التشخيص الكروموتوغرافي لبعض سموم الفطر *Alternaria conjuncta* Simmons المسببة لتبقع اوراق الزيتون النامية في العراق [+]

CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF SOME *ALTERNARIA CONJUNCTA* SIMMONS TOXINS WHICH CAUSED OLIVE LEAVES SPOTS GROWING IN IRAQ

أنور نوري الخيرو [*]

المستخلص :

تمت دراسة سمية الفطر *Alternaria conjuncta* المسبب لمرض تبقع أوراق الزيتون حيث اجري اختبار وقياس السمية لمستخلص مزرعة الفطر ، ثم فصلت بعض المركبات السمية وتم تنقيتها باستخدام عمود الفصل الكروموتوغرافي separation column وهلام السيفاديكس ج – ٥٠ كمادة مالئة وبطريقة الترشيح الهلامي Gel-filteration تم تشخيص المركبات السمية للفطر باستخدام تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وتبين وجود اربعة انواع من المركبات السمية الفطرية تم افرازها في الوسط المغذي للفطر شخص اثنين منها بحامض التنيازونيك Tenuazonic acid والمركب السمي تنتوكسين Tentoxin وتم الكشف عنهما باستخدام كاشفي اليود والاشعة فوق البنفسجية (u.v.) وكانت قيم معدل سرع الجريان لهما متطابقة مع القيم القياسية الموجودة في الادبيات والبحوث العالمية اما المركبين الأخرين فكانا مجهولين .

Abstract :

The studying involved the fungi toxicity of *Alternaria conjuncta* Simmons which caused alternaria spot of olive leaves , the fungi toxicity test was made for fungi media extract , Purification and Separation of fungi toxic compounds were made by separated column and gel-filteration technique , Identification of fungi toxic compounds by Thin Layer Chromotography (TLC)showed that there were four fungi toxic compounds which coming from the fungi at the media , two of toxic compounds were identificated as Tenuazonic acid and Tentoxin , its Rfs values were the same Rfs values presents at the national reviews and the others were unknowns .

المقدمة:

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠١٠/٣/١١ ، تاريخ قبول النشر ٢٠١١/٢/٢٣ .

[*] مدرس/ كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل

يعد مرض تبقع اوراق الزيتون من الامراض المهمة في مشاتل انتاج شتلات الزيتون وبالاخص للشتلات باعمار ٣-٤ سنة والناتجة من اصل خضري ويعد المرض من امراض المجموع الخضري حيث تتعرض الشتلات في المشاتل الى الفطريات الممرضة الهوائية المصدر Airborne وتهاجم هذه الفطريات الاوراق نتيجة لارتفاع الرطوبة النسبية بسبب اعمال الري بالرش اضافة الى تعرض الشتلات الى الامطار المتاخرة في اشهر نيسان ومايس حيث شجعت هذه الظروف الفطر من مهاجمة الاوراق واحداث الاصابة في مشتل مشتل قسم الغابات في كلية الزراعة والغابات / محافظة نينوى ، وقد ظهرت الاعراض المرضية بشكل بقع صغيرة ميتة Necrotic lesions على اوراق شتلات الزيتون وذات لون بني غامق لاتلبث ان تتسع لتصبح واسعة وذات حواف غير منتظمة ثم بتقدم الاصابة تتداخل مع البقع الاخرى من الورقة لتشمل نصف الورقة وبتقدم الاصابة ايضاً تتداخل البقع لتشمل جميع الورقة بحيث تصبح الاوراق في النهايه مشابهة لاعراض لفحة الاوراق leaves blight ثم تجف وتموت .

وقد ذكر[1] بأن الاعراض المرضية في المشتل تبدأ على الاوراق بشكل بقع ذات لون بني فاتح في الاوراق المصابة لاتلبث ان تتسع وتتحول بتقدم الاصابة الى نسيج نباتي ميت ذو لون بني غامق ويمكن انتقال الاصابة من الهواء اوالتربة محدثة الاصابة الاولية للمرض

كذلك بين [2] بأن اعراض التبقع الالترناري في النباتات البستنية الاخرى تظهر بهيئة تبقعات بنية داكنة مستديرة غالبا او غير منتظمة الشكل وقد تتحد البقع مع بعضها لتمثل جزء كبير من نصل الورقة وبتقدم الاصابة تتحوال البقع الى اللون البني الغامق نتيجة لموت الانسجة.

عرفت السموم الفطرية Mycotoxins بأنها مواد تنتج من قبل الكائنات الحية وبخاصة الفطريات منها وتكون ضارة او مميتة لبعض او عموم الكائنات الحية عند التراكيز الواطئة منها [3] ، وان اول من اشار الى التاثير السمي للمواد المفرزة من قبل الفطريات على النبات العالم Debary عام 1886 حيث ذكر ان العديد من الفطريات الأجبارية التطفل تعمل على قتل خلايا النبات ولمسافة ابعد من منطقة الاصابة بعد افرازها مواد سامة **[4]** .

ومن بين الفطريات الممرضة للنبات والمعروفة في انتاجها للسموم عزلات من الفطر *Alternaria alternata* حيث وجد انها تنتج مايقارب الاربعين مركبا" اغلبها ذو تاثير سام للاحياء وقد صنفت هذه المركبات الى مجاميع استنادا" الى تركيبها الكيميائي [5] الى مايلي :

1- Dibenzo – α - pyrones : ومن اهم السموم التي تعود الى هذه المجموعة Altenuene (ALT) و Alternariol (AOH) .

2- Teramic acid : ومن اهم سمومها Tenuazonic acid (TEA) .

3- مشتقات Perylene : ومن اهم سمومها Altertoxin (ATX-1) و Altertoxhn ll (ATX ll) وان هذه السموم فضلا على كونها ذات تاثير سام للنبات Phytotoxins فهي ذات تاثير سام للثديات والاحياء الدقيقة

وقد وضعت في مجاميع حسب شدة سميتها **[5]** تبعا لتسلسلها الاتي :

1- Teramic acid1- : واهم سمومها TEA الذي له تاثير سام مسرطن فضلاً عن ذلك احداثه هلاكات وتشوهات لجرذان التجربة .

2 - Dibenzo - α – pyrones : ومنها سموم (AOH) و alternariol (AME) monomethyl ether و المؤثرة على خلايا الانسان والثديات والبكتريا .

3- مشتقات Perylene ومنها المركبين ATX4 و ATX-ll ذات التاثير المطفر .

ولبعض انواع *Alternaria* القدرة على افراز سموم ذات تخصص عائلي دقيق حيث يفرز الفطر *A.kikachina* مركب AK ضد الكمثرى اليابانية ، ويفرز الفطر *A.mali* المركب AM ضد التفاح **[6]**

وكذلك الفطر *A.citri* وان العزلة التي تصيب اشجار الحمضيات نوع منـدرين mandarina (*Citrus tangerine*) تفرز مواد سامة مؤثرة على نبات المندرين ونفس الوقت يكون هذا السم غير مـؤثر علـى نبـات الليمون الحامض المجعـد والعـدس **[7]** وكـذلك اوضـح وجـود سـلالتين مرضـيتين متميـزتين مـن الفطـر *A.alternata* وكـذلك اوضـح **[8]** بأمكانيـة الفطـرين *Alternaria alternata* و *Alternaria radicola* من انتاج السمين (AME) و (AOH) حيث عزلت هذه الفطريات من جـذور الجـزر المـصابة ، كـذلك تـم عـزل الـسموم الفطريـة (AOH) alternariol و(AME) alternariol monomethyl ether و tenuazonic acid (TEA) مـن انـواع عديدة تابعة لجنس الفطر *Alternaria* خلال عامي ٢٠٠٤- ٢٠٠٥ من قبل **[9]** . كذلك عزلت السموم الفطرية (AOH) و (AME) من راشح الفطر *Alternaria alternata* **[10]** .

المواد وطرق العمل:

أ – العزل وتشخيص الفطر :

تم العزل من اوراق زيتون والتي ظهرت عليها اعراض التبقع ، حيث قطعت اجزاء صـغيرة منهـا بابعـاد لاتتجاوز ٥و٠ سم من المنطقة المحاذية للجزء المصاب من الورقة وعقمت سطحيا" باستخدام محلول ١ % هيبوكلورات الصوديوم ، ثم زرعت في ا طباق بتري قطر ٩ سم تحتوي علـى الوسـط الغـذائي لمـستخلص أجـار البطاطـا والدكستروز PDA المعقم المضاف اليه المضاد الحيوي سلفات الستربتومايسين بمعدل ١٠٠ مـل / لتـر ، حـضنت الاطباق في ٢٤ ± ٢ سيليزية لمدة خمسة ايام وبعد نمو المستعمرات الفطرية عرفت باستخدام المفاتيح التصنيفية وتـم تشخيصها ميكروسكوبياً اعتماداً على المفاتيح التصنيفية الفطرية المعتمدة في الادبيات العالمية حتى مرتبـة االجـنس **[11]** ثم مرتبة النوع وحسب**[12]** .

ب – فحص وقياس السمية لمستخلص مزرعة الفطر :

استخدمت طريقة **[13]** في الكشف عن الفعالية السمية للمواد السامة وذلك بغمر نهاية سويق ورقة الزيتون في حجـم واحد مل من المحلول المراد فحصه او بطريقة النخرة الموضعية وذلك بوضع قطرة من نفس محلول المادة السامة على السطح العلوي للورقة ومن ثم احداث وخزة في موقع القطرة بوساطة ابرة حادة معقمة ، ثم تركت الورقة داخل طبـق بتري حاويا" على ورقة ترشيح مبللة بالماء المقطر وتم قياس شدة السمية باستخدام طريقة التخافيف النهائية استنادا" الى **[14]** حيث جفف المحلول بالماء المقطر الى درجات مختلفة وفحصت سميتها بطريقة غمر سويق الورقة فيها وتسجيل حدوث اوعدم حدوث ذبول وجفاف الورقة النباتية لاعلى درجة من التخفيف خلال ٤٨ ساعة وفي درجة حرارية بـين ٣٠ – ٣٥ سيليزية داخل المختبر **[15]** .

ج- الدراسة السمية للفطر :

1- الحصول على راشح الفطر :

اجريت عملية استخلاص سم الفطر *Alternaria conjuncta* المعزول من شتلات زيتـون يعمر٣ سنوات مصابة بالتبقع الالترناري Alternaria spot تبعا لطريقة **[16]** والمعدلة من قبل **[7]** اذ تـم تنمية الفطر على الوسط الغذائي السائل جابكس دوكس CZD المضاف اليه كبريتات الخارصين بمعـدل ٥ملغـم/لتـر والمدعم بالمضاد الحيوي سلفات الستربتومايسين بمعدل ٥٠ ملغم/لتر في اوعية زجاجية سعة (١٠٠٠مـل)

وبمقدار ٥٠٠مل/وعاء ، لقح الوسط باقراص (قطر٢ملم) ماخوذة من حافة مستعمرة نامية على الوسط الغذائي PDA بعمر ثلاثة ايام من الفطر *Alternaria conjuncta* وضعت الاوعية في حضان درجة حرارته ٢٧م لمدة ٢٤يوما ثم رشحت المزارع الفطرية باستخدام ورق ترشيح نوع Zelpa (سمك ٣٣و٠ملم) موضوعة في قمع بخنر محمول على دورق ايرلنماير ، سرع الترشيح باستخدام جهاز الضغط المخلخل نوع Vacuubran الماني الصنع . تم جمع ٥و٠لترمن راشح مزرعة الفطر وعدلت درجة حموضته الى ٦و٣ باستخدام حامض الخليك وباستخدام جهاز pH meter نوع صيني .

2- استخلاص السموم بالمذيبات العضوية :

. استخلصت المواد السامة من مزرعة الفطر *Alternaria conjuncta* بمزج الراشح الخام مع حجم متساوي من الميثانول **[17]** لغرض ترسيب البروتينات حيث ترك المزيج في درجة حرارة ٥ سيليزية لمدة ٢٤ ساعة وازيل الراسب المتكون بعد المعاملة بوساطة المنبذة بسرعة ٤٥٠٠ دورة / دقيقة لمدة نصف ساعة وتم تركيز الرائق الى ٢٥ مل في جهاز المبخر الفراغي الدوار Vacuum evaporator على درجة حرارة ٤٥ سيليزية مزج مع ٥٠ مل من الكلوروفورم في قمع الفصل وتم الرج لمدة ١٥ دقيقة ، ثم ترك لفترة حتى ركد المزيج وانفصل الى طورين ، جمع كل من الطور العضوي (الكلوروفورم) والطور المائي لوحده ، ثم كررت هذه العملية ثلاث مرات وتم خلالها تبخير الكلوروفورم من الطور العضوي واذيب المتبقي في ٢ مل ماء مقطر ثم غسل بالماء المقطر واعيد تجفيفه واذابته قي ٢ مل ماء مقطر ، وقد تم اهمال هذا الجزء بعد التاكد من عدم سميتة ، كذلك وبالمثل تمت معاملة الطور المائي وتركيزه لحين زوال الكلوروفورم منه وحجمه ٢٠ مل وبعد الكشف عن سميته تم التاكد من احتوائه على مواد سامة عن طريق معاملة قطرات من محلوله المائي باوراق زيتون حديثة العمر حيث احدث نخرات موضعية فيها بعد مرور ٢٤ ساعة من المعاملة . ثم استخلصت المواد السامة من هذا الطور مرة اخرى وذلك بمزجه مع ٥٠ مل من بيوتانول مشبع بالماء المقطر في قمع الفصل ثلاث مرات ومن ثم جمع الطور المائي في كل مرة وبعد فحص هذا الطور تبين انه خالي من المواد السامة وبنفس الطريقة السابقة من معاملة الاوراق لذلك اهمل هذا الطور ، اما الطور العضوي أي البيوتانول ، فقد تم تجفيفه في درجة حرارة ٤٥ سيليزية في جهاز التجفيف الفراغي ثم غسل الراسب المتبقي مرتين بالماء المقطر واعيد تجفيفه مرة اخرة لازالة جميع البيوتانول ثم اذيب في ٢ مل ماء مقطر وتم التاكد من احتواءه على المواد السامة من خلال اختبار النخرة الموضعية على اوراق الزيتون وبنفس الطريقة السابقة ايضا" وسمي الراشح في هذه المرحلة بالراشح المصفى بالبيتانول .

3 - فصل وتنقية المواد السامة بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي وتشخيصها :

. اجريت عمليتي الفصل والتنقية للمركبات السمية الفطرية باستخدام ١٨غم من الهلام سيفاديكس ج - 50 sephadex gel G-50 المصنع من قبل شركة Fine Chemicals Pharmacia السويدية مع كل فطر لوحده وذلك بعد نقع الهلام في الماء المقطر لمدة ٢٤ ساعة وتهيئة عمود من الهلام بابعاد ٩٥ × ٢ سم داخل عمود زجاجي طوله ١٠٠ سم وقطره ٢ سم من الخارج ثم أضيف اليه ٢ مل من راشح الفطر المصفى بالبيوتانول وبعدها شطف بالماء المقطر لغرض الفصل ، وجمع السائل الخارج من العمود في انابيب سعة ٥مل في جهاز جامع الاجزاء Multirac 2111 المجهز من قبل شركة LKBوانتهت عملية الفصل بعد جمع ٢٠٠ جزء ويمكن جمع الاجزاء يدويا في حالة عدم توفر الجهاز ، وتم فحص سمية كل جزء على حدا وذلك بغمرنهاية ورقة الزيتون لمدة ٢٤ساعة فيها والتاكد من نقاوتها بالسم الفطري واجري اختبار فحص النقاوة عن طريق تقسيم كل جزء متحصل عليه الى جزئين احدهما نقي والاخر يتم غمر سويق ورقة الزيتون فيه لمدة ٢٤ساعة ثم ملاحظة االتاثير السمي للجزء وتم اعتماد دليل للتاثير السمي على الاوراق بحساب النسبة المئوية لفقدان الكلوروفيل المحطم من الورقة

المعاملة واجري هذا الاختبار لجميع الاجزاء الخارجة من عمود السيفاديكس . ثم اجري الفحص لكل جزء فعال في تاثيره على الاوراق وصنفت الاجزاء السمية الفعالة الى اربعة مجاميع (فئات) اعتمادا على تاثيرها في شدة الاعراض على الورقة المتمثل بمساحة الجزء الذي تغير من كلوروفيل الورقة بعد ٢٤ ساعة من غمر سويق ورقة الزيتون .
وتم تشخيص المركبات السمية بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromotography (TLC) وذلك بوضع مايكروليتر من الجزئين الفعالين من السم تحت الاختبار على ارتفاع ٢سم من الحافة السفلى لصفيحة (TLC) وباستخدام نظام مذيب الفصل المكون من كلوروفورم : ايثانول : حامض الخليك بنسبة ١:٣:٣٢ (حجم:حجم:حجم) لاختبار الجزئين الفعالين من السم الفطري ولمدة اربعة ساعات بعدها جففت الصفائح وتم الكشف عن المواد السامة المفصولة بشكل بقع صفراء باهتة على الصفائح وذلك بتعريض صفائح ال TLC الى بخار اليود بعد وضعها في الديسيكيتر الحاوي على بلورات اليود حيث اقفل بالغطاء وترك لفترة ٣٠ دقيقة حيث يعمل بخار اليود المتسامي في اظهار البقع على الصفيحة وتم حساب معدل سرع جريان Rate of flow (R_f) البقع علاوة على ذلك فقد امكن زيادة اظهار البقع بوساطة تعريض الصفيحة الى ضوء الاشعة فوق البنفسجية u.v.lamp بطول موجي ٣٦٠ مليميكرون **[18]** .

النتائج والمناقشة :

العزل وتشخيص الفطر :

1 – العزل :

تبين من نتائج العزل من اوراق الزيتون عزل الفطر *Alternaria conjuncta* الشكل (1) من اوراق الزيتون المصابة بالتبقع ، ويعد الفطر من الفطريات المسجلة لأول مرة في العراق على اوراق الزيتون ، وقد سبق ان سجل عالمياً على نباتات الجز الابيض *Pastanica sative* والجزر البري Wild parsnip **[12]** ، كذلك فقد سجلت انواع اخرى تابعة لنفس جنس Alternaria محلياً مثل الفطر *Alternaria tenue* وعلى اوراق الحمضيات **[19]** و **[20]** وعالمياً **[21]** مثل النوع *Alternaria alternata* وقد أظهرت نتائج التشخيص للفطر *Alternaria conjuncta* اعتماداً على مفاتيح التصنيف العالمية والمعتمدة حتى مرتبة الجنس **[11]** تطابقاً مع جنس Alternaria وكذلك اظهرت نتائج تشخيص الفطر حتى مرتبة النوع مطابقة للفطر *Alternaria conjuncta* وذلك حسب تصنيف **[12]** حيث تم مقارنة شكل وحجم الابواغ وقياس ابعادها اضافة الى الصفات الاخرى مع ماموجود في التصنيف العالمي المذكور لهذه المرتبة التصنيفية .

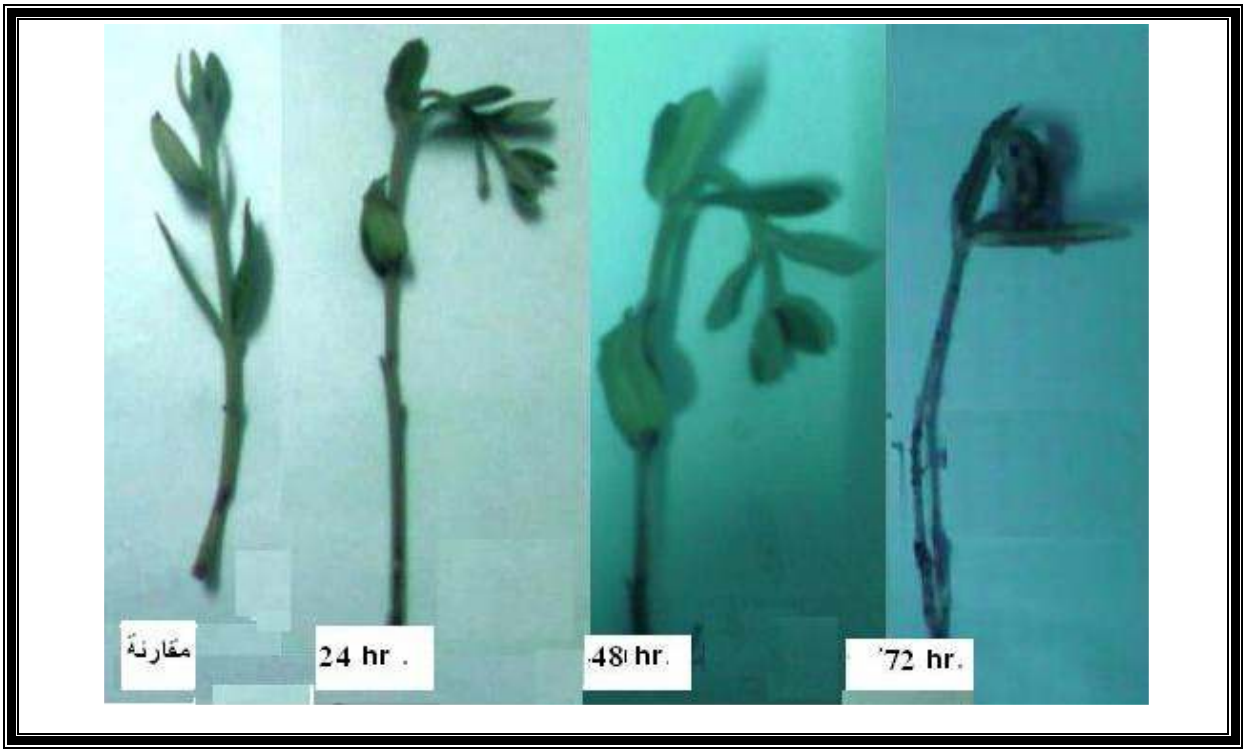
وقد بين تصنيف **[12]** مواصفات مرتبة النوع *Alternaria conjuncta* وكما يلي :
الكونيديا الناضجة ذات ابعاد ٣٠ – ٤٥ × ١٠ – ١٢ ميكروميتر وذات شكل بيضوي متطاول ذو سطح خشن وذات لون اصفر شفاف داكن ، الجدر العرضية للكونيديا تصل اعدادها الى سبعة جدر في حين مقسمة طوليا ١ – ٢ وترتبط الكونيدات مع بعضها مكونة سلاسل بسيطة تحتوي ٤ – ٥ كونيدات وتتفرع الى فروع قد تصل الى ٢٠ – ٣٠ سلسلة ، الحامل الكونيدي ذو ابعاد ٤× ١٥٠ ميكرون واحيانا متفرع والحوامل الكونيدية الثانوية تصل الى اكثر من ١٠٠ حامل كونيدي ثانوي وتظهر منبعثة من الخلايا القمية .

الشكل (1) : ابواغ الفطر *Alternaria conjuncta* كما تبدو تحت المجهر وبقوة تكبير 500 مرة .

2 – الدراسة السمية للفطر :

أ – استخلاص السموم بالمذيبات العضوية:

أظهرت نتائج استخلاص السموم بالمذيبات العضوية بان معاملة الراشح الخام بالميثانول ادى الى ترسيب المواد البروتينية واظهرت نتائج فحص هذه المواد المترسبة عدم احتوائها على مواد سامة ، وبعد المعاملة بالكلوروفورم فان الفعالية السمية بقيت في الطور المائي على الرغم من بقاء بعض الاصباغ في جزء الكلوروفورم وعلى العكس من ذلك فان معاملة الراشح بالبيوتانول المشبع بالماء فان الفعالية السمية قد ظهرت في طور البيوتانول ولم تظهر في طور الماء مما يشيرالى ان قابلية ذوبان المواد السامة في البيوتانول اكثر بكثير من قابليتها على الذوبان في الماء وقد اطلق على راشح مزرعة الفطر في هذه الحالة اسم الراشح المصفى بالبيوتانول ، وكان التاثير الواضح هو سريان المادة السمية في عرق الورقة وموت العرق الوسطي تدريجيا من الاسفل الى الاعلى ومن ثم العروق المتفرعة منه واسودادها وذلك حدث في فترات زمنية متباينة وكما في الشكل (2) .



الشكل (2) : اعراض سمية الجزء 47 من السم الفطري ولفترات زمنية مختلفة من الغمر على اوراق الزيتون تحت ظروف المختبر .

وقد سبق ان استخدمت هذه الطريقة في فصل السموم الفطرية من قبل العديد من الباحثين عالمياً و محلياً فقد قام ابراهيم **[20]** باستخلاص سموم الفطر *A. citri* من اوراق الحمضيات واوضح بأن لراشح الفطر المذكور تأثير سمي في اوراق الحمضيات محدثاً نخرات موضعية وتحللاًفي كلوروفيل الورقة ، كذلك استخدمت نفس الطريقة في فصل سموم الفطر *Nattrassia mangiferae* من قبل **[11]** وفصل سموم الفطر *N.toruloidae* من قبل **[22]**) وكذلك فصل سموم الفطرين *Nattrassia mangiferae* و *Phoma exigua* **[23]** .

ب – فصل وتنقية المواد السامة بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي :

تبين من عمليتي الفصل والتنقية للمواد السامة وبعد جمع كل جزء خارج من عمود السيفاديكس Cephadex بحجم ٥ مل واختبار سمية كل جزء لمعرفة احتوائه على الفعالية السمية وذلك تبعاً" لطريقة **[3]** عن وجود اجزاء فعالة من المادة السمية وبخاصة بعد فحص الاجزاء ٣٧–٧٥ وحددت الاجزاء الفعالة من المادة السمية في الاجزاء ٣٥–٥٢ بالنسبة للفطر *A.conjuncta* حيث ظهرت عليها اعراض سمية على اوراق الزيتون من خلال تكسر كلوروفيل الورقة وتحول لونه الاخضر الزاهي الى البني الغامق وبدرجات متباينة وخلال فترات زمنية متباينة ، وسمي هذا الجزء بالجزء الحامضي Acidic fraction وكان الاس الهيدروجيني لها (pH 3.3) .

ان التقارب في الخروج للاجزاء السمية من عمود السيفاديكس ربما يشير الى تقارب الوزن الجزيئي لهذه الاجزاء والمواد السامة الموجودة فيها .

وقد تبين من اختبار الاجزاء السمية المستحصلة من عمود السيفاديكس الهلامي بان الجزء السمي **(47)** من مستخلص السم الفطري اظهار اعلى شدة اصابة لاوراق الزيتون المعاملة بالاجزاء السمية وكما في الجدول (1) .

الجدول (1) : دليل شدة اصابة الاوراق بالمستخلص السمي مختبريا" [24] .

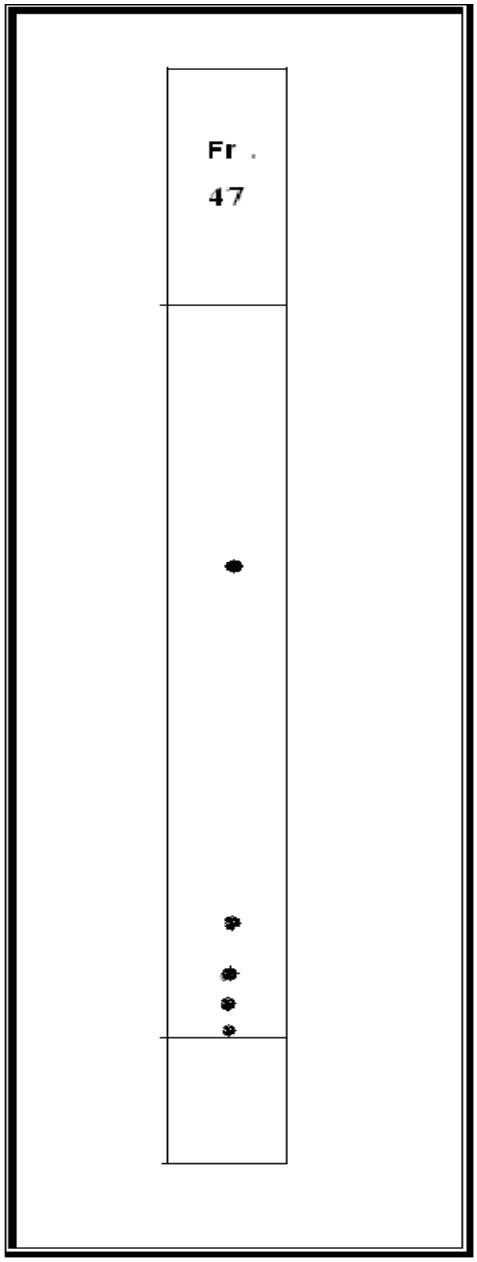
دليل الاصابة (الفئات)	% للجزء المتلون من النصل
1	%25-1
2	%50-26
3	%75-51
4	%100-76

ج – تشخيص سموم الفطر *Alternaria conjuncta* :

اظهرت نتائج فصل سم الفطر *Alternaria conjuncta* المعزول من شتلات الزيتون على صفائح الكروموتوغرافيا الورقية وباستخدام كاشفي اليود والاشعة فوق بنفسجية u.v الجدول (2) وجود العديد من المركبات السمية الفطرية في الجزء السمي 47 ، واظهرت نتائج اختبار الكرومتوغرافيا الورقية للجزء السمي 47 الشكل (3) من سم الفطر *Alternaria conjuncta*. وجود اربعة انواع من البقع (المركبات) بمعدلات جريان (Rfs) 0.04 و0.07 و 0.15 و 0.60 حيث شخص المركب ذو قيمة الجريان 0,07 بكاشف اليود بمركب Tenuazonic acid حيث كان لون البقعة بني غامق وكانت قيمته مطابقة لقيمة المركب القياسية (0.07) في حين شخص المركب ذوقيمة الجريان Rf (0.15) بمركب Tentoxin والذي اظهت بقعتة توهجا واضحاً وبلون بنفسجي فاتح وكانت قيمته مطابقة لقيمة معدل سرعة جريان المركب القياسي (0.15) وباستعمال كاشف الاشعة فوق البنفسجية ، اما المركبين الاخرين فكانا مجهولان وذلك لعدم تطابق قيم الجريان لهما مع المركبات السمية القياسية الموجودة في البحوث والادبيات .

جدول (2) : بعض قيم معدل سرعة الجريان (Rf s) للمركبات السمية للفطر *Alternaria conjuncta* المقاسة مع القياسية المتحصل عليها من قبل [25] .

الكاشف Reagent	معدل سرعة الجريان القياسي St. R_{fs}	معدل سرعة الجريان المقاس R_{fs}	الجزء السمي	المركب السمي
اليود	غير معروف	0.04	47	مجهول
اليود	0.07	0.07	47	Tenuazonic acid حامض التنيازونيك
الأشعة فوق البنفسجية U.V	0.15	0.15	47	Tentoxin تنتوكسين
الأشعة فوق البنفسجيةU.V	غير معروف	0.60	47	مجهول



الشكل (3) : كروموتوغرام التشخيص الكروموتوغرافي للجزء السمي 47 من سموم الفطر *Alternaria conjuncta* باسخدام تقنية الطبقة الدقيقة وباستخدام مذيب الفصل كلوروفورم : ايثانول: حامض الخليك بنسب 32 : 3 : 1 ح/ ح/ ح باتستخدام كاشف فانيلين – حامض الكبريتيك .

المصادر :

1- Chester , *Nature prevenation & Pant Disease* , McGraw , Hill , 525pp . 1950 .

2- ديوان ، مجيد متعب ، والبهادلي ، علي حسين ، *امراض النبات* ، الجزء النظري ، مطبعة مؤسسة المعاهد الفنية ، مؤسسة المعاهد الفنية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ،1984 .

3 - Graniti , A . *The evalution of the toxin concept in plant pathology In phytotoxin Plant Diseases* . (R . K . S . Wood . A . Ballio , and Graniti eds.) PP.1 – 18 . Academic Press , London & New York . 1972 .

4 - Daniel, R. *Fundamentals of plant pathology* . W. H. Freman . 642pp. 1984 .

5 - Shade, J. E. and JR. A. R.. " Analysis of the major *Alternaria* toxins " *J. Food Protect* , Vol. 47: 978 – 995 . 1984 .

6 - Sheffer, R. P. and S. P. Briggs . *Introduction aperspective of toxins studies in plant pathology* p 1-20 . In. Durbin R. D. . Toxins in plant disease Academic Press Inc. 515p. 1981

7 - Kohmoto,K. ;Y. Iton; N. Shimomura; Ykondon; H. Otani;M. Kodama; S. Nishimura and S. Nakatsuka " Isolation and biological activities of two host specific toxin from the tangerine pathotype of *Alternaria alternate* " *Phytopathology* Vol. 83:495-502. 1993 .

8 - Solfrizzed, M. ; A. De Girolamo ; C. Virri ; K. Tylkowska ; j. Grabarkiewicz-Szczesna ; D. Szopinska and h. Dorna Toxic Profile of *Alternaria alternate* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants . Food Additives and contamination Vol. 22 : 302-308 . 2005 .

9 - Azcarate , M . P . , A . Patriareca , L . Terminiello and Vernandezpinto . " Research Note ***Alternaria*** Toxins in Wheat during the 2004 to 2005 Argentinean Harvest " *Journal of Food Protection* . pp. 1262 -1265. 2008 .

10-Tylkowska, K.; A. Bagniewska-Zadworna ; J. Grabarkiewicz- Szczesna ; D. Szopinska ; H. Dorna and E. Zenkteler . Histopathology of *Dacus carota* L. Root cells treated with toxic metabolites produced by *Alternaria radicina* and *A. alternate* . Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 50/1: 27-34 . 2008 .

11 - Barnett, H. L. and B. B. Hunter " Illusrated genera of Imperfect fungi " Burgess Publishing Company 241 pp. 2006 .

12 - Simmons, E. G. Alternaria themesand variations , Mycotaxon Vol .25: 294 – 296 . 1993

13 - Yoder, O. C. " Toxins in pathogenesis " Ann. Rev. Phytopathol. , Vol. 18 : 103 – 129. 1980 .

14 - Ries, S. ; M. Gray and A. S. and A. Strobel " Aphytotoxic glycopeptide from cultures of *Corynebacterium insidiosium* " *Plant Physiology* , Vol. 49: 676 - 684. 1971.

15- القصاب ، رضا حيدر عبد المطلب . *تنقية وتشخيص السموم التي يفرزها الفطر Hendersonula toruloidae* . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة صلاح الدين ، العراق . 1986 .

16 - Gardner,J.M; Y. Kono; H. Tatum; Y. Suzuk and S. Takeuchi. " Plant pathotoxins from Alternaria citri *: The major toxin specific for rough lemon plant "* Phytochemistry *, Vol. 42 :2861-2867. 1985 .*

17 - Wolpert, T. J. and L. D. Dunkle. Purfication and partial characterization of host – specific toxins produced by *Periconia circinata* .Phytopathology 9:872-875 .1980 .

18 - Harborne, J. B. *Phytochemical methods* , Halsed Press , A Division of John Wiley and Sons Inc. New York 1973 .

19 – Mustafa, F.H. *Alist of common plant diseases in Iraq*.225pp. 1974.

20- ابراهيم ، بسام يحيى. *دراسة مرضية وسمية الفطر Alternaria citri على الحمضيات* ، رسالة ماجستير ، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل ، العراق . 1996 .

21 - Muther, R. S. . *The fungi and plant diseases in Iraq* . 90pp. 1968 .

22-محمد ، نضال يونس " *تسجيل اول ذبول الافرع الهندرسونيولي على اشجار الجنار في العراق* " مجلة زراعة الرافدين المجلد33 العدد 3 : 106 – 133 ، 2006 .

23- الخيرو ، أنور نوري محمد . *تشخيص بعض سموم الفطرين Phoma exigue و Nattrassia mangiferae والدفاعات المستحثة بهما في اليوكاليبتوس والجنار* . اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة والغابات . جامعة الموصل ، العراق . 2009 .

24 - Large, E. C. " Measuring plant disease " Annual Review of *Phytopathology* " Vol. 4 : 9 – 28 . 1966 .

25 - Centeno , S . and M. A. Calvo " Mycotoxins produced by fungi isolated from Wine cork stoppers " *Pakistan Journal of Nutrition* " Vol. 6 : 267-269 , 2002 .