چون تولید تعداد زیاد گیاه سالم و عاری از آلودگی با محتوای ژنتیکی یکسان و کیفیت یکنواخت در زمانی کوتاه‌تر می‌باشد. مهم‌ترین روش‌های تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان، ریز ازدیادی، اندام‌زایی از طریق پینه و رویان‌زایی بدنی می‌باشد. در خرما بافت‌های مختلف می‌توانند برای ریز ازدیادی مورد استفاده قرار گیرند. (Taha *et al.*, 2007) جهت مطالعه پرآوری در رقم شکوتی، بارتامودا و ملکابی از نوک شاخساره و سرآغازه های برگ به‌عنوان ریزنمونه استفاده کردند. در پژوهشی به‌منظور تولید پینه و باززایی نخل خرما رقم خلاس از مریستم انتهایی به‌منظور ریزنمونه استفاده شد (Aslam and Ahmed Khan, 2009). هم‌چنین با استفاده از گل‌آذین نابالغ درخت نخل به روش غیرمستقیم تولید پینه نمودند (Ahmed Abul-Soad and Mohamed Mahdi, 2010). ریز ازدیادی خرما با چالش‌های متعددی روبرو است. یکی از مهم‌ترین آن‌ها آلودگی‌های میکروبی ایجاد شده در مراحل مختلف ریز ازدیادی است. عوامل

ایجادکننده آلودگی‌ها، ریز نمونه‌های آلوده، ابزار و تجهیزات، روش‌های نامناسب و مقدار ناکافی از مواد ضدعفونی‌کننده می باشند. ازآنجایی‌که ترکیب محیط کشت بافت منبع خوبی از مواد مغذی لازم برای رشد و نمو آلودگی‌های میکروبی به شمار می‌آید. دراین‌ارتباط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان آلوده‌کنندگان کشت بافت گیاهی شناخته می‌شوند.

وجود آلودگی در کشت بافت باعث افزایش هزینه، اثرات مضر بر کشت‌ها، نتایج آزمایش غلط و از دست دادن مواد گیاهی باارزش می‌گردد. مجموع تلفات ناشی از آلودگی‌های میکروبی در اکثر آزمایشگاه‌های دنیا ۱۵-۳ درصد گزارش شده است که به ترتیب قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها بیش‌ترین میزان آلودگی را ایجاد می‌کنند. در بررسی انجام شده توسط اودوتایو و همکاران (۲۰۰۴) آلودگی‌های میکروبی در کشت بافت گیاهانی از جنس بامیه، ۴ گونه قارچی آلوده‌کننده گزارش شدند. حمید و عباس (۲۰۰۶) در بررسی آلودگی‌های قارچی شش رقم مختلف خرما در طی تولید پینه رویان‌زا نشان دادند که قارچ *Aspergillus niger*, *A. calavatus* و *Alternaria alternata* آلاینده‌های غالب بودند. در این پژوهش سعی شده است با شناسایی مهم‌ترین عوامل قارچی در کشت درون شیشه‌ای نخل خرما گامی مفید در پیشبرد اهداف کشت بافت نخل خرما برداشته شود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر انجام شد. مواد گیاهی مورد استفاده مریستم انتهایی پاجوش نخل خرما رقم کبکاب بوده که از نخلستان‌های مختلف شهرستان دشتستان جمع‌آوری شدند. ابتدا محیط کشت MS و سایر وسایل مورد نیاز در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تحت فشار ۱/۲ اتمسفر استریل شدند. پس از جداسازی نمونه‌های گیاهی، ضدعفونی سطحی توسط غوطه‌وری در قارچ‌کش ریدومیل با غلظت ۵ در هزار به مدت ۲ دقیقه، سپس قرار دادن نمونه گیاهی در الکل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و استریل با هیپوکلریت سدیم تجاری ۳۰ درصد با زمان ۳۰ دقیقه انجام شد. پس‌ازآن نمونه‌ها سه بار با آب مقطر استریل آب‌کشی و در شیشه‌های حاوی محیط کشت MS، قرار گرفته و در اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ هفته نگه‌داری شدند. آلودگی‌های قارچی مشاهده شده، از ریزنمونه‌ها جداسازی و در شرایط استریل در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت شده و در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه به مدت ۳ روز نگه‌داری شدند. پس از رشد کامل قارچ‌ها از آن‌ها اسلاید تهیه و بر اساس خواص مورفولوژیک در زیر میکروسکوپ شناسایی و طبقه‌بندی و درصد آلودگی محاسبه گردید.

نتایج و بحث

در محیط کشت بافت گیاهی آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و مخمر قابل مشاهده بودند. آلودگی‌های قارچی بر اساس خواص مورفولوژیک نظیر فرم و رنگ کلونی، نوع میسیلیوم، باردهی و اسپور مورد ارزیابی و شناسایی قرار گرفتند. ۵ جنس قارچ در کشت بافت خرما رقم کبکاب تشخیص داده شد. قارچ *Aspergillus sp.* با ۴۳ درصد بیش‌ترین فراوانی و پس‌ازآن *Raizoctonia sp.* با ۲۱ درصد، *Fusarium spp.* و *Penicillium spp.* با ۱۴ درصد و قارچ *Caladosporiom spp.* با ۸ درصد کم‌ترین میزان آلودگی را ایجاد نمود. (Samson *et al.*, 2002) گزارش کردند قارچ رشته‌ای *Aspergillus niger* در محیط‌های مختلف وجود دارد و جز شایع‌ترین جوامع میکروبی در خاک، هوا و بسیاری از محیط‌های دیگر است. ازاین‌رو فعالیت ساپروفیت قارچ با طیف وسیعی از آنزیم‌های هیدرولیتیک و اکسیداتیو این قارچ‌ها را قادر می‌سازد در هر کجا که یک منبع مناسب از مواد غذایی و رطوبت وجود دارد، رشد کنند (Schuster *et al.* 2002). چند جنس مختلف از آلودگی‌های قارچی را در کشت بافت نخل خرما شناسایی کردند که شامل *Aspergilliusniger, Penicillium sp., Fusarium spp.* و *Chaetomium atrobronneum* می‌باشد (Al-Mayahi *et al.*, 2010). پژوهشگران نشان دادند که اغلب آلودگی‌های ایجاد شده در کشت بافت نخل توسط *Penicillium sp., Aspergillus niger, Alternaria alternate* با ۲۷، ۲۵ و ۱۸ درصد ایجاد شده و کم‌ترین میزان آلودگی توسط *Aspergillus terreus* مشاهده شد (Abass *et al.*, 2007). گزارش شد آلودگی‌های قارچی سبب افزایش مرگ و میر کشت‌ها می‌شود (Kane, 2003). حمید و عباس (۲۰۰۶) به این نتیجه رسیدند که آلودگی‌های قارچی سبب انواع مختلف خسارت به کشت بافت مانند افزایش کدر شدن، تغییر اسیدیته محیط و تخریب سلول می‌شود (Hameed and Abass,

2006). افزایش غلظت و زمان قرار گرفتن ریزنمونه در معرض مواد ضدعفونی‌کننده و قارچ‌کش، سبب کاهش درصد آلودگی قارچی و به‌تبع آن کاهش مرگ مواد گیاهی می‌شود. برخی از آلاینده‌های قارچی موادی ترشح می‌کنند که باعث آسیب به ریزنمونه‌ها می‌شود، قارچ‌هایی نظیر *Aspergillus niger* و *Asperigillus flavus* به ترتیب سبب تولید اگزالات و مسمومیت آفلاتوکسین می‌شوند (Obuekwe and Osagie 1989). (Al-Kaby, 2004) نشان داد که غلظت ۱-۰/۵ گرم در لیتر از قارچ‌کش کاربندازیم در کاهش درصد کل آلودگی موفق بوده و هیچ اثر منفی بر رشد و توسعه کشت بافت نخل خرما ندارد. در پژوهشی مشخص گردید تیمار با قارچ‌کش بنلیت باعث کاهش درصد آلودگی از ۲۵ درصد در شاهد به ۱/۶ درصد در یافته‌های مشابه شد. مشاهدات نشان می‌دهد که قارچ‌کش بنلیت بیش‌ترین کنترل را بر قارچ‌های *Aspergillius niger, Penicillium sp.* و *Alternaria alternate* دارند (Al-Mayahi *et al.*, 2010).

منابع

Abass, M.H., 2013. Microbial contaminants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in Iraqi tissue culture laboratories. Emir. J. Food Agric; 25 (11): 875-882.

Abass, M.H., U.A.M. Al-Abadi and A.M.S. Al-Kaby. 2007. The efficiency of Henna leave extracts and some fungicides to reduce the fungal contamination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) tissue culture. Iraqi J. Biotech; 6(2):1-40.

Abeer, H.E. and Abd-El Kareim. 2009. Using actinomycetes on controlling bacterial contamination of date palm during different stages *in vitro*. Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants; 1(3): 92-99.

Ahmed Abul-Soad, A. and Sh. Mohamed Mahdi. 2010. Commercial production of tissue culture date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by inflorescence technique. Genetic Engineering and Biotechnology; 8(2):39-44.

Alihouri m. 2007. Effects of water stress on fruit drop and yield of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Pajouhesh and Sazandegi; 79: 178-185. (in Persian).

Al-Kaby, A.M.S. 2004. The effect of some antibiotics and fungicides on the growth of embryogenic callus of date palm *Phoenix dactylifera* L. Basra Journal for Date Palm Researches. 3(1-2): 97-110.

Al-Mayahi, A. M., A. N. Ahmed and A. A. Al-Khalifa. 2010. Isolation and identification of associated fungi with the micropropagation of five different date palm cultivars and the effect of Benlate fungicides in their control. Basra Journal for Date Palm Researches. 9(2):79-97.

Aslam, J. and S. Ahmed Khan. 2009. *In vitro* micropropagation of 'KHALAS' date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 17(1): 15-27.

Elahinia S.A. 2008. Plant pathology and mycology and other causal agent of plant diseases. University of Guilan Press, Guilan. (in Persian).

Hameed, M.A. and M.H. Abass. 2006. Study of cytological changes associated with contaminated date palm *Phoenix dactylifera* L. tissue cultures with fungi. Basrah Journal of Veterinary Research. 32(1):15-27.

Kane, M. (2003). Bacterial and fungal indexing of tissue cultures. http://www.hos.ufl.edu/moreweb/ TissueCulture/class1/Bacterial%20 and%20fungal%20indexing%20of20tissue%20cultures.doc.

Obuekwe CO, Osagie IJ (1989). Morphological changes in infected wiltresistant and wilt-susceptible oil palm progenies and hydrolytic enzyme activities associated with *Fursarium oxysporum* f sp elaeidis pathogens, Oeagureux, 44 (11): 8-9.

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. 2 (10): 534-537.

Odutayo, O.I., R.T. Oso, B.O. Akinyemi and N.A. Amusa. 2004. Microbial contaminants of cultured Hibiscus cannabinus and Telfaria occidentalis tissues. African Journal of Biotechnology. 3(9): 473-476.

Odutayo, O.I., N.A. Amusa, O.O. Okutade and Y.R. Ogunsanwo. 2007. Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in south-western Nigeria. African Journal of Agricultural Research. 2(3): 67-72.

Samson R.A., J. Houbraken, R.C. Summerbell, B. Flannigan and J.D. Miller. 2002. Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: B. Flannigan, R.A. Samson and J.D. Miller(Eds.), pp. 287-292. Microogranisms in Home and Indoor Work Environments. New York, Taylor & Francis.

Taha H.S., M.M. Hassan and M.K. El-Bahr. 2007. Micropropagation of some Egyptian date palm dry cultivars 1- Maturation of somatic embryos. Arab Journal of Biotechnology. 10(2):333-340.

Identification of Fungal Contamination of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) on *In Vitro* Culture Varieties Kabkab

Seyede Fateme Mousavi[*1], Mohammad Hedayat[2], Fateme Jamali[3]

[1]Graduated M.Sc. Student, Dep. of Horticulture Science, College of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr

[2] Assistant Professor, Dep. of Horticulture Science, College of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr

[3] Assistant Professor, Dep. of Horticulture Science, College of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr

[*]*Corresponding Author:* mosavi67f@gmail.com

Abstract

Microbial contamination under *in vitro* tissue culture is considered as one of the most important limiting factors for micropropagation. However, due to the unique properties of palm tree under long - time tissue culture period, identification of media contaminants is important for the application of the best method of control. In this study five different genera of fungi were identified as a source of pollution in palm tissue culture. It was revealed that the fungal infection in palm tissue culture media was caused by *Aspergillus* spp. (43%), *Rhizoctonia* spp. (21%), *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. (each with 14 %), respectively. *Caladosporiom* spp. with 8% abundance caused the least infection in the tissue culture. The fungi identified in this study decreased the success of tissue culture significantly.

Keywords*: Tissue culture, Date palm, *Aspergillus*, *Rhizoctonia*, *Fusarium