التشخيص الكروموتوغرافي لبعض دفاعات الزيتون *Olea europaea* المستحثة بسموم الفطر *Alternaria conjuncta* Simmons [+]

CHROMOTOGRAPHIC IDENTIFICATION OF SOME OLIVE (*0LEA EUROPAEA*) COMPOUNDS DEFENCE INDUCED BY *ALTERNARIA CONJUNCTA* SIMMONS TOXINS

أنور نوري الخيرو [*] أياد جاجان الداؤدي [**]

المستخلص :

بينت دراسة الدفاعات المستحثة بفعل سموم الفطر *Alternaria conjuncta* المعزول من اوراق الزيتون المصابة بالتبقع استحثاث المركبات الدفاعية كحامض الكاليك Gallic acid وحامض الايلاجيك Ellagic acid و (+) ابيكاتيكين Epicatechin و (−) كالوكاتيكين Gallcatechin وتشخيص هذه المركبات عند الحقن بالسمين الفطريين تنتوكسين Tentoxin وحامض التينيوزونيك Tenuazonic acid فقط وتكرر ظهور حامضي الكاليك والايلاجيك في معاملة المقارنة ومعاملة الحفن بالسم الفطري في حين ظهرت ايضاً مركبات (−) ابيكاتكين و(−) كالوكاتكين في معاملة المقارنة لكونهما من المركبات الدفاعية المستحثة واستناداً الى تقنية الفصل المستخدمة ، كذلك اظهرت نتائج تشخيص حامض الكاليك ظهور بقعة صفراء غامقة واعطت تقارباً في قيمة معدل سرعة الجريان (Rf) للحامض مع قيمة معدل سرعة الجريان للمادة القياسية من حامض الكاليك وذلك بعد اختبارهما بتقنية كروموتوغلرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام مذيب الفصل نفسه (بيوتانول : حامض الخليك : ماء بنسب ٤ :١ :٥ حجم / حجم / حجم) وباستخدام كاشف بلورات اليود .

Abstract :

The studying aimed to study the induced defence compounds which induced by *Alternaria conjuncta* toxins and its identification in olive(*0lea ouropeana*) leaves , the compound were Gallic acid , Ellagic acid , (+) Epicatechin and Gallocatechin , these compounds were appeared as a results of injection by Tentoxin and Tenuazonic acid toxins only . Gallic and Ellagic acid were appeared twice with control treatment and fungi toxin treatment wherease (-) Epicatechin and (-) Gallocatechin appeared in control only .

The results showed identification of Gallic acid which was the same of Rf value with standered value when it was measured at Thin Layer Chromotochraphy (TLC) by the solvent system Butanol : Acetic acid : Distillated water at the ratio (4 : 1 : 5 , v /v/v) and using iodine indicater .

المقدمة :

[+] تاريخ استلام البحث : ٢٠١٠/٣/١١ ، تاريخ قبول النشر : ٢٠١٠/١١/٢٤

[*] مدرس / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل

[**] أستاذ / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل

عرفت المركبات الفينولية Phenolic compounds بأنها مركبات ايضية تتراكم في خلايا معينة بعد اصابة المسبب المرضي للنبات وتتحول الى اللون البني عند تعرضها للاكسدة ، وتعد اساساً لمعظم الدفاعات المتكونة في النبات وتلعب دوراً مهماً في عمليات الاكسدة والاختزال [1] ، اما كيميائياً فقد عرفت بأنها مركبات تتواجد بمدى واسع في الاجزاء النباتية وتمتلك في تركيبها الكيميائي المألوف الحلقة الاروماتية حاملة مجموعة هيدروكسيلية واحدة او أكثر وتتواجد ذائبة في الماء ومرتبطة مع السكر في النسيج الخلوي بشكل كلايكوسيدات [2] .
وقد تم تقسيم الفينولات كيميائياً من قبل العديد من الباحثين والذين تشمل تقسيماتهم مايأتي:

١ – <u>الفينولات والاحماض الفينولية</u> :

توجد المركبات الفينولية في النبات بعدة أشكال منها ماهو بسيط التركيب كالفينولات البسيطة مثل مركبي الهيدروكينون Hydroquinone الاربيوتين Arbutine ومنها ماهو يشكل أحماض فينولية ذائبة او مرتبطة مع اللكنين بشكل استر او توجد غير ذائبة في الكحول مثل حامض الفانيليك Vanillic acid وحامض البروتوكاتويك Protocatchuic acid وحامض باراهيدروكسي بنزويك Para hydroxyl benzoic acid وكذلك حامضي الكاليك والايلاجيك Gallic Ellagic Acid, واللذان يوجدان في المادة الخشبية للنباتات بشكل كالوتانين Gallotannin وايلاجيتانين Ellagitannin [2] .

٢ – <u>بروبنزان الفينيل والكومارينات :</u>

تتواجد بروبنزات الفينيل طبيعياً بشكل مركبات فينولية والتي تمتلك حلقة اروماتية متصلة بسلسلة جانبية مكونة من ثلاث ذرات كاربون وان هذه المركبات مشتقة من التخليق الحيوي للاحماض الامينية ذات البروتين الاروماتي [3] ، ومن اهم هذه المركبات هي احماض الهيدروكسي سينامك Hydroxycinnamic وهي اربعة مركبات تكون بشكل C6- C3 وهي حامض االفريوليك وحامض السيناميك والامبيليفيرون والسكوبولتين والسكوبولين ويطلق على الثلاثة الاخيرة بالكومارينات.

٣ – <u>الصبغات الفلافينويدية :</u>

وهي فلافينويدات مستقلة جمبعها من مركبات الفلافون وتشمل على الاقسام التالية :
الانثوسيانيدات Anthocyanids والفلافونونات Flavonons والفلافونات Flavons والفلافونات السكرية Glucoflavons والجالكونات Chalcons والايوزفلافونات Isoflavons ، وان المركبات الفلافينويدية هي مركبات فينولية تتغير الوانها عند الكشف عليها بواسطة الامونيا مما يسهل عملية الكشف عنها وتكون موجودة في النباتات مرتبطة مع وحدة سكر وعلى شكل كلايكوسيدات [3] .

٤ – الصبغات الكينونية Quinones Pigments

تكون الصيغات الكينونية الطبيعية ذات الوان تتراوح من الاصفر الفاتح الى الاسود وهي اكثر من ٤٥٠ مركباً معروفاً على الرغم من كونها موزعة في النبات الا انها تختلف من حيث التركيب والتوزيع في النباتات لراقيه ، حيث توجد في السيقان والجذور وفي الانسجة الاخرى فضلاً على تواجدها في الاوراق حيث تكون ملونة لاحتوائها على المجاميع الملونة ، فمثلاً البنزوكينون يحتوي على مجموعتين من الكربونيل متصلة بشكل تبادلي مع الاصرة المزدوجة (– c=c –) ومن اهم المركبات الكينونية البنزوكينونات والنفثاكينونات الانتراكينونات ، وان اغلب هذه المركبات تتواجد في النباتات بشكل كلايكوسيدات وبالامكان اجراء عملية التحلل الحامضي للحصول عليها بشكل حر [4] .

٥ – الكومارينات Coumarins .

وتشمل على مركبات الهيدروكسي كومارينات Hydroxycoumaric مثل حامضي الكيوماريك Coumaric acid والكافيك Caffeic acid ثم مركبات الفيورانوكومارين Furanocoumarins والتي تكون يشكل دهون (Lipids) ومنها مركبات امبليفيرون Umbelleferone وسكوبولتين Scopoltine وسكوبولين Scopoline [5].

ومن بين الفطريات الممرضة للنبات والمعروفة في انتاجها للسموم انواع من الفطر *Alternaria sp.* حيث وجد انها تنتج مايقارب الاربعين مركبا" اغلبها ذو تاثير سام للاحياء ، وقد وضعت في مجاميع حسب شدة سميتها **[6]** تبعا لتسلسلها الاتي :

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

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

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

واوضح **[7]** بأمكانية الفطرين *A. alternata* و *A.radicola* من انتاج السمين (AME) و (AOH) حيث عزلت هذه الفطريات من جذور الجزر المصابة ، كذلك قام بعزل السموم الفطرية (AOH) alternariol و alternariol monomethyl ether(AME) و tenuazonic acid(TEA) من انواع عديدة من الفطر *Alternaria* خلال عامي ٢٠٠٤- ٢٠٠٥ من قبل **[8]** . كذلك عزلت السموم الفطرية (AOH) و (AME) من راشح الفطر *A.alternata* **[9]** .

الدفاعات المستحثة والموجودة اصلا" في النبات :

يحتوي النبات على العديد من الدفاعات النباتية التي تكون بشكل مركبات كيميائية ذات طبيعة فينولية والتي تكون موجودة اصلا" في النبات مع امكانية استحثاثها عند الاصابة ويستخدمها النبات في مقاومة مسببات الامراض النباتية ومن هذه المركبات حامض الكاليك Gallic acid والذي يعد من المركبات الدفاعية الموجودة اصلا" في النبات فضلا" عن امكانية استحثاثه في النبات عند عدم وجوده فيه ويعّد من الحوامض المسؤولة بصورة مباشرة في مقاومة السموم الفطرية ويتم تخليقه من المركبات الوسطية (DHS) 5- hydroshicmate وعند تعرض النبات للاصابة يقوم النبات باكسدة اواصر ارتباط وحدات الكاليك او اكسدة الحلقات الاروماتية **[10]** ، ويتكون اساسا" من تحلل التانين من نوع الكالوتانين المكون من جزيئة سكر مرتبطة بحامض الكاليك في جميع المواقع الفعالة **[11]** ، ويعد حامض الايلاجيك Ellagic acid الوحدة الاساسية المكونة للايلاجيتانين Ellagitannin المكون للتانين المتحلل وهو من المركبات الدفاعية الموجودة في اشجار اليوكاليبتوس نوع *Eucalyptus camaldulensis* **[12]** .

كذلك يعد مركب (+) كالوكاتكين Gallocatechin من المركبات الدفاعية التي تم استخلاصها من اشجار البلوط والتي تنتمي الى تانين البلوط **[13]** .

ويعد مركبا الافزلكين Afzelechine والابيفزلكين Epiafzelechine من مركبات البروانثوسيانيد التي تم استخلاصهامن قلف جذور اشجار *Joannesia princeps* ذوات البذور الغنية بالزيت **[14]** كما ان مركب الابيكاتكين من المركبات الفينولية التي تقع ضمن مجموعة الفلافونول وقد تم استخلاصه من ثمارالافوكادو الناضجة وهو يستحث في الثمار بفعل مهاجمة الفطريات غير الممرضة ويعمل المركب بعد استحثاثه على تثبيط عمل نشاط انزيم Lipoxoygenase وبالنتيجة يعمل عل تحلل المضادات الفطرية Antifungal dieane وبذلك يعمل على منع حدوث تعفن الثمار ضد فطريات الانثرا كنوز [1] .

المواد وطرائق العمل :

العزل وتشخيص الفطر:

اجري عزل الفطر *Alternaria conjuncta* من اوراق زيتون مصابة بالتبقع ، قطعت الاوراق المصابة الى قطع صغيرة بابعاد لاتتجاوز ٥و٠ سمومن المنطقة المحاذية للاصابة وتم التعقيم السطحي للقطع بغمرها في محلول ١ % هيبوكلورات الصوديوم ، ثم زرعت في ا طباق بتري قطر ٩ سم تحتوي على الوسط الغذائي لمستخلص البطاطا والدكستروز PDA المعقم المضاف اليه المضاد الحيوي سلفات الستربتومايسين بمعدل ١٠٠ مل / لتر ، حضنت الاطباق في ٢٤ ± ٢ سيليزية لمدة خمسة ايام وبعد نمو المستعمرات الفطرية تم تنقية الفطر وتشخيصه ميكروسكوبياً اعتماداً على المفاتيح التصنيفية الفطرية المعتمدة في الادبيات العالمية حتى مرتبة االجنس **[15]** ثم حتى مرتبة النوع حسب**[7]** .

الدراسة السمية للفطر :

أ- الحصول على راشح الفطر :

اجريت عملية استخلاص سم الفطر *Alternaria conjuncta* المعزول من شتلات زيتون يعمر٣ سنوات مصابة بالتبقع الالترناري Alternaria spot تبعا لطريقة **[16]** والمعدلة من قبل **[17]** اذ تم تنمية الفطر على الوسط الغذائي السائل جابكس دوكس CZD المضاف اليه كبريتات الخارصين بمعدل ٥ملغم/لتر والمدعم بالمضاد الحيوي سلفات الستربتومايسين بمعدل ٥٠ ملغم/لتر في اوعية زجاجية (سعة ١٠٠٠مل) بمقدار 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 .

ب - استخلاص سموم الفطر *Alternaria conjuncta* بالمذيبات العضوية :

اجري استخلاص للمواد السامة من مزرعة الفطر *Alternaria conjuncta* بمزج الراشح الخام مع حجم متساوي من الميثانول وحسب طريقة **[18]** لغرض ترسيب البروتينات حيث ترك المزيج في درجة حرارة ٥ سيليزية لمدة ٢٤ ساعة وازيل الراسب المتكون بعد المعاملة بوساطة المنبذة نوع 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 بالطريقة السابقة ايضا" وسمي الراشح في هذه المرحلة بالراشح المصفى بالبيتانول .

ج – فصل وتنقية المواد السامة بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي وتشخيصها :

اجريت عمليتي الفصل والتنقية للمركبات السمية الفطرية حسب طريقة **[18]** ايضاً وذلك باستخدام ١٨غم من الهلام سيفاديكس ج – 50 G sephadex gel المصنع من قبل شركة Fine Pharmacia Chemicals السويدية مع كل فطر على حدا 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 ضيف 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 وقد اعطى الجزء (٤٧) اعلى شدة اصابة وكما في الجدول (١) .

الجدول (١) : دليل شدة اصابة الاوراق بالمستخلص السمي مختبريا" [13].

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

وتم تشخيص المركبات السمية بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromotography (TLC) وتم تجفيف الصفائح والكشف عن المواد السامة المفصولة بشكل بقع صفراء باهتة وتم حساب معدل سرع جريان Rate of flow (R_f) للبقع علاوة على ذلك فقد امكن زيادة اظهار البقع بوساطة تعريض الصفيحة الى ضوء الاشعة فوق البنفسجية u.v.lamp بطول موجي ٣٦٠ مليميكرون .

اعتمد في تشخيص السموم الفطرية على قيم سرع الجريان المعتمدة في الجداول الفياسية للمركبات السمية الفطرية وحسب ماذكره **[19]** من نظام الفصل المتبع وقيم سرع الجريان العالمية المعتمدة لهذه السموم الفطرية وكذلك درجة الحرارة المستخدمة عند نفس الاختبار .

دراسة الدفاعات النباتية المستحثة في اوراق الزيتون :

١- دراسة المركبات الفينولية المستحثة بتاثير سموم الفطر وتشخيصها :

تم التحري عن الدفاعات المستحثة بفعل بعض سموم الفطر *Alternaria conjuncta* بأستخدام شتلات زيتون نوع *Olea europeana* منماة مسبقاً تحت ظروف البيت البلاستيكي في اكياس نايلون وبعمر ثلاث سنوات .

استخدمت طريقة [20] مع بعض التحويرات في حقن ٥٠ مايكروليتر في العرق الوسطي للورقة بالجزء السمي (٤٧) من سموم الفطر *A.conjuncta* والذي سبق ان شخص مسبقاً باحتوائه على السمين الفطريين Tentoxin و Tenuazonic acid وتم الحقن باستخدام محقنة معقمة distillated injection needle الى عشرة تقسيمات بحيث كل تقسيم يمثل ١٠٠ مايكروليتر وكررت العملية ولكن باستخدام الماء المقطر المعقم وبالمقدار نفسه وبالطريقة انفسها ، ام معاملة المقارنة فتركت بدون حقن ، اخذت النتائج بعد مرور ١٥ يوما من الحقن وذلك بقطع اوراق الزيتون المحقونة مسبقاً بالسم الفطري وحول منطقة الحقن بابعاد (٤×٤٠) ملم . اما معاملة المقارنة التي لم يجرِ فبها حقن فقد تم القطع في الموقع نفسه وبالابعاد أنفسها .

وتركت العينة لتجف لمدة ٤٨ ساعة ثم طحنت باستخدام طاحونة صغيرة نوع Taurus اسبانية المنشأ واصبحت العينات جاهزة لعملية الاستخلاص [21] .

٢- أستخلاص المواد الدفاعية :

اجريَ استخلاص المواد الدفاعية باستخدام مذيب الكحول الاثيلي ٩٥% حيث اجريت عملية الاستخلاص بأخذ ١٢٠ ملغم من مسحوق العينة المطحونة [22] وبمواصفات محددة من [23] ووضعت في دورق زجاجي سعة ٥٠ مل اضيف اليها ٣٠مل من الايثانول 95% ثم نقلت للرج باستخدام الرجاج الكهربائي Electric-sterier لمدة ٤٨ ساعة ، رشح المستخلص من خلال اوراق ترشيح نوع Zelpa سمك ٣٣و٠ ملم وبذلك تم الحصول على الراشح والحاوي على خليط من المركبات الدفاعية والكلوروفيل [22] .

٣- تنقية المستخلص من الكلوروفيل :

لغرض فصل المركبات الدفاعية عن الكلوروفيل استخدم عمود زجاجي glass column بابعاد (٦٠ × ٢٥و١) سم تم تعبئته مسبقاً بمادة السليكا جيل Silica gel قياس ٦٠-١٢٠ مش المضاف اليها الايثر البترولي Petrolium ether (٦٠-٨٠) سيليزية وتمت التعبئة بشكل دقيق ثم أ ضيفت عينة المستخلص الحاوية على الدفاعات والكلوروفيل وغسلت العينة بسلسلة من المذيبات العضوية المتسلسلة القطبية حيث تم اولاً اضافة مذيب الايثر البترولي (٦٠-٨٠) سيليزية ثم غسل الراشح (٢-٣) مرات ثم أعبقه الغسل بمذيب ايثر بترولي : بنزين بنسبة (١ : ١) ثم الغسل بمذيب بنزين فقط ثم تلاه الغسل بمذيب كحول اثيلي : بنزين بنسبة ١ :١ مذيب الكحول الاثيلي وبعد ذلك تم تبخير الكحول الاثيلي تحت الضغط وباستخدام جهاز المبخر الفراغي الدوار

Rotary evaporated vacuum للحصول على مستخلص دفاعات الزيتون ثم نقل الراسب الى قنينة زجاجية داكنة محكمة الغلق وحفظت في درجة حرارة ٥م لحين اجراء الاختبارات اللاحقة عليها [22] .

٤- الفصل والتشخيص الوصفي الكروماتوغرافي لبعض المواد الدفاعية في المستخلص:
Qualitative identificatin chromotochraphy

اعتمدت تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC في التشخيص لبعض المركبات الدفاعية في مستخلص اوراق الزيتون وذلك باستخدام صفائح معدنية من الالمنيوم مغطاة بمادة هلام السليكا نوع Merck,W,G بسمك ٢٥و٠ ملم وبابعاد (٢٠×٢٠) سم .

وتم اجراء عملية تنشيط الصفائح قبل استخدامها وذلك بتسخينها لمدة ١٥ دقيقة في فرن بدرجة ٩٠م ثم تركت لتبرد في درجة حرارة المختبر لتكون جاهزة للاستعمال . حملت العينات بعد اذابتها في ٥ مل من الكحول الاثيلي ٩٥ % على احد طرفي الصفيحة بهيئة بقعة على خط البداية بوساطة انبوبة شعرية قياس ٢٠ مايكروليتر بمواصفات Haematocrit Tubes Soda ,lime glass , Denmark [24]

وتم قياس معدل سرعة الجريان (Rf) للمركبات الفينولية في مستخلص اوراق الزيتون وبعد اظهار البقع بوساطة كاشف بخار بلورات اليود ، تم حساب المسافة التي قطعتها البقع من نقطة البداية الى النقطة التي توقفت عندها ومنها تم حساب معدل سرعة الجريان لكل مركب من المركبات الدفاعية الفينولية المعزولة على انفراد .

قورن معدل سرعة الجريان (Rf) لكل مركب من المركبات المعزولة مع معدلات سرعة الجريان القياسية المقابلة لها في الجداول المثبتة من [24] وامكن الحصول على احدى المركبات القياسية لحامض الكاليك الشكل (١) من قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل وقورنت قيمة Rf لهذه المادة مع المادة المفصولة لدينا مختبريا" .

<u>النتائج والمناقشة :</u>

العزل وتشخيص الفطر :

اظهرت نتائج العزل من اوراق الزيتون *Olea europeana* المصابة بالتبقع ظهور الفطر *Alternari conjuncta* واظهرت نتائج التشخيص اعتماداً على مفاتيح التصنيف العالمية المعتمدة حتى مرتبة الجنس [15] متطابقه مع الفطر جنس Alternaria حيث تم مقارنة شكل الابواغ وطبيعة تواجد الجدر العرضية والتقسيمات الافقية في ابواغ الفطر وكذلك عدد الخلايا في في البوغ اضافة الى نوع الحامل الكونيدي ومنشأ الابواغ على الحامل الكونيدي بشكل سلسلة متعاقبة للابواغ ، كذلك اظهرت نتائج تشخيص الفطر لمرتبة النوع مطابقة الفطر مع النوع *Alternaria conjuncta* وحسب تصنيف [7] حيث تم مقارنة شكل وحجم الابواغ وقياس ابعادها مع ماموجود في التصنيف العالمي المذكور لهذه المرتبة التصنيفية .

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 .

وقد سبق ان استخدمت هذه الطريقة في فصل السموم الفطرية من قبل العديد من الباحثين عالمياً و محلياً فقد قام ابراهيم **[25]** 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 **[26]** وفصل سموم الفطر *N.toruloidae* من قبل **[27]**) وكذلك فصل سموم الفطرين *Nattrassia mangiferae* و *Phoma exigua* **[28]** .

ب – فصل وتنقية المواد السامة بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي :

تبين من عمليتي الفصل والتنقية للمواد السامة وبعد بجمع كل جزء خارج من عمود السيفاديكس Cephadex بحجم ٥ مل واختبار سمية كل جزء لمعرفة احتوائه على الفعالية السمية وذلك تبعا" لطريقة **[27]** 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 .

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 (٢) وجود العديد من المركبات السمية الفطرية في الجزء السمي ٤٧ ، واظهرت نتائج اختبار الكرومتوغرافيا الورقية للجزء السمي ٤٧ من سم الفطر *Alternaria conjuncta*. وجود اربعة انواع من البقع (المركبات) بمعدلات جريان (Rfs) ٠٤و٠ و٠٧و٠ و ١٥و٠ و ٦٠و٠ حيث شخص المركب ذو قيمة الجريان ٠٧و٠ بكاشف اليود بمركب Tenuazonic acid حيث كان لون البقعة بني غامق وكانت قيمته مطابقة لقيمة المركب القياسية (٠٧و٠) في حين شخص المركب ذوقيمة الجريان (Rf) ١٥و٠ بمركب Tentoxin والذي اظهت بقعتة توهجا واضحاً وبلون بنفسجي فاتح وكانت قيمته مطابقة لقيمة معدل سرعة جريان المركب القياسي (١٥و٠) 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 (٢) : بعض قيم معدل سرعة الجريان (Rf s) للمركبات السمية للفطر Alternaria conjuncta المقاسة مع القياسية المتحصل عليها من قبل [19] .

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

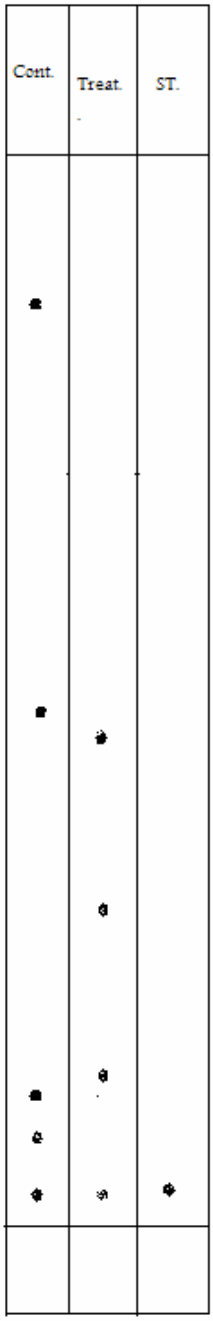
<u>دراسة الدفاعات النباتية المستحثة في اوراق الزيتون</u> :

دراسة الدفاعات المستحثة بتأثير سم الفطر *A .conjuncta* وتشخيصها :

أظهرت نتائج استحثاث المواد الدفاعية في اوراق الزيتون والتي سبق حقنها بالجزء (٤٧) من سم الفطر *A.conjuncta* والتي تم استخلاصها بمذيب الايثانول ٩٥% ، ويتبين استحثاث المركبات الدفاعية من الجدول (٣) كحامضي الكاليك Gallic acid والايلاجيك Ellagic acid و (+) ابيكاتيكين Epicatechin و (–) كالوكاتيكين Gallocatechin عند الحقن بالسمين الفطريين تنتوكسين وحامض التينيوزينيك فقط وتكرر ظهور حامضي الكاليك والايلاجيك في معاملة المقارنة ومعاملة الحفن بالسم الفطري في حين ظهرت ايضاً مركبات (–) ابيكاتكين و(–) كالوكاتكين في معاملة المقارنة لكونهما من المركبات الدفاعية المستحثة واستناداً الى تقنة الفصل المستخدمة .

واظهرت نتائج تشخيص المركبات الدفاعية وحامض الكاليك الشكل (٢) تطابقا" في قيمة معدل سرعة الجريان (Rf) للحامض مع قيمة معدل سرعة الجريان للمادة القياسية من حامض الكاليك وذلك بعد اختبارهما بطريقة كروموتوغلرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام مذيب الفصل نفسه (بيوتانول : حامض الخليك : ماء مقطر بنسب ٤ :١ :٥ حجم / حجم / حجم) وباستخدام كاشف اليود وتحت الظروف أنفسها .

وقد بين El-Modafer واخرون [20] امكانية استحثاث المركب الدفاعي كاتكين Catechin في شتلات الجنار بعد مرور ١٤ يوماً من العدوى بكونيدات الفطر *C. fimberia* في حين لم يكن المركب كاتكين موجودا" في معاملة المقارنة . كما بين [29] بأن المركبات الدفاعية الفينولية ومنها كاتكين تنتج بتراكيز عالية بعد العدوى بالفطر *Phytophthora sp.* . كذلك اشار [30] الى استحثاث مركب الابيكاتكين epicatechin بكميات كبيرة بعد عدوى ثمار الافوكادو بالفطر *Colletotricum gliosporioides* ويفسر ذلك بانه عند تعرض الشتلات الى الاضرار الميكانيكية كالحقن بالابرة او الخدش يؤدي الى استحثاث المواد الدفاعية نفسها ولربما بتراكيز اكبر مما في المقارنة ولهذا ظهرت بشكل مشترك مع المقارنة من دون حقن اثناء تشخيص المركبات وذلك ما اشار اليه [31] و[32] ، و كذلك بينت دراسة الدفاعات المستحثة بفعل سموم الفطرين *Nattrassia mangiferae* و *Phoma exigua* وتشخيصها في شتلات اليوكاليبتوس استحثاث المركبات الدفاعية (–) كاتيكين Catechin و (–) ابيكاتيكين Epicatechin و (–) كالوكاتيكين Gallcatechin و(+) ابيفزلكين Epiafzelechin و فلوروكليسينول Phloroglycinol والمركبين المجهولين ١و٢ عند الحقن بالسم الفطري حامض الكلوكويورينيك فقط المعزول من الفطر *N. mangiferae* ولم تظهر هذه الدفاعات عند الحقن بالماء المقطر او في غياب الحقن [28] .



الشكل (١) : كروموتوغرام التشخيص الكروموتوغرافي للدفاعات المستحثة في اوراق الزيتون بفعل سم الفطر *Alternaria conjuncta* باستخدام محلول الفصل بيوتانول : حامض الخليك : ماء مفطر بنسب ٤ /١ / ٥ وباستخدام كاشف اليود .

حيث ان .ST تمثل قيمة Rf القياسية و .Treat تمثل قيمة Rf المعاملة و .Cont تمثل قيمة Rf المقارنة .

الجدول (٣) : قيم Rfs للمركبات الدفاعية لمستخلص اوراق الزيتون المستحثة بسم الفطر *Alternaria conjuncta* والتي اظهرت باستخدام كاشف اليود .

المركبات الدفاعية	مذيب الايثانول ٩٥%

	معدل سرعة الجريان القياسية	معدل سرعة الجريان المعاملة	معدل سرعة الجريان المقارنة
حامض الايلاجيك	٠و١٥	٠و١٥	٠و١٣
مجهول (١)	–	–	٠و٠٩
حامض الكاليك	٠و٠٥	٠و٠٣	٠و٠٣
(–) كالوكاتكين	٠و٣٠	٠و٣١	–
(+) ابيكاتكين	٠و٤٣	٠و٤٣	–
(–) ابيكاتكين	٠و٤٥	–	٠و٤٦
(+) ابيافزلكين	٠و٧٤	–	٠و٧٨

المصادر :

1 - Agrios, G. N. *Plant Pathology* 5th , Academic Press 922pp. 1997 .

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

3 - Pascal, R. G. *Plants Phenolics* , Instituted , oenologie universite de Bardeaux P14 . 1972 .

4 - Thomson, R. H. (1971). *Naturally Occurring Quinones* , Academic Press . London . P80

5 - Tyler, , V. E. *Pharmacognosy* 9th edition , phlladelphphid . P76-76 . 1988 .

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

7 - 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 contaminationVol. 22 :302-308 . 2005 .

8 - 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

9 - 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 .

10 - Grundhofer, P. and G. Cross " Imunocytochemical studies on the origin and deposition sites of hydrolysable tannins : *Plant Sciense* Vol. 160: 987 – 995. 2001 .

11- Bahat, T. ; Singh, B. and M. Sharma . " Microbal of tannins accurent perspective " *Biodegredation* . Vol. 9: 343-357 .1998 .

12 - Swain, T. (1965) . Organic chemistry Chapter 22. " The Tannins " : 552-580 .Teck chewlain ; N. M. Nasir and P. M. Tahir (1988) . " Tannin – based adhesives for rubber wood particle board " . *Taiwan Forestry Research Institute* : 28-34 . In AL-M0fty , M. T. S. Yahia . " Utilization of *Pinus brutia* Ten. and *Quercua aegilops* L. Bark extract as adhesives particle boards production " . PH. D. Thesis . Mosul University , College of agriculture and forestry / Iraq 2006 .

13 - Barnes, J. L. ; C. A. Martin and M. T. Lentz . " Tannins adhesive for wafer board " *Procceing 20th international particle board composite material symposium* W. S. U. April 8 , 9, 10, 83: - 104 . 1986 .

14 - Achenbacht, H. and G. Benirschke. " Joannnesialactone and other compounds from *Joannesia princes* " *Phytochemistry* , Vol. 45 :149-157. 1997

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

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 - 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 .

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

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

20 - EL-Modafar,C.; A. Clerivet ;A. Fleuriet and J.J.Machelx. " *Inoculation of Platanus acerifolia with Ceratocystis fimbriata f.sp.platani induces scopoletin and mbelliferone accumulation* " Phytochemistry , Vol. 34:1271-1276. 1993 .

21 - Browning ,B. L. *Method of wood chemistry* , Vol. 1. Hand 11: Institute of paper chemistry . Appleton , Wisconsin , Inter Science publishers . A Divison of John Whley & Sons . New York , U.S.A. , 275pp. 1967 .

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

23 - EL-Modafer, C. ; A. Clerivet and J. J. Macheix " Flavan accumulation in stems of *Platanus x Aceriolia fimbriata* f.sp. *Platani*, The canker stain disease agent " Can. J. Box .Vol. 74: 1982-1987. 1996 .

24 - Gayon, P. R. *Plant Phenolics* . Oliver and Boyd . A division of Longman group Limited . Pathol. , Vol. 10 : 169 - 179 . 1972 .

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

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

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

28-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 . ٢٠٠٩ .

29 - Yacoby, N. ; D. Deno –M oualem ; I. Kolbiler and D. Prusky " The analysis of fruit proptection mechanisum provided by reduced – pathogenicity mutants of colletotrichum gleosporidiodes obtained by restriction enzyme mediated integration " . *Phytopathology* Vol. , 92:1196-1201. 2002 .

30 - Del Rio, J. A. ; Baidez, A. G. and A. Ortuno " Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L .) and their influence on resistance against *Phytophthora sp." Food Chemistr*y , V0l. 83 : 75-78 . 2003 .

31 - Kiraly, Z.; B. Barna and T. Ersek. " Hypersensitive as aconsequance not cause of plant resistant to infection " *Natural* (Lord.) Vol . 239: 446 - 457 , 1975 .
32- Misaghi, I. J. *Physiology and Biochemistry by Plant Pathogen Interactions* Plenum Press New York and London . 386pp. 1982 .