وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تقويم كفاءة مستخلص أوراق نبات اليوكالبتوس في نمو الفطر *Aspergillus flavus* المعزول من بذور الذرة الصفراء

بحث مقدم إلى

كلية العلوم - قسم علوم الحياة

كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس

العلوم /علوم الحياة

من قبل الطالب : محمد حمزة حليم

بأشراف

د. علي عبد الهادي ماهود

1436_1437 هجري 2015_2016 ميلادي

بسم الله الرحمن الرحيم

((ويسألونك عن الروح قل الروح من أمر ربي

وما أوتيتم من العلم إلا قليلا))

صدق الله العلي العظيم

سورة الإسراء

الآية : (٨٥)

الإهداء

الى من علمني ورباني وكان سيدي في الحياة

أبي

والى من وهبتني الحب والحنان أجلالا لقدرها وإكراماً لجهدها

أمي

الى منبع الوفـــــــــاء والعطـــــــــاء

أختي

والـــــى كـــــل مـــــــــن أحبني

وساعدني إليهم جميعا أهدي ثمرة جهدي المتواضع.

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العلمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين واله الطيبين الأطهار وبعد.....

يطيب للباحث بعد إكمال بحثه أن يتوجه بجزيل الشكر والامتنان إلى الدكتور (علي عبد الهادي ماهود) لما بذله من جهود علميه متميزة وتوجيهات صائبة أغنت البحث بكل ما هو جديد سائلا العلي القدير أن يمنحه الصحة والعافية , ومن واجب العرفان بالجميل يتقدم الباحث بخالص شكره إلى الاساتذه في قسم علوم الحياة لتقديمهم العون والمشورة وخصوصا إلى الدكتور (جاسم حنون هاشم) رئيس قسم علوم الحياة لما يبذله من جهود كبيره في خدمه طلبه قسم علوم الحياة.

كما أسجل اعتزازي إلى عائلتي ودعائي بالخير إلى كافة من ساهم ومنحني المساعدة العلمية الهادفة لإتمام بحثي.

الخلاصة

تم دراسة تأثير المستخلص المائي الحار لأوراق نبات اليوكالبتوس ***Eucalyptus sp.*** في أنبات بذور الذره الصفراء المخزونة في الأسواق المحلية في مدينة الديوانية ودراسة تأثير هذه المستخلصات في النمو الشعاعي للفطر ***Aspergillus flavus*** المعزول من بذور الذرة الصفراء .

أظهرت النتائج إن للمستخلص تأثير واضح في رفع نسب إنبات بذور الذره الصفراء المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص إذ تراوحت ما بين (66.66_80.00)% بالقياس مع معاملة المقارنة التي بلغت فيها نسب الإنبات 53.33% عند مستوى احتمال 5% .

كما بينت النتائج أن لمستخلص أوراق نبات اليوكالبتوس تأثيرا مثبطا لنمو الفطر ***A.flavus*** على الوسط الغذائي PDA إذ ثبط المستخلص النمو ألشعاعي لهذا الفطر بصوره واضحة بالقياس مع معامله المقارنة عند مستوى احتمال 5% .

المقدمة

يعتبر محصول ألذره الصفراء ***Zea mays L*** من المحاصيل الحقلية ذات الأهمية الاقتصادية في العراق لاستخدامه كمصدر أساسي لإنتاج الزيوت المستخدمة بصوره رئيسيه في تغذيه الإنسان وكذلك يشكل هذا المحصول الغذاء الأساسي للدواجن والحيوانات الأخرى لدخوله كجزء رئيسي في صناعة الأعلاف الحيوانية (Chakravarty,1976) .

تصاب بذور الذره الصفراء إثناء الحصاد أو النقل أو الخزن بالعديد من الفطريات التابعه للأجناس ***Alternaria sp. ,Aspergillus sp. , Penicillium sp.,*** ***Trichoderm sp. ,Rhizopus sp.***, فطريات أخرى (ميخائيل وبيدر, 1982). وقد وجد إلهيتي, (1977) إن نسبة التلف الظاهري الذي تسببه الفطريات في محاصيل ألذره الصفراء بلغت 50.8 % .

تسبب هذه الفطريات خسائر اقتصاديه كبيره نظرا لتأثيرها في حيوية البذور وتقليل نسب إنباتها مما يؤدي إلى تقليل الإنتاج الزراعي عند استخدام مثل هذه البذور في ألزراعه ،كما وجد ان بعض الانواع التابعه للفطرين ***Aspergillus sp.*** و ***Penicillinum sp.*** لها القدرة على انتاج السموم الفطرية (Mycotoxins) ومن ابرز هذه السموم وكثرها خطوره هي الافلاتوكسينات (Aflatoxins) التي تعد من أخطر الملوثات الغذائية في الوقت الحاضر لما لها من تأثيرات مسرطنه للانسان والحيوان (سعيد,1985)

للذلك كان لابد من الحيوان والانسان من الاضرار الناتجه عن هذه السموم بعده وسائل غالبا ما تكون باستخدام بعض المبيدات الكيميائيه وبالنظر لان الغالبيه العظمى من هذه المبيدات الكيميائيه لها العديد من التأثيرات الجانبيه فانها فضلا عن

كونها ملوثات للبيئه فهي سامه ومسرطنه للانسان والحيوان في حاله استخدام البذور مصدرا غذائيا (Cowan 1999) وتمتاز هذه المواد بخاصيه التراكم في جزيئات التربه وهو ما يؤدي الى الموت وانقراض عدد كبير من الاحياء في التربة و كذلك تسربها الى مصادر المياه (السعدي, 2002).

لذا اصبح من الضروري السعي لايجاد بدائل لهذه المبيدات الكيميائيه ولذلك اتجهت الدراسات في العديد من دول العالم الى استخدام المستخلصات النباتية بدلا عن المبيدات الكيميائيه لغرض مكافحة الافات الزراعيه ومنها الفطريات المرافقه للبذور (Al_Rawi & Chakravarty , 1988) . ولهذا فقد تم انتخاب نبات اليوكالبتوس ***Eucalyptus sp.*** لمعرفة مدى تأثير المستخلص المائي لأوراقه في نمو احد الفطريات المرافقه لبذور الذره الصفراء المخزونه في الاسواق المحليه في مدينه الديوانيه وقد شملت خطه البحث ما يلي :

1- جمع اوراق نبات اليوكالبتوس وتحضير المستخلص المائي .
2- عزل الفطريات المرافقه لبذور الذره الصفراء المخزونه وتنقيه و تشخيص احد هذه الفطريات الى مستوى النوع.
3- أختيار تأثير المستخلص المائي الحار لأوراق نبات اليوكالبتوس في إنبات بذور الذره الصفراء على الوسط الغذائي Potato dextrose agar .
4- اختبار تأثير المستخلص المائي لأوراق نبات اليوكالبتوس والمحضر بتراكيز مختلفه في نمو الفطر قيد الدراسه على الوسط الغذائي الصلب PDA .

نبات اليوكالبتوس :

الاسم المحلي:اليوكالبتوس

الاسم العلمي: ***Eucalyptus sp.***

العائله: Myrtaceae (Chakravarty,1976)

المحتوى الكيميائي لنبات اليوكالبتوس:

يعتبر نبات اليوكالبتوس من النباتات الغنيه بالزيوت الطياره (Volatile oils) إذ يتكون الزيت الطيار من Cineole الذي يكّون (70-85) % من الزيت الطيار وقد كان يسمى سابقا Eucalyptol ويضم الزيت الطيار كذلك عدة مواد أهمهاFlavonoids, Limonene, Terpenes,وBorneol (Hartmans ***etal.***,1995)وكذلك على المواد الفا_pinene و phellandrene و piperitone ومواد قابضه ومواد مره (حسين, 1979) .

الاستعمالات الطبية لنبات اليوكالبتوس:

يعتبر نبات اليوكالبتوس من النباتات المهمة طبيا إذ يستخدم لأغراض طبية عديدة وخاصة الزيت الطيار المستخدم في تطهير الجروح والأجهزة الجراحية في المستشفيات الفرنسية (Webb & pitt, 2004) كما يستخدم الزيت الطيار لليوكالبتوس كمضاد بكتيري لعديد من أنواع البكتريا ***Staphlococcus spp.*** و ***E.coli*** كما اظهر فعالية تثبيطه عاليه ضد العديد من أنواع الفطريات ومنها ***Trichphyton spp.*** و ***C.albicans*** (Sheppard , 1995) .

المواد وطرائق العمل:

جمع بذور الذرة الصفراء :

تم جمع بذور الذره الصفراء المستخدمة في هذا البحث من الأسواق المحلية إذ تم جمع ثلاثة عينات عشوائيه بواقع واحد كغم.

جمع الأجزاء النباتية المختبرة :

تم الحصول على أوراق نبات اليوكالبتوس من إحدى حدائق جامعة القادسية , إذ غسلت باستعمال الماء العادي ثم الماء المقطر ثم تركت لتجف في درجة حرارة الغرفة بعدها طحنت بمطحنه كهربائية ووضع المسحوق بعبوات جافه لحين الاستعمال.

تحضير المستخلص المائي الحار :

حضر المستخلص المائي الحار بالاعتماد على طريقة (Harborne,1984) كالأتي:
أخذ 10غم من المسحوق الجاف وأضيف إليه 200مل من الماء المقطر في دورق زجاجي سعته 500 مل بعدها ضع الدورق على مسخن حراري بدرجة (40مْ) واترك الخليط لمدة 24ساعة مع التحريك المستمر.بعدها رشح المحلول بواسطة أوراق الترشيح Whitman No.1 للحصول على محلول رائق بعد ذلك مرره خلال مرشح بكتيري (Millipore) 0.22 مايكرون لكي تكون معقمه وجاهزة للاضافه للأوساط الغذائية أو لمعاملة البذور.

عزل الفطريات المرافقة لبذور الذرة الصفراء:

قسمت البذور إلى مجموعتين الأولى عقمت سطحيا باستخدام محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاثة دقائق ثم غسلت بماء مقطر ثلاث مرات إما المجموعة الثانية فتضمنت بذور غسلت بماء مقطر فقط , بعدها زرعت البذور في أطباق بتري حاويه على وسط غذائي PDA وبواقع 5بذور في كل طبق وبثلاثة مكررات وتركت الإطباق في الحاضنة بدرجة 25 مْ وبعد 4 أيام ثم تم متابعة نمو الفطريات, إذ فحصت الإطباق لمعرفه الفطريات النامية ثم تم انتخاب احد أنواع هذه الفطريات لغرض إجراء هذه الدراسة.

تشخيص الفطر المعزول :

بعد عملية عزل الفطريات المرافقة لبذور الذرة الصفراء جرت عملية تشخيص أحد هذه الأنواع إلى مستوى النوع وذلك اعتمادا على المظهر الخارجي للمستعمرة مثل الشكل واللون وقطر المستعمرة وأيضا اعتمادا على الصفات ألمجهريه مثل الشكل والحجم واللون وتركيب الحوامل والابواغ والتراكيب الأخرى وفق الأسس التصنيفية المعتمدة باستخدام المفاتيح التصنيفية الواردة في المصادر (Barnett&Hunter,1972; Moustafa,1982)

تأثير مستخلص أوراق نبات اليوكالبتوس في إنبات بذور الذرة الصفراء:

تم تحضير ثلاثة تراكيز من المستخلص المائي لنبات اليوكالبتوس وهي (15,10,5)% بالتخفيف بالماء المقطر المعقم إما معاملة المقارنة فقد تضمنت بذور غير معاملة بأي مادة أضافية وبعد معاملة بذور الذرة الصفراء بالتراكيز المختلفة وذلك بتغميسها لمدة ثلاثة دقائق ثم زرعها بواقع 5بذور في كل طبق بتري معقم

قطره (90ملم) يحتوي على الوسط الغذائي المعقم PDA وبثلاثة مكررات لكل معاملة وحضنت الإطباق داخل الحاضنة بدرجه حرارة (25مْ) لمده 7 أيام وتم حساب نسب الإنبات من خلال المعاملة التالية :

$$\text{النسبة المئوية للإنبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{عدد البذور الكلي}} \times 100$$

تأثير مستخلص أوراق نبات اليوكالبتوس في النمو ألشعاعي للفطر *Aspergillus flavus* :

لتحديد فاعلية المستخلص المائي لأوراق اليوكالبتوس في النمو ألشعاعي للفطر المعزول أتبعت طريقة ((Dixit *et al.*,1976)) وهي تقنية الغذاء المسموم إذ تم تحضير ثلاثة تراكيز للمستخلص وهي (5,10,15)% أما معاملة المقارنة فقد تضمنت أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي المعقم PDA من غير أي أضافه , وبعد إن تصلبت الأوساط في الإطباق تم نقل قطعة قطرها 7.5 ملم من مزرعة نقيه للفطر المعزول باستخدام الثاقب الفليني ووضعت في منتصف الطبق وحضنت الإطباق بدرجة حرارة 25 مْ وبثلاثة مكررات لكل معاملة ومن ثم تم قياس معدل نمو كل فطر في المعاملات المختلفة باستعمال المسطرة الاعتيادية (معدل ثلاثة أقطار متعامدة) بعد وصول الغزل الفطري في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق.

التحليل الإحصائي :

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي لتحديد الفروق المعنوية عند مستوى احتمال 5% وتم اختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات بواسطة اختبار دنكن متعدد الحدود.

النتائج والمناقشة :

تأثير مستخلص أوراق نبات اليوكالبتوس في إنبات بذور الذرة الصفراء:

من خلال الجدول (1) يتبين أن بذور الذرة الصفراء المعاملة بتراكيز متخلفة من مستخلص أوراق نبات اليوكالبتوس تتباين نسب إنباتها ويلاحظ انه بزيادة التركيز تزداد نسب إنبات البذور بالقياس مع معاملة المقارنة عند مستوى احتمال 5% ,وذلك لان كلما زاد التركيز يزداد التأثير المثبط لمستخلص أوراق نبات اليوكالبتوس على الفطريات المرافقة للبذور ويمكن إرجاع السبب إلى القدرة التثبيطية لمحتويات أوراق نبات اليوكالبتوس ومن هذه المحتويات هي الزيوت الطيارة (Volatile oils) إذ يتكون الزيت الطيار من Cineole وكذلك عدة مواد أهمها Terpenes, Limonene Flavonoids, Borneol, (Hartmans *et al*.,1995) وكذلك على المواد إلفا_Pinene و Phellandrene و Piperitone ومواد قابضه ومواد مره (حسين,1979).

جدول (١) تأثير مستخلص أوراق اليوكالبتوس في إنبات بذور الذرة الصفراء

التركيز%	نسب إنبات بذور ألذره الصفراء %
5	66.66 b
10	73.33 ab
15	80.00 a
control	53.33 c

*تمثل النتائج الموضحة في الجدول معدل ثلاث مكررات .

*المعدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنويا فيما بينها حسب اختيار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5% .

تأثير مستخلص أوراق نبات اليوكالبتوس في النمو ألشعاعي للفطر *A.flavus* :

مـن خـلال الجـدول (2) يتبـين تـأثير التراكيـز المختلفـة لمسـتخلص أوراق نبـات اليوكالبتوس في النمو ألشعاعي للفطر *A.flavus* المعزول من بذور الذرة الصفراء ,إذ أعطـت هـذه التراكيـز تثبيطـا واضـحا لنمـو الفطـر علـى الوسـط الغـذائي PDA بالقياس مع معاملة المقارنة عند مستوى احتمال 5% , وأظهرت النتائج انه بزيادة التركيز يزداد تأثير المواد الفعالة المضافة لنمو الفطر وبالتالي يقل قطر المستعمرة , وتحتوي أوراق نبات اليوكالبتوس على عدد من المواد الفعالة مثل الزيوت الطيارة (Volatile oils) إذ يتكون الزيت الطيار من من Cineole وكذلك عدة مواد أهمها (Hartmans *et al*.,1995) ,Terpenes ,Limonene, Flavonoids, Borneol,

جدول(2) تأثير مستخلص أوراق اليوكالبتوس النمو ألشعاعي للفطر *A.flavus*

التركيز	معدل النمو الشعاعي للفطر ملم
5	26.43 b
10	24.66 b
15	17.21 c
control	90.00 a

*تمثل النتائج الموضحة في الجدول معدل ثلاث مكررات .

*المعدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنويا فيما بينها حسب اختيار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5% .

المصادر :

1 .السعدي, حسين علي (2002) . علم البيئة والتلوث .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . كلية التربية للبنات .جامعة بغداد .

2.إلهيتي، إياد عبد الواحد .(1977).الفطريات إلى تهاجم حاصل الذرة الصفراء في المخازن،تشخيصها، تأثيراتها،مقارناها.رسالة ماجستير،كليه الزراعة،جامعه بغداد .

3.حسين ،فوزي .طه.قطب.(1979) .النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها .الدار العربية للكتاب تونس.

4.سعيد.كامل كزاز.(1985).وجود الافلاتوكسين والزيرالينون في بعض الحبوب ومنتجاتها الغذائية في بعض المحافظات العراقية .المجلة العراقية للعلوم الزراعية (زانكو)، المجلد 3 ،العدد 2:165-177

5.ميخائيل,سميروبيدر ،تركي . (1988).إمراض البذور.جامعة الموصل.العراق.

6. Al-Rawi, A. & Chakravarty, H.L.(1988). Medicinal plants ofIraq. Minst. of Agric. Baghdad., 2 nd ed.

7. Barnett, H.L. & Hunter, B.B.(1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3 rd Burgess publ. co., Minnesota.

8. Chakravarty, H.H.(l976). Plant Wealth ofIraq. A dictionary economic Plants. Vol. 1. Botare directorate, Ministry Agriculture and Agravian Reform, Baghdad.

9. Cowan, M.M.(1999). Plant product as Antimicrobial Agents. ciln. Microbiol- Rev., 12:564-582.

10. Dixit, S.N.; Tripathy, S.C. & Upadhyey, R.R.(1976). The antifungal substance of rose flower (Rosa indica). Economic Botany., 30:371-373 .

11. Harbome, J.B.(1984). Phytochemical method. A guide to modem techniques of plants analysis. 2nd ed. London. New York, Chapman & Hall.

12. Hartmans, K.J.; Diepenhorst,P.;Bakker W. & Gorris, L.G.M.(1995). The use of carvone in agriculture sprout - Suppression of potatoes and antifungal a tivity against potato tuber and other plant diseases.Ind,Erops.Prod.4:3-1 .

13. Moustafa, A.F.(l982). Taxonomic studies on the fungi of Kuwait. Aspergilli.J. Uni. Kuwait (Sci)., 9:245-260.

14. Sheppard,H.S.(1995).The Arornat herapy.Practitioners Referense manul
"alum l.Atlantic institut of Aromathorapy.

15. Webb,N; Pitt,W.R.(2004).Eucalyptus oil pisoning in childhood:41 cases in
Southeast Queensland.Iournal ofPaediatrici child health.39:461-480.