Influence of some environmental conditions on *Alternaria alternata* growth and alternariol AOH production

تاثير بعض الظروف البيئية في نمو الفطر *Alternaria alternata* وانتاج سم الالترناريول AOH*

م. فاضل سامي زغير
المعهد التقني بابل
جامعة الفرات الأوسط التقنية

أ. د. بان طه محمد
كلية التربية للعلوم الصرفة
جامعة كربلاء

أ.م.د. سعد محمد ندا
مركز بحوث التقنيات الحياتية
جامعة النهرين

*مستل من اطروحة الدكتوراه للباحث الاول

الخلاصة

تضمنت الدراسة تاثير بعض العوامل البيئية كدرجة الحرارة ودالة الحموضة pH ونوع الوسط الغذائي والضوء والظلام في نمو الفطر *A. alternata* وانتاجه سم الالترناريول AOH. اوضحت النتائج ان لدرجة الحرارة تاثير معنوي في نمو الفطر *A. alternata* اذ كانت درجة الحرارة المثلى لنموه هي 25 مْ, اذ بلغ معدل قطر مستعمرة النمو 8.5 سم وقد اختلف معنوياً على مستوى احتماليه 0.05 عن معاملة درجات الحرارة الاخرى, كما أوضحت النتائج ان درجة الحرارة أثرت ايضاً وبفارق معنوي على عمليه انتاج سم AOH وسجلت درجة حرارة 30 مْ اعلى قيمه لانتاج السم بلغت 141.5 مايكروغم/مل في حين انخفض معدل الإنتاج بفارق معنوي مع ارتفاع درجة الحرارة وصولا الى 74.5 مايكرو غرام/مل عند درجة حرارة 35مْ.

كان لدالة الحموضة تاثيراً على النمو اذ مثل pH عند القيمة 6 افضل حالة نمو للفطر *A. alternata* وصل فيها قطر مستعمرة النمو الى 8.5 سم وبفارق معنوي عند مستوى احتمالية 0.05 عن بقية المعاملات الاخرى وقد مثل pH عند القيمه 8 اقل معدل نمو وصل الى 4.3 سم كذلك اثرت دالة الحموضة على انتاج سم AOH واختلفت معنوياً مع تغير قيمه الـــ pH فقد مثل pH 5 اعلى انتاج بلغ 116.1 مايكروغرام/مل اما اقل قيمة انتاج فكانت عند pH 8 حيث بلغت 57.8 مايكروغرام/مل.

اوضحت النتائج ايضاً ان هناك فروق معنوية في معدل نمو الفطر *A. alternata* تبعاً لنوع الوسط الزرعي حيث اظهر وسط PSA تفوقاً معنوياً على الأوساط الأخرى إذ بلغ قطر مستعمرة النمو 8.5 سم, فيما انخفض معدل النمو في انواع الاوساط الاخرى وصولا الى 4.0 سم على وسط الـــــ Sabouraud agar. واظهر الوسط الزرعي Potato Sucrose Agar PSAافضل كمية انتاج للسم بلغت 112.8 مايكروغرام/مل وبفارق معنوي عن بقية الاوساط الاخرى كذلك وسط الزابك اكار معنوياً على كل من وسطي خلاصة الخميرة Yeast extract agar والسابروید Sabouraud agar

واظهر نمو الفطر *A. alternata* تحت ظروف الظلام تفوقاً معنوياً على نموه تحت ظروف الضوء فقد وصل قطر مستعمره النمو الى 8.2 سم تحت ظروف الظلام فيما بلغ 6.5 سم تحت ظروف الضوء. وتفوقت معاملة الظلام وبفارق معنوي كبير عن معاملات الضوء اذ بلغت كميه الانتاج 182.8 مايكروغرام/مل, بينما بلغ معدل الانتاج تحت ظروف الضوء 74.5 مايكروغرام/مل.

Abstract

This study included the influence of some environmental factors, temperature, pH, type of culture media, light and dark on the growth of *A. alternata* and production Alternariol AOH. The results showed that temperature had a significant effect ($p<0.05$) on the *A. alternata* growth and the optimum temperature was 25 ºC (8.5 cm for colony diameter) and the maximum temperature was 35ºC, minimum temperature was 20ºC.

The results showed that ,temperature had a significant effect ($p<0.05$) on the on AOH production and the optimum temperature was 30 ºC (141.5 microgram/ml).

pH effected growth where the best growth of *A. alternate* was at pH 6 giving 8.5 cm for colony diameter and a difference was significant at the $p< 0.05$ for other pH when the pH was 8 less than the growth rate 4.3 cm for colony diameter as well as pH affected production of AOH by significant differences at pH was the highest production 116.1 micrograms/ml and less production was at pH 8 giving 57.8 microgram/ml.

This results also showed that, there are significant differences in the rate of growth of *A. alternata* depending on the type of culture media, PSA showed significant differences among

others of growth 8.5 cm for colony diameter and decreased rate growth in other types of media lower growth rate of 4.0 cm for colony diameter for Sabourd agar. PAS gave best amount of production of toxin 112.8 microgram/ml.

Dark condition showed a significant increase in growth of *A. alternata* 8.2 cm for colony diameter while 6.5 cm under light conditions, So a significant increase for AOH production was in dark 182.8 microgram/ml, while in light was 74.5 microgram/ml.

المقدمة

يعد وجود الفطر *Alternaria alternata* على ثمار الطماطة مشكلة رئيسية كون ثمار هذا المحصول تعد وسطاً غذائياً ملائماً جداً لنمو الفطر والاحتفاظ بحيويته لفترة طويلة وانتاج السم وبالتالي فان استهلاك الثمار الحاوية على السم AOH يشكل مخاطر كبيرة على صحة الانسان[1].

يتاثر نمو الفطر *A.alternata* وقابليتة على انتاج سم AOH بتعرضه الى بعض العوامل البيئية المختلفة كدرجة الحرارة ودالة الحموضة pH والضوء وطبيعة مكونات الوسط الغذائي وغيرها [2]

حيث يزداد نمو وانتشار هذا الفطر وخصوصاً في فصل الصيف بتوفر العوامل البيئية المناسبة كارتفاع درجة الحرارة وزيادة الرطوبة فضلاً عن توفر العائل المناسب كمحصول الطماطة الذي يعد من اهم عوائل الفطر *A.alternata* [3]. ان التغير في هذه العوامل يقود الى التاثير في بعض الصفات المظهرية كلون المستعمرة ومعدل النمو وحجم وشكل الابواغ [4]. اذ يخضع شكل الابواغ لمجموعة العوامل اعلاه [5]. وبالرغم من تأثر الصفات المظهرية للفطر *A.alternata* بهذه العوامل الا ان الصفات الجزيئية المعتمدة في التشخيص الجزيئي تكون اقل عرضة للتاثر بتلك العوامل البيئية [6], كما وتلعب العوامل البيئية دورا هاما في انتاج سموم الفطر *A.alternata* [7] , حيث وجد [8] ان هناك فروقات معنوية في معدل انتاج سم AOH عند تغير الظروف البيئية كدرجة الحرارة والرطوبة ونوع الوسط الغذائي ودالة الحموضة pH , وعلى الرغم من اتساع دراسة تاثير درجة الحرارة والمحتوى الرطوبي الا ان العديد من العوامل البيئية الاخرى كدالة الحموضة ونوع الوسط الغذائي والضوء والظلام وغيرها لم تدرس بشكل مفصل من ناحية تاثيرها سواء على نمو الفطر او انتاجه السم AOH .

المواد وطرائق العمل

الفطر *A.alternata*

تم الحصول على عزلة مشخصة للفطر *A.alternata* لها القدرة على انتاج سم AOH من مختبر الفطريات في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء.

تاثير درجة الحرارة في معدل نمو الفطر *A.alternata* وانتاج السم AOH

استخدمت درجات الحرارة 20 و 25 و 30 و 35 مº لبيان تأثير درجات الحرارة على معدل النمو وانتاج سم AOH .

تاثير دالة الحموضة pH في معدل نمو الفطر *A.alternata* وانتاج السم AOH

استخدمت مستويات داله الحموضة PH 5 و 6 و 7 و 8 لبيان تاثير الـــ pH في نمو الفطر وانتاجه لسم AOH.

تاثير نوع الوسط في معدل نمو الفطر *A.alternata* وانتاج السم AOH

حضرت اربع انواع من الاوساط الزرعية هي Potato sucrose agar و Sabouraud dextrose agar و Czapicks agar و Yeast extract agar لبيان تاثير نوع الوسط في معدل نمو الفطر وانتاجه السم AOH .

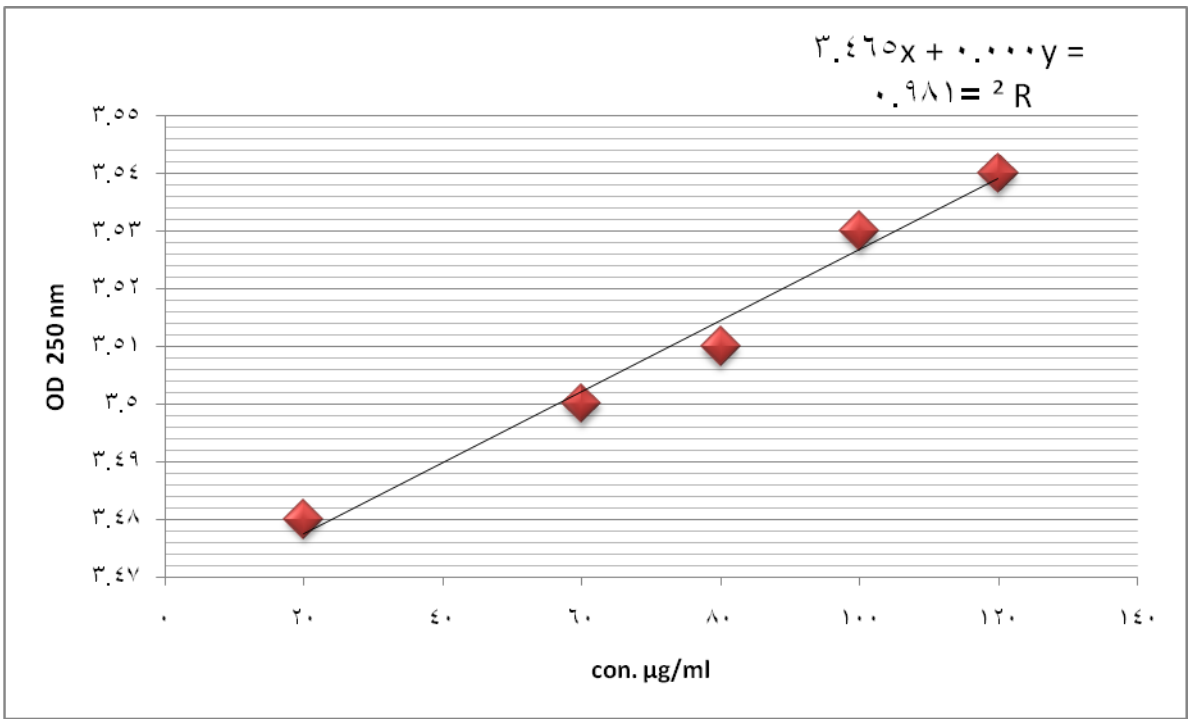
تاثير الضوء والظلام في معدل نمو الفطر *A.alternata* وانتاج سم AOH

قسمت اطباق هذه المعاملة الى مجموعتين الاولى حضنت على درجة حرارة 25 مْ تحت ظروف الضوء اما الثانية فحضنت بنفس درجة الحرارة ولكن تحت ظروف الظلام .

حيث لقحت اطباق حاوية على الوسط PSA (باستثناء معاملة تاثير نوع الوسط الزرعي حيث احتوت الأطباق على أوساط مختلفة) بقرص 1 سم من حافة المستعمرة لفطر *A.alternata* بعمر 4 ايام وبـــ 3 مكررات لكل معاملة ,اخذت نتائج معدل النمو بعد 6 ايام من الحضن وذلك بحساب معدل قطرين متعامدين, اما معدل الانتاج فحسب بطريقة المنحنى القياسي Standard Curveبعد 12 يوم من الحضن[9] ولجميع المعاملات اعلاه .

المنحنى القياسي لسم الالترناريول AOH

اعتمدت طريقة [10] للتقدير الكمي لسم الالترناريول AOH وذلك برسم منحنى قياس standard curve باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophometer وعلى الطول الموجي 250 نانوميتر حيث حضرت التراكيز التالية 20 و40 و 60 و 80و100 و 120 مايكروغرام/مل من العينة المراد قياسها. واتبعت طريقة [9] لاستخلاص سم AOH, وأذيبت كمية سم الالترناريول المستخلصة من كل معاملة من المعاملات اعلاه في 1 مل من مذيب الميثانول وسجلت قراءة الكثافة الضوئية وقورنت بالمنحنى القياسي الموضح بالشكل 1.



شكل (1) المنحى القياسي لحساب تركيز سم الالترناريول AOH

النتائج والمناقشة

تأثير بعض الظروف البيئيه في نمو فطر *A. alternata* وانتاجه لسم AOH

تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر *A.alternata* وإنتاجه سم AOH

يوضح الجدول (1) ان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر *A.alternata* كانت 25 مْ اذ بلغ معدل قطر مستعمرة النمو8.5 سم وقد اختلف معنوياً على مستوى احتماليه 0.05 عن معاملة درجات الحرارة الاخرى في حين بلغ اقل نمو وبفارق معنوي عند درجة حرارة 35 مْ كذلك انخفض معدل النمو عند درجة حرارة 20 مْ وبفارق معنوي ايضاً عن المعاملات الاخرى وهنا ربما يعود السبب في هذا الانخفاض الى ضعف النمو مع ارتفاع او انخفاض درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو الى التاثير على الانزيمات المسؤولة عن النمو والفعاليات الحياتية الاخرى [11]. في حين سجلت درجة الحرارة 35 مْ اقل نمو بلغ 2.1 سم, اتفقت هذه النتيجة مع ما اشار اليه كل من [12 , 13] من ان اقل نمو سجل الفطر *A.alternata* كان عند درجة حرارة 38 مْ.

ان معدل نمو الفطر يتاثر بانخفاض وارتفاع درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو والسبب في ذلك يعود الى ان ارتفاع درجة الحرارة يوثر على جميع تفاعلات الخلية التي تشترك فيها الانزيمات حيث تودي الى احداث خلل في عمل هذه الانزيمات اما انخفاض درجة الحرارة فيؤدي الى توقف عبور المواد الغذائية من خلال الغشاء البلازمي [14].

كما ان نمو الفطريات يعتمد ويتحدد بنوع الإنزيمات او مدى تأثير البروتينات داخل الخلية بالحرارة اذ ان الانخفاض السريع في معدل سرعة النمو عند ارتفاع درجة الحرارة اكبر من المثلى ياتي نتيجة فقدان طبيعة الإنزيم المسيطر على سرعة النمو او ربما انزيمات اخرى [15] . ولقد وجد ان الاحياء الاليفة لدرجة الحرارة العالية تمتلك إنزيمات أكثر استقرارا بهذه الدرجة ولا تفقد طبيعتها بسهولة. كذلك تأثر سرعة التفاعلات داخل الخلية وإنتاجها مركبات أيضية كالسموم الفطرية بعامل الحرارة [16].

جدول(1) تاثير درجة الحرارة في نمو الفطر *A.alternata* بعمر 7 ايام وانتاجه سم AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA

درجة الحرارة	معدل قطر مستمرة النمو (سم)	معدل انتاج السم (مايكروغرام/مل)
20	4.3	124.5
25	8.2	112.8
30	6.1	141.1
35	2.1	74.5
L.S.D	0.38	0

ومن الجدول اعلاه يلاحظ ان درجة الحرارة أثرت ايضاً وبفارق معنوي على عملية انتاج سم AOH حيث مثلت درجة حرارة 30 مْ اعلى قيمة لانتاج السم حيث بلغت 141.5 مايكروغم/مل في حين انخفض معدل الانتاج وبفارق معنوي مع ارتفاع درجة الحرارة وصولا الى 74.5 مايكرو غرام/مل عند درجة حرارة 35 مْ واشار[8] الى ان افضل درجة حرارة لانتاج سم AOH هي 21 مْ وتأتي هذه النتائج متفقة مع ما ذكره [17] من ان درجـــــة الحرارة الملائمـــــة لنمو الفطر *A.alternata* تختلف عن درجـــــة الحرارة المثلى لانتاج سم AOH.

تاثير دالة الحموضة pH على نمو الفطر *A.alternata* وانتاج سم AOH

يوضح الجدول 2 تاثير دالة الحموضة على معدل نمو الفطر *A.alternata* وانتاج سم AOH حيث مثل pH عند القيمة 6افضل حالة نمو للفطر والتي وصل فيها قطر مستعمرة النمو الى 8.5 سم وبفارق معنوي عند مستوى احتمالية 0.05 عن بقية المعاملات الاخرى وقد مثل pH عند القيمه 8 اقل معدل نمو وصل الى 4.3 سم وتاتي هذه النتائج متفقة مع ما اشار اليه [18] من ان افضل pH لنمو الفطر *A.alternata* كان 6.5 ويقل معدل النمو بزيادة اوانخفاض مستوى حامضية الوسط.

اما فيما يخص معاملة انتاج سم AOH فقد اختلفت المعاملات وبفارق معنوي مع تغير قيمه الـــ pH فقد مثل pH 5 اعلى انتاج بلغ 116.1 مايكروغرام/مل اما اقل قيمة انتاج فكانت عند pH 8 حيث بلغت 57.8 مايكروغرام/مل.

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [19] من ان الـــ pH المثالي لإنتاج السم هو 4.5 وتفسر نتائج كل من[14, 20] تأثير الرقم الهيدروجيني في عملية إنتاج سم الـــ AOH من ان الرقم الهيدروجيني قد يؤثر على تأين المركبات الموجودة في الوسط ودرجة ارتباطها بالانزيمات الموجودة في الغشاء البلازمي لخلية الفطر كذلك تأثيره على فعالية ونشاط هذه الانزيمات وباقي الانزيمات للفطر ومن ثم زيادة سرعة العمليات الحيوية المرتبطة بها التي من ابرزها سرعة الانبات وسرعة تكوين الابواغ.

جدول(2) تاثير دالة الحموضة pH في نمو الفطر *A.alternata* وانتاجه سم AOH بعمر 7 ايام وانتاجه سم AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA

دالة الحموضة (PH)	معدل قطر مستمرة النمو (سم)	معدل انتاج السم (مايكروغرام/مل)
5	5.5	104.5
6	8.5	116.1
7	6.8	74.5
8	4.3	57.8
L.S.D	0.23	0

تأثير نوع الوسط الزرعي في نمو الفطر *A.alternata* وانتاج AOH

يتبين من الجدول 3 ان هناك فروق معنوية في معدل نمو الفطر *A.alternata* تبعاً لنوع الوسط الزرعي حيث اظهر وسط PSA تفوقاً معنوياً على الأوساط الأخرى في معدل نمو الفطر *A.alternata* حيث بلغ قطر مستعمرة النمو 8.5 سم فيما انخفض معدل النمو في انواع الاوساط الاخرى وصولا الى اقل معدل نمو بلغ 4.0 سم على وسط الـــــ Sabouraud agar وتأتي هذه النتائج متفقة مع ما تشير اليه العديد من المصادر من ان وسط PDA يعد افضل انواع الاوساط الزرعية لنمو الفطريات [21].

وتتفق هذه النتائج مع ما وجده [22] اذ لا حظ تفوق وسط PDA على جميع الاوساط الاخرى في نمو الفطر *A. alternata* كذلك اتفقت هذه النتائج مع [23] الذي اشار الى ان افضل وسط لنمو الفطر *A.alternata* هو PDA وربما يعود السبب في ذلك الى احتواء هذا الوسط على المواد الضرورية لنمو الفطر[24].

كما ولا تتفق مع [25] الذي أكد على ان الوسط PDA لا يعد الوسط الأمثل لنمو الفطر *A.alternata* . كذلك أوضحت النتائج تفوق وسط الزابك معنوياً على وسطي خلاصة الخميرة Yeast extract agar ووسط السابروید Sabouraud agar ولربما يعود السبب في ذلك الى وجود نترات الصوديوم كمصدر للنتروجين الضروري في تصنيع البروتينات الضرورية لانتاج التراكيب الخضرية للفطـــر فضلا عن احتوائـــــه على سكر الدكستروز كمصـــــدر للكاربـــون [26].

اما فيما يخص انتاج السم AOH فيبين الجدول اعلاه ان الوسط الزرعي PAS كان الافضل في انتاج السم اذ بلغت كميته الانتاج باستخدام هذا الوسط 112.8مايكروغرام/مل متفوقة معنوياً على بقية الاوساط الاخرى قيد الدراسة كذلك أوضحت النتائج تفوق وسط الزابك اكار معنوياً على كل من وسطي خلاصة الخميرة yeast extract agar والسابروید Sabouraud agar وهذه النتائج لا تتفق مع العديد من الدراسات التي تشير الى ان وسط خلاصة الخميرة يعد افضل الاوساط الزرعية المستخدمة لانتاج السموم الفطرية [9].

جدول (3) تاثير نوع الوسط في نمو الفطر *A.alternata* وانتاجه سم AOH بعمر 7 ايام وانتاجه سم AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA

نوع الوسط	معدل قطر مستمرة النمو (سم)	معدل انتاج السم (مايكروغرام/مل)
PSA	8.2	112.8
Capks Agar	7.1	104.5
Yeast Extract Agar	5.8	77.8
Sabroud Agar	4.0	50.2
L.S.D	o.17	0

تأثير عاملي الضوء والظلام في نمو الفطر *A.alternata* وإنتاجه السم AOH

اوضحت نتائج الجدول 4, ان نمو الفطر تحت ظروف الظلام تفوق معنوياً عن نموه تحت ظروف الضوء فقد وصل قطر مستعمره النمو الى 8.2 سم تحت ظروف الظلام فيما بلغ 6.5 سم تحت ظروف الضوء وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره [4] من ان ظروف الضوء أخفضت معدلات نمو الفطر *A.alternata* وبفارق معنوي عن ظروف الظلام.

اما انتاج سم AOH فيوضحه نفس الجدول, اذ تفوقت معاملة الظلام وبفارق معنوي عن معاملات الضوء اذ بلغت كمية الانتاج 182.8 مايكروغرام/مل وهي اعلى قيمة سجلت لانتاج سم الالترناريول في جميع المعاملات السابقة وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه [27] من ان معاملة الظلام لانتاج سم AOH تفوقت معنويا على معاملة الضوء اذ بلغت كميه السم المنتج 185 مايكروغرام/مل تحت ظروف الظلام و 10 مايكروغرام/مل تحت ظروف الضوء ولفترة حضن بلغت 7 ايام ويعزى الباحث اعلاه السبب في ذلك الى امتلاك الفطر *A.alternata* مهيئات precursors تحفز انزيمي Malonyl COA وAcety COA واللذان يعدان المهيئين الرئيسين لعملية التخليق الحيوي لسم AOH وفي حاله تعرض هذه المهيئين للضوء فان مسار التخليق الحيوي يتغير لتعمل على تخليق الصبغات Pigments.

جدول (4) تأثير عاملي الضوء والظلام في نمو الفطر *A.alternata* وانتاجه السم AOH بعمر 7 ايام وانتاجه سم AOH بعمر 12يوم على وسط PSA

نوع المعاملة	معدل قطر مستمرة النمو (سم)	معدل انتاج السم (مايكروغرام/مل)
ضوء	6.5	74.5
ظلام	8.2	182.8
L.S.D	2.41	0

المصادر

1-Scott, P.M., Stoltz, D.R. (1980), Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutation Re s*. 78: 33-40.

2-Pryor, B. M. and Michailides, T. J. (2002). Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *alternaria* late blight of pistachio. Phytopathology, 92: 406-416.

3-Batista, D. C., Lima, M. A., Haddad, F., Maffia, L. A., and Mizubuti, E. S. G. (2006). Validation of decision support systems for tomato early blight and p potato late blight, under Brazilian conditions. Crop Prot. 25:664-670.

4-Slavov, F.C., Mayama, S., and Atanassov, A. (2004). Some aspects of epidemiology of *Alternaria alternata* Tobbacco pathotype. Biotechnol. and Biotechnol. Eq. pp. 85-89.

5-Lucas, G. B. (1975). Diseases of Tobacco. 3rd ed. Biological Consulting Association. Raleigh. Pp. 267-295.

6-Guarro, J., Gene, J. and Stchigel, A. M. (1999) . Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev., 12: 454-500

7-Etcheverry, M. , Chulze S. , Dalcero A. , Varsavsky E. , Magnoli C. (1994). Effect of water activity and temperature on Tenuazonic acid production by*Alternaria alternata* on sunflower seeds June, Volume 126, Mycopathologia Issue 3: 179-182 .

8-Pose, G., Patriarca, A., Kyanko V., Pardo, A. Fernández V. P. (2010).Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. International Journal of Food Microbiology Volume 142 (3) : 348–353.

9- Debjani S., Ramona F., Britta B., Joachim P., Manfred M., Ha D., Christopher L., Reinhard F., (2012). Identification of a Polyketide Synthase Required for Alternariol (AOH) and Alternariol-9- Methyl Ether (AME) Formation in *Alternaria alternate*. PLoS ONE 7(7) : 10.1371Al-

10- Fatlawi, A. R. (2012). Toxic Effects of Ochratoxin A in Rats and Pups. PHD thesis Veterinary Medicine College University of Baghdad.

11-الاسدي , رامز مهدي صالح والسعدون , عبد الله حمود , (2011). دراسة للفطر *Alternaria alternata* كمسبب لمرض خياس طلع نخيل التمر مجلة البصرة لابحاث نخلة التمر. المجلد (10) :العدد 2

12-Stavely, J. R. and Slana L. J. (1971). Relation of leaf age to the reaction of tobacco to *Alternaria alternata*. Phytopathology, 61: 73-78.

13-Stavely, J. R. and Main C. E. (1970). Influence of temperature and other factors on initiation of tobacco brown spot. Phytopathology, 60: 1591-1596.

14-Tanner, R. S. (1997). Cultivation of bacteria and fungi. In: Manual of environmental microbiology. In Hurs, C. J., Knudesen, G. R., Mclnerney M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. (eds.). American Society for Microbiology. Washington. pp. 52-60.

15-المظفر, سامي عبد المهدي. (1983).حركيات الانزيمات الجزء الثاني . مطبعة الخلود – بغداد.

16-Chaplin, M.F. and Bucke, C. (1990) Enzyme Technology. Cambridge: Cambridge University Press. This book is out of print, an electronic version is updated by M. Chaplin and available .

17-Pose, G., Patriarca, A., Kyanko V., Pardo A., Fernández V. P. (2009). Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium International Journal of Food Microbiology, 135 : 60–63.

18-Mohapatra, A., Mohanty, A. K. and Mohanty, N. N. (1977). Studies on physiology of the sesame leaf blight pathogen, *Alternaria sesame.* Indian Phytotopathology, 30: 332-334.

19-Brzonkalik K, Hummer D, Syldatk C, Neumann A (2012) Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin *Alternaria alternata* in submerged cultivation. AMB production by Express10.1186 /2191-0855-2-28.

20-Morra, M. J. (1997). Assessment of extracellular enzymatic activity in soil. In: Hurst CI, Knudsen GR, Mclnnerney MJ, Stetzenbach LD and Walter MV (eds.) Manual of environmental microbiology. ASM Press, Washington, DC, pp. 459–465.

21-Saha A, Mandal P, Dasgupta S, Saha D (2008). Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl . J. Environ. Biol., 29(3): 407-410.

22-Arunakumara, K. T. (2006). Studies on *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Jones and Grout Causing Early Blilght of Tomato M.Sc. Thesis University of Agricultural Sciences. College of Agriculture, Dharwad. pp. 70.

23-Mazzonetto, F., Menten, J. O. M., Paradela, A. L. and Galli, M. A. (1996) Effect of culture media on mycelial growth and conidial production of *Alternaria* spp. In beans. Ecossistema, 21: 59-61

24-Shahin, E. A. and Shepard, J. F. (1979). An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. Phytopathology, 69: 618-620.

25-Ojiambo, P. J. (1997). Cultural studies and epidemiology of *Alternaria* sesame and effect of seed transmission and plant age on *Alternaria* leaf spot severity of ssamum indicum L. M.Sc. Thesis. University of Nairobi, Kenya. Pp. 75-77.

26-Goyal, K. N. (1977). Effect of pH, carbon and nitrogen nutrition on the growth of *Alternaria tenuis*. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 7: 155-157.

27-Kenneth S., Ebbe S., and Torgny U. (1978). Light Inhibits the Production of Alternariol and Alternariol Applied and environmental microbiology. Vol. 36, No. 5: 655-657.