مجلــة الكوفــة للعلــوم الزراعيـــة 9 (4) : 181 – 199 2017

تأثير بعض عزلات الفطر *Aspergillus niger* على تعفن أبصال البصل Onion (*Allium capa* L.) ومقاومتها بالمستخلص المائي الحار للزنجبيل Ginger

بريز أحمد ناصر گماز مجيد متعب ديوان

قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة الكوفة – جمهورية العراق

المستخلص

أظهـر اختبـار القـدرة الامراضـية بثلاثـة عشـر عزلـة مـن الفطـر *Aspergillus niger* ان جميـع أصـناف البصـل قيـد الدراسـة Early Grano (TEG) Texas و Early White Grano (EWG) و Red Baron (RB)كانـت حساسـة لجميـع عـزلات الفطـر، ولكـن كانـت عزلـة الفطـر 3 مـن اكثـر العـزلات تلفـاً لابصـال البصـل اذ بلـغ معـدل أمتـداد الأصـابة للعزلـة 4.29 سـم وكـان اكثـر الأصـناف تـأثرا بالمرض هو الصنف EWG اذ كان مقدار أمتداد التلف للصنف 2.19 سم وخلال فترة 4 أسابيع .

كمـا وجـد ان رواشـح العـزلات المدروسـة للفطـر *A.niger* كـان لهـا القـدرة فـي تلـف أبصـال الأصـناف المدروسـة إذ ان راشـح العزلـة 7 كـان اكثرهـا تلفـاً لجميـع أصـناف البصـل اذ بلـغ معـدل امتـداد الأصـابة للعزلـة هـو 4.19 سـم وكـان اكثـر الأصـناف تـأثراً بجميـع العـزلات هـو الصـنف RB اذ كـان معـدل أمتـداد التلـف للصـنف المـذكور هـو 2.17 سـم ، كمـا وجـد ان العزلـة 3 هـي الأكثـر امراضـية علـى جميـع أصـناف البصـل، كمـا أثبتـت نتـائج تغطـيس الأبصـال فـي المسـتخلص المـائي الحـار لـدرنات الزنجبيل لمدة 5 دقائق انها أدت الى تقليل أصابة أبصال البصل بمرض العفن الأسود .

أظهـرت العزلـة 3 قـدرتها علـى أفـراز السـموم Ochratoxin وB_1 Aflatoxin وB_2 Aflatoxin فـي الأبصـال حيـث كـان اكثـر السـموم تركيـزاً هـو Ochratoxin فـي الجـزء المصـاب اذ بلـغ 1.129 مـايكروغرام .مـل$^{-1}$. وفـي أختبـار آخـر ظهـر ان الجـزء السـليم مـن الابصـال المصـابة بـالفطر احتـوى علـى سـموم Ochratoxin وB_1 Aflatoxin وB_2 Aflatoxin بمقـدار 0.449 و 0.188 و 0.162 مايكروغرام .مل$^{-1}$ على التوالي .

كلمات مفتاحية : *Aspergillus niger*، Ochratoxin ، Aflatoxins ، البصل ، الزنجبيل

البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الأول

المقدمة Introduction

نبــات البصــل ينتمــي الــى العائلــة النرجســية Amaryllidaceae وهــو مــن الخضــر المهمــة التــي تــزرع علــى نطــاق واســع فــي المنــاطق الاستوائية والمعتدلـة مـن العـالم ، هـو عبـارة عـن سلسـلة مـن الأوراق المتورمـة متحـدة المركـز تجلـس علـى جـذع قصـير أو قاعـدة. وتحـاط بهـا القشور (17) .

جـنس البصـل هـو الأكثـر أهميـة اقتصـاديا بعـد الطماطـة ، إذ يـزرع بشـكل واسـع حـول العـالم خصوصـا فـي قـارة اَسـيا و أوربـا ، وأن الإنتـاج العـالمي للبصـل زاد علـى الأقـل بنسـبة 20% فـي السـنوات الأخيـرة مـن الإنتـاج التجـاري (11) . وان المـوطن الاصـلي للبصـل هـو شـمال ايـران او المنطقـة الممتـدة مـن فلسـطين حتـى الهنـد مـن قـارة اسـيا (27) ، لـذلك تعـد الصـين أكبـر منـتج للبصـل فـي العـالم تليهـا الهنـد (4) وأن إنتاجيـة الهكتـار فـي العـراق مـن الابصـال لعـام 2007 حـوالي 8262 كغـم وهـذه الإنتاجيـة متدنيـة إذا مـا قورنـت بإنتاجيـة الـدول العربيـة المجـاورة الأخـرى مثـل الأردن 22660 كغـم والسـعودية 25394 كغـم ومصـر 31991 كغم.هكتـار$^{-1}$ (1)

يتعـرض أنتـاج البصـل لعديـد مـن الفطريـات المختلفـة والمسـببة للأمـراض وخاصـة الفطريـات المترممـة والتـي تـدخل عـن طريـق الجـروح ومـن ثـم تـؤدي الـى خسـارة كبيـرة خـلال النمـو بالحقـل أو بـالمخزن (8) ، يصـاب البصـل بعـد الحصـاد بعـدة أمـراض وهـي العفـن الأسـود والعفـن الأزرق وعفـن الرقبـة والعفـن البنـي ، وان العفـن الأسـود والعفـن البنـي هـي الأمـراض السـائدة بـالمخزن (20) ، وان أكثـر الامـراض تـدميراً للبصـل فـي الحقـل والمخـزن هـو مـرض العفـن الأسـود علـى البصـل (25) الـذي يصـيب أكثـر مـن 80% مـن الأبصـال المخزونـة وبـدرجات متفاوتـة (9) وأن المسـبب المرضـي هـو *Aspergillus niger* وهـو النـوع الأكثـر شـيوعا فـي جـنس *Aspergillus* إذ يسـبب مـرض العفـن الأسـود فـي الفواكـه والخضـروات مثـل العنـب والفـول السـوداني والبصـل وغيرهـا من المواد الغذائية (21) .

إن أسـتخدام المبيـدات الكيميائيـة فـي معاملـة الأبصـال بعـد الجنـي تسـبب أضـراراً صـحية كبيـرة للمسـتهلك خصوصـاً إذا مـا أسـتخدمت تلـك المبيـدات فـي مقاومـة الأمـراض مـا بعـد الحصـاد ، كمـا أن الأبصـال المصـابة حتـى ولـو كانـت جزئيـاً ربمـا تكـون ملوثـة بالسـموم الفطريـة (24) ممـا دعـى الـى دراسـة سـرعة تطـور الأصـابة علـى الأبصـال والحـد مـن تأثيراتهـا فـي تعفـن الأبصـال بأسـتخدام بعـض المستخلصـات النباتيـة للزنجبيل اضـافة الـى التحـري عـن المـواد السـامة فـي الأبصـال المصـابة والعـزلات الفطريـة العائدة للفطر *A.niger* والفارزة للسموم (23)

المـواد وطرائـق العمـل Material and Methods :

تـأثير أضـافة الغزل الفطـري لعزلات الفطـر *A. niger* فـي القـدرة الأمراضـية علـى أبصـال البصل .

أجريـت هـذه التجربـة فـي مختبـرات دائـرة البيئـة فـي محافظـة كـربلاء المقدسـة بتلقـيح أبصـال بعـض أصـناف البصـل المحلـي والتـي كـان عـددها 3 أصـناف وهـي (Red baron وTexas Early Grano و Early White Grano) والتـي كـان حجمهـا بحـدود 6 سـم (قطـر) بـالغزل الفطـري للعـزلات الفطـر *A. niger* وكـلاً علـى حـدة حيـث أخـذ قـرص قطـره 1 سـم مـن مسـتعمرات عـزلات الفطـر النـامي علـى الوسـط الغـذائي P.S.A وكـلاً علـى حـدة وأضـافته الـى أنبوبـة أختبـار حاويـة علـى 9 مـل مـن المـاء المقطـر المعقـم وبعـد رجهـا بصـورة جيـدة أخـذ 1 مـل مـن المعلـق البـوغي ووضـعه فـي طبـق بتـري وبعـدها أضـيف 20 مـل مـن الوسـط الغـذائي P.S.A وحركـت الأطبـاق حركـة رحويـة لتجـانس العـالق بالوسـط ووضـعت الأطبـاق بعـد التصـلب فـي الحاضـنة علـى درجـة حـرارة 25 مْ ± 2 لمـدة 12 سـاعة وبعـد أنبـات الأبـواغ وملاحظـة نمـو الغـزل فطـري لعـزلات الفطـر لقحـت ثمـار البصـل إذ أخـذت أشـرطة مـن نمـو الفطـر بطـول 1 سـم وعرضـه 0.5 سـم ووضـعت علـى الجـروح التـي تـم أحـداثها علـى الأبصـال ووضـعت فـي كـيس بـولي أثيلـين لتجنـب التلـوث وحضـنت فـي ظـروف درجـة حـرارة الغرفـة التـي كانـت حرارتهـا بحـدود 25مْ ± 5 حيـث أخـذ ثلاثـة تكـرارات فـي هـذه التجربـة لكـل عزلـة علـى جميع الأصناف .

تركـت مجموعـة مـن الأبصـال مجروحـة ولكـن بـدون تلقـيح كمعاملـة مقارنـة وتـم حسـاب نسـبة التلـف الحاصـل فـي الأبصـل مـن منطقـة التلقـيح كـل سـبعة أيـام الـى حـين الوصـول الـتعفن الـى التلف الكلي في احد معاملات الأبصال .

تـأثير رواشـح عـزلات الفطـر *Aspergillus niger* فـي القـدرة الأمراضـية علـى بعـض أصناف البصل :

تمـت هـذه التجربـة بحقـن ابصـال أصـناف البصـل (Red baron وTexas Early Grano و Early White Grano) والتـي كـان حجمهـا 6سـم (نصـف قطـر) بواسـطة محـاقن طبيـة سـعة 1 مـل برواشـح عـزلات الفطـر *A.niger* وكـلاً علـى حـدة وبعـد تعقيمهـا بواسـطة المرشـح الـدقيق الـذي فتحاتـه 22 ملـي مـايكرون ، حيـث حقـن راشـح كـل عزلـة فـي ثـلاث ابصـال مـن أصـناف البصـل بثلاثـة مكـررات لكـل صـنف وبثلاثـة مواقـع مختلفـة مـن سـطح البصـلة وبواقـع 0.5 مـل لكـل موقـع حقـن ووضـعت فـي أكيـاس بـولي أثيلـين ، ومـن ثـم حفظـت تحـت ظـروف ودرجـة حـرارة المختبـر وأخـذت النتـائج بحسـاب نسـبة الـتعفن كـل سـبعة أيـام لحـين الوصـول الـى التلـف الكلـي لأحـد معـاملات التجربـة وتـم حسـاب نسـبة التلـف عـن طريـق المسـطرة مـن مكـان الحقـن ، آخـذي بنظـر الأعتبـار حقـن راشـح الوسـط بـدون فطر بالأبصال كمقارنة بدل الراشح الفطري .

تـأثير تغطـيس ابصـال البصـل فـي المسـتخلص المائي الحار للزنجبيل :

أجريـت هـذه التجربـة بتغطـيس أبصـال البصـل للصـنف (EWG) بمعـدل حجـم قطـر 6 سـم فـي المسـتخلص المـائي الحـار للزنجبيـل النـاتج مـن غلـي التراكيـز 10 و 20 و 30 غم.لتـر$^{-1}$ كـلاً علـى حـدة فـي 500 مـل مـاء مقطـر ولمـدة 20 دقيقـة إذ رشـح المسـتخلص بواسـطة قطعـة مـن الشـاش فـي دورق سـعة ا لتـر ثـم أكمـل الحجـم الـى 1 لتر ثم لقحت أبصال البصل بعالق بوغي مـن العزلـة المختـارة للفطـر *Aspergillus niger* بتركيـز 1.72×10^7 اذ كـان التغطـيس في :

1. ماء المقطر فقط
2. جروح فقط
3. زنجبيل فقط
4. زنجبيل + جروح
5. زنجبيل + جروح + عالق بوغي
6. جروح + عالق بوغي
7. زنجبيل + عالق بوغي
8. عالق بوغي + ماء مقطر فقط

اذ تمـت التجربـة بواقـع ثلاثـة مكـررات لكـل معاملـة ووضـع كـل مكـرر داخـل أكيـاس نـايلون مشـبكة حجـم 1 كغـم وتركـت فـي ظـروف ودرجـة حـرارة الغرفـة تقريبـاً 25 مْ ± 5 وأخـذت نتـائج تطـور مسـافة التلـف كـل سـبعة أيـام لحـين الوصـول الـى مرحلـة التلـف الكلـي للأبصال في أحد المعاملات .

أسـتخلاص العينـات المصـابة بـالفطر *Aspergillus niger* لغـرض تقـدير السـموم بأستخدام تقنية HPLC :

اتبعـت طريقـة Balzer (5) فـي تحضـير المسـتخلص الكحـولي لغـرض الكشـف عـن الاوكراتوكسـين A و الأفلاتوكسـين B1، B2 بواسطة جهاز HPLC وهي كالآتي :-

أخـذت رؤوس بصـل لصـنف (EWG) ولقحـت بـالغزل الفطـري للفطـر *A.niger* بـنفس طريقـة العمـل الـواردة فـي تـأثير أضـافة الغـزل الفطـري لعـزلات الفطـر *A. niger* فـي القـدرة الأمراضـية علـى أبصـال البصـل بواقـع ثـلاث مكـررات، وتركـت أبصـال المعاملـة بـالغزل الفطـري فـي ظـروف المختبـر وتحـت درجـة حـرارة 25±5 مْ لمـدة 7 أيـام بعـدها تـم أزالـة الجـزء المصـاب عـن الجـزء السـليم وأخـذها كـلاً علـى حـدة ثـم قطعـت الأنسـجة السـليمة بسـكين معقـم الـى قطـع صـغيرة وبعـدها نقلـت العينـات المصـابة والقطـع السـليمة كـلاً علـى حـدة الـى خـلاط كهربـائي حـاوي علـى 100 مـل مـن محلـول الاسـتخلاص المكـون مـن اسيـتونايترل : مـاء (90 : 10) مـل ثـم مـزج الخلـيط لمـدة 10 دقـائق، ورشـح الخلـيط بأستخدام أوراق ترشيح من نوع Whatman No. 4 .

أخـذ الراشـح ووضـع فـي قمـع فصـل (Separatory Funnel) سـعة 250 مـل ثـم أضـيف إليـه 25 مـل مـن الهكسـان لغـرض الـتخلص مـن الـدهون (Defatting) بعـدها رج القمـع برفـق لمـدة 30 ثانيـة مـع طـرد الغـازات

المتجمعة كلما دعت الحاجة إلى ذلك، وبعدها ترك على الحامل لمدة دقيقة واحدة لكي تنفصل الطبقتان، أهملت الطبقة العليا واخذت الطبقة السفلى وكررت العملية لثلاث مرات لضمان التخلص من الدهون بشكل تام، بعدها أخذت الطبقة السفلى وأضيف اليها 25 مل من الماء المقطر و8 مل من محلول بيكاربونات الصوديوم المشبعة (NaHCO3) و 25 مل من الكلوروفورم، وبعد ثلاث دقائق تم فصل السائل الى طبقتين عليا وسفلى أخذت الطبقة السفلى وأهملت العليا. كررت هذه العملية مرتين، ثم نقل المستخلص الى قمع فصل سعة 100 مل واضيف اليه 15 مل من حامض الهيدروكلوريك 1 عياري والمحضر آنيا و 20 مل من الكلورو فورم ورج الخليط جيدا وترك القمع على الحامل لمدة دقيقة. اخذت الطبقة السفلى وتم الأحتفاظ بها ثم اضيف للطبقة العليا 20 مل كلوروفورم واعيد استخلاصها مرة اخرى، وأخذت الطبقة السفلى أيضاً وجمعت العينتان و مررت خلال ورق ترشيح حاوية على طبقة من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) لأجل التخلص من الماء المتبقي. أخذ راشح ووضع في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 مْ وحتى الجفاف، بعدها أذيب في 1 مل من الكلوروفورم، ثم تم تحليل العينات بأستخدام جهاز HPLC .

كشف وتقدير الاوكراتوكسين A والأفلاتوكسين B2،B1 باستعمال جهاز كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء High-Performance Liquid ((Chromatography)) (HPLC) :

تمت عملية التشخيص عن الأوكراتوكسين والأفلاتوكسين باستعمال جهاز كروماتوكرافيا السائل (High-Performance Liquid Chromatography) نوع Shimadzu موديل 10AV-LC ذات الضخ المزدوج المكون من مضختين، حيث تم الكشف بالعمود باستعمال كاشف الأشعة فوق البنفسجية (10A-SPD) Spectrophotometer detector بعدها ظهرت بوساطة الحاسبة الخطية منحنيات المركبات و حسبت مساحتها وقيست التراكيز وفق المعادلة التالية :

$$\text{تركيز النموذج} = \frac{\text{مساحة العينة}}{\text{المساحة القياسية}} \times \text{عامل التخفيف} \times \text{تركيز المحلول القياسي}$$

اخذ 1 مل من المستخلص الفطري للعينات المحضرة بالطريقة أستخلاص العينات المصابة بالفطر *Aspergillus niger* لغرض تقدير السموم بأستخدام تقنية

HPLC حيث وضع في أنبوبة اختبار زجاجية وتمت أذابته باضافة 30 مل من acetonitrile ، بعدها عرُض المستحلب الى موجات فوق الصوتية باستخدام جهاز ultra-sonic path من نوع Branson Sonifier ,USA لمدة 30 دقيقة ، ثم رشح بواسطة ورقة ترشيح نوع .Whatman No 0.5لأزالة الألياف والمواد غير الذائبة، ثم أخذ 20 مل من المحلول المائي المرشح وحقن في عمود جهاز HPLC، حيث يحدث في هذا العمود التحليل حسب تركيز الرواشح عن طريق معرفة مساحتها الموجودة في نماذج العينات المستخدمة في الدراسة ومساحة المنحنيات للنماذج القياسية المعروفة على وفق المعادلة السابقة. (3)

تقدير سموم راشح الفطر *Aspergillus niger* بأستخدام جهاز HPLC :

اخذ 1 مل من الراشح الفطري بعمر 7 أيام حيث وضع في أنبوبة اختبار زجاجية وتمت أذابته باضافة 30 مل من acetonitrile ، ثم أجرى عليها عملية التحليل لتقدير السموم كما في الفقرة كشف وتقدير الاوكراتوكسين A والأفلاتوكسين B2،B1 باستعمال جهاز كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء (HPLC).

التحليل الإحصائي Statistical analysis

نفذت جميع التجارب وفق التصميم كامل العشوائية C.R.D (Complete Random Desgin) كتجارب ذات عامل واحد أو أكثر وتم مقارنة المتوسطات بحسب طريقة اقل فرق معنوي L.S.D (Less significant Differences) وتحت مستوى احتمال 0.05 وقد تم أستخدام برنامج GenStat 12th Edition الألكتروني لتحليل النتائج .

نتائج والمناقشة

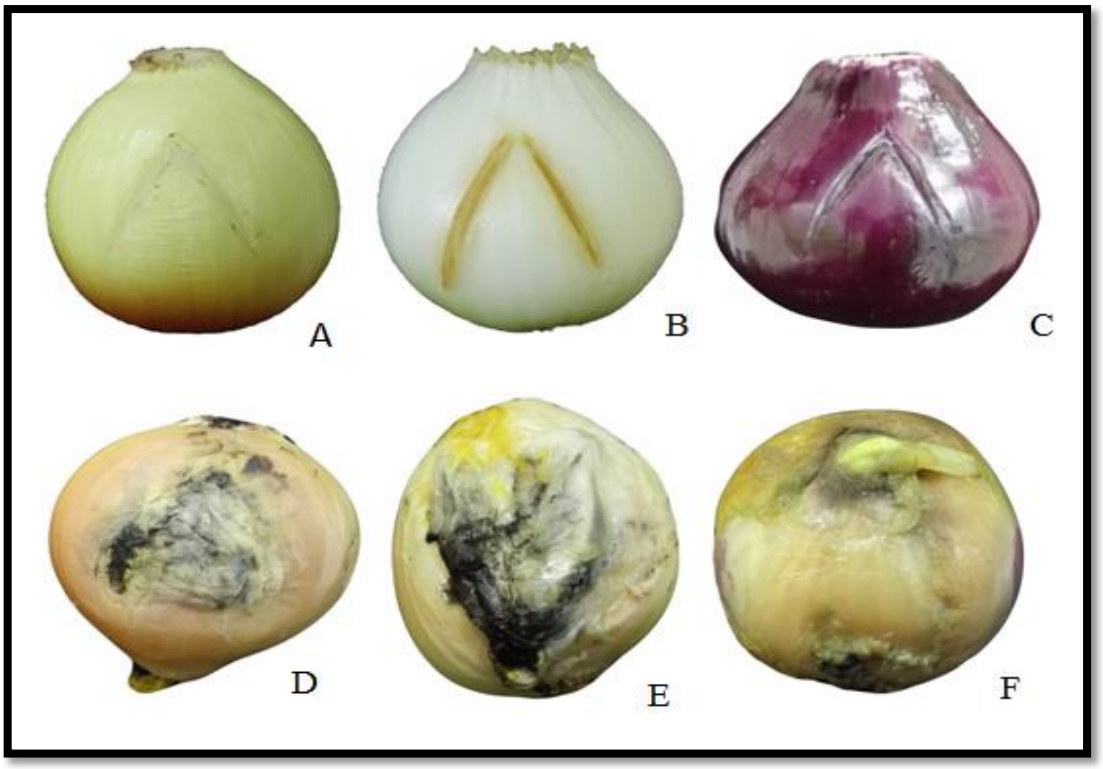
: Results and Discussion

تأثير تلقيح ابصال البصل بالغزل الفطري للفطر *A.niger* :

أشارت النتائج وكما موضح في الجدول (1) الى أن العزلة رقم 3 من الفطر *A.niger* أدت الى تلف جميع ابصال أصناف البصل المستخدمة في التجربة إذ بلغ معدل تطور الأصابة للعزلة المذكورة 4.29 سم قياساً بالمقارنة التي بلغت مسافة التلف 0.10 سم ، ومن الجدول نفسه يتضح أن الصنف (EWG) كان أكثر الأصناف حساسية للأصابة بعزلات الفطر*A.niger* إذ بلغ معدل تطور الأصابة للصنف المذكور 2.19 سم قياساً بالصنف (RB و TEG) واللذان بلغ معدلهما 2.09 و 2.04 سم على التوالي ، وكان الأسبوع الرابع هوالأكثر تلفاً لجميع الأصناف إذ بلغ معدل الأسبوع الرابع 3.73 سم مقارنة بأقل معدل في الأسبوع الأول والذي بلغ 0.82 سم ، أما بالنسبة للتداخل فقد تفوقت بعض العزلات من الفطر *A.niger* وبعض الأصناف في الأسبوع الرابع حيث أعطت العزلة 2 لصنف البصل (RB)

والعزلــة 3 للصــنفين (TEGوRB) والعزلــة 6 للصــنف (TEG) والعــزلتين 12 و 13 للصــنف (TEG) أعلــى مســافة تلــف فــي الأبصــال بلغــت 6.00 سم .

أظهــرت الدراســات بأنــه لاتوجــد أصــناف غيــر حساســة للأصــابة بــالفطر *A.niger* وأن جميــع الأصــناف المختبــرة أظهــرت قابليــة للأصــابة بــدرجات متفاوتــة وقــد يعــزى اخــتلاف شــدة الأصــابة بــالمرض فــي الأصــناف الــى جينــات الصــنف الوراثيــة التــي تحــدد صــفاته الفسيولوجية والمورفولوجيــة وآليــة دفــاع النبــات ضــد الفطــر الممــرض متمثلــة فــي محتــوى النســيج النبــاتي مــن الكاربوهيــدرات (16) والمــواد الذائبــة والصــلبة والعناصــر الغذائيــة والفيتامينــات (22) أو تواجــد المركبــات الفينوليــة وأنتــاج الفايتوألكســينات (13) كمــا أن انخفــاض الأصــابة فــي الصــنفين RB و TEG قــد يعــود الســبب الــى أحتــواء حراشــفهما علــى صبغة الأنثوسيانين والفينولات (7) .



الصورة رقم (1) تعفن ابصال البصل بالفطر *A.niger* حيث A,B,C تمثل مقارنة لأصناف البصل المدروسة (جروح فقط) وD,E,F تمثل التلف الناتج عن الأصابة بالفطر*A.niger* .

جدول (1) تطور أصابة ابصال البصل بالغزل الفطري لعزلات الفطر *Aspergillus niger*

العزلة	الصنف	مقدار التلف (سم) عدد الاسابيع الأول	الثاني	الثالث	الرابع	معدل العزلة	معدل الصنف
المقارنة	TEG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	الصنف TEG 2.09
	EWG	0.00	0.00	0.00	1.25		
	RB	0.00	0.00	0.00	0.00		
1	1	0.03	0.07	0.50	2.00	0.53	
	2	0.00	0.00	0.20	1.00		
	3	0.00	0.17	0.33	2.00		
2	1	0.25	0.25	0.42	3.00	2.12	
	2	0.45	2.50	3.95	5.00		
	3	0.25	1.25	2.17	6.00		
3	1	1.50	4.00	5.00	6.00	4.29	
	2	1.73	4.50	4.67	5.67		
	3	2.27	4.83	5.33	6.00		
4	1	0.08	1.17	3.00	5.05	2.22	
	2	0.83	1.75	3.00	4.72		
	3	0.25	0.42	1.25	5.13		
5	1	0.25	0.25	1.58	3.17	1.52	الصنفEWG 2.19
	2	1.00	1.50	3.25	3.33		
	3	0.25	0.33	1.67	1.67		
6	1	1.75	3.68	6.00	6.00	2.74	

		2.92	2.92	0.58	0.33	2	
		3.83	1.83	1.75	1.27	3	
		3.75	1.87	1.33	1.03	1	
	2.28	3.95	3.52	2.00	1.25	2	7
		4.03	1.83	1.58	1.25	3	
		1.25	0.42	0.25	0.25	1	
	1.14	3.28	0.58	0.25	0.00	2	8
		3.97	1.50	1.08	0.83	3	
		5.50	4.15	2.25	1.75	1	
	3.07	3.30	3.22	3.03	0.75	2	9
		4.27	3.92	2.75	2.00	3	
الصنف RB		3.38	1.17	1.08	0.67	1	
2.04	1.90	3.37	3.37	1.17	0.58	2	10
		4.82	1.33	1.00	0.83	3	
		3.12	1.25	0.50	0.29	1	
	2.30	4.50	3.48	1.17	1.00	2	11
		4.10	3.93	2.50	1.75	3	
		6.00	6.00	3.00	2.00	1	
	2.71	4.00	3.00	1.25	1.00	2	12
		2.17	1.67	1.33	1.12	3	
		6.00	2.00	1.25	0.75	1	
	2.61	5.50	3.87	2.00	1.25	2	13
		2.75	2.17	2.00	1.75	3	

معدل الاسابيع		0.82	1.47	2.41	3.73	للعزلة	للصنف
L.S.D 0.05		للاسابيع 0.27				0.60	0.32
		للتداخل 2.07					

تــأثير رواشــح عــزلات الفطــر *A.niger* فــي مقــدار التلــف بأبصــال أصــناف البصــل المستخدمة في الدراسة :

أوضـحت النتـائج وكمـا فـي الجـدول 2 أن العزلـة 7 مـن الفطـر *A.niger* أدت الـى تلـف جميـع أبصال الأصناف المدروسة إذ بلغت مسافة التلــف للعزلــة المــذكورة 4.19 ســم قياســاً بالمقارنــة والتــي كانــت 0.08 سم ومـن الجـدول نفســه يتضــح أن الصــنف (RB) كــان أكثــر الأصــناف تــأثراً بعــزلات الفطــر *A.niger* إذ بلـغ معـدل الصـنف المـذكور 2.17 سـم قياسـاً بمعــدل الصــنفين (TEG و EWG) واللــذان بلغـا 0.73 و 1.52 سـم علـى التـوالي ، وكـان الأسبوع الرابع هوالأكثر تلفاً لجميع الأصناف إذ بلـغ معـدل تلـف الأسـبوع الرابـع 2.65 سـم مقارنــة بأقــل معــدل تلــف فــي الأســبوع الأول إذ بلـغ 0.38 سـم ، أمـا بالنسـبة للتـداخل فقـد تفوقـت بعــض العــزلات مــن الفطــر *A.niger* مــن بعـض الأصـنف فـي بعـض الأسـابيع والـذي بلـغ 6.00 سـم لكـل مـنهم وبفـرق معنـوي مـع أغلـب المعــاملات لجميــع العــزلات والاصــناف وللأسابيع المذكورة .

أن تلـك التـأثيرات الناتجـة مـن رواشـح عـزلات الفطـر *A.niger* قـد ترجـع الـى ان المركبـات الكيمياويــة الموجــودة فيهــا كأنزيمــات البيروكسـيديز والسـليليز والاحمـاض الدهنيـة والأمينيــة والمــواد الســامة قــد تنتقــل جهازيــاً لــتحطم منــاطق مــن نســيج العائــل بعيــدة عــن منطقـة الإصـابة ، أمـا أخـتلاف ابصـال الأصـناف فـي حساسـيتها للأصـابة مـن عـدمها فربمـا يرجـع الــى تواجــد المــواد الفينوليــة وتراكيزهــا فــي الأبصــال (6) و (2) ، وأشــارت العديــد مــن الدراسـات الـى ان رواشـح الفطـر *A.niger* قـد تحتــوي علــى مــواد تعمــل علــى زيــادة نمــو الإنبـات او اختزالـه ويـأتي هـذا التـأثير مـن خـلال احتــواء تلــك الرواشــح علــى مــوادٍ منظمــة لنمــو النبــات او تفــرز مــواد تســاعد فــي جهازيــة العناصـر ممـا يـنعكس إيجابـا فـي مؤشـرات النمـو كمــا يمكــن للفطــر *A.niger* ان يفــرز مــواد أيضـية سـامة تسـبب تعفـن ثمـار النبـات (19) و(15) .

إن معظـم أنـواع الفطـر *Aspergillus* لـه قابليـة أنزيميــة عاليــة تســاعده علــى اســتخدام مختلــف المـواد العضـوية والبروتينيـة كمصـادر غذائيـة مختلفــة فــي الظــروف البيئيــة المتعــددة ، وأن تـأثير الغـزل الفطـري فـي زيـادة أمتـداد الأصـابة ربمـا يعـود الـى أفـراز المـواد السـامة والأنزيمـات أضـافة الـى تـأثيره الميكـانيكي فـي تحطـيم النسـيج النبـاتي ، امـا فـي حالـة زيـادة أمتـداد الأصـابة فـي أستخدام راشح الفطر فقد يعود الى الأفراز

جدول(2) تأثير رواشح عزلات الفطر *Aspergillus niger* في مقدار التلف(سم)لأبصال بعض أصناف البصل .

العزلة	الصنف	مقدار التلف (سم) عدد الأسابيع				معدل العزلات	معدل الاصناف
		الأول	الثاني	الثالث	الرابع		
المقارنة	TEG	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	
	EWG	0.00	0.00	0.25	0.58		
	RB	0.00	0.00	0.00	0.17		
1	1	0.00	0.08	0.17	0.67	1.95	الصنف TEG 0.73
	2	0.25	1.00	3.00	6.00		
	3	0.00	1.25	5.03	6.00		
2	1	0.12	0.25	2.78	4.00	1.07	
	2	0.00	0.17	1.67	3.25		
	3	0.00	0.08	0.17	0.33		
3	1	0.00	0.00	1.33	4.93	2.23	
	2	0.25	0.75	1.25	4.67		
	3	0.50	1.25	5.87	6.00		
4	1	0.00	0.37	3.07	3.58	1.46	
	2	0.12	0.37	0.75	1.50		
	3	0.00	0.50	1.00	2.00		
5	1	0.00	0.00	0.17	0.58	2.81	الصنفEWG 1.52
	2	0.25	1.17	3.60	6.00		
	3	4.33	5.82	5.83	6.00		

	0.30	1.08	0.17	0.12	0.00	1	6
		0.25	0.12	0.12	0.00	2	
		0.75	0.50	0.50	0.00	3	
	4.19	5.33	4.65	1.50	1.00	1	7
		6.00	5.87	5.87	1.50	2	
		6.00	6.00	4.35	2.17	3	
	2.20	1.50	0.67	0.00	0.00	1	8
		4.17	2.95	2.50	0.33	2	
		6.00	3.80	3.33	1.17	3	
	0.83	0.17	0.08	0.00	0.00	1	9
		3.12	1.25	0.17	0.12	2	
الصنفRB		3.00	1.25	0.75	0.00	3	
2.17	1.04	0.75	0.50	0.25	0.00	1	10
		0.25	0.17	0.00	0.00	2	
		3.28	2.97	2.83	1.50	3	
	0.99	0.25	0.25	0.08	0.00	1	11
		0.58	0.25	0.25	0.12	2	
		3.17	2.85	2.08	2.00	3	
	0.67	0.25	0.00	0.00	0.00	1	12
		0.58	0.17	0.04	0.00	2	
		3.07	2.80	1.00	0.12	3	
	1.12	0.17	0.08	0.04	0.00	1	13
		4.17	3.63	3.25	0.25	2	

		1.25	0.62	0.00	0.00	3	
		2.65	1.85	1.00	0.38	معدل الاسابيع	
للاصناف =	للعزلات =		للاسابيع = 0.2896			L.S.D. 0.05	
0.2508	0.5418	للتداخل = 1.877					

التراكمي من المواد السامة والتي أدت الى تحلل النسيج النباتي قياساً بالمدة الزمنية القصيرة عند وضع الغزل الفطري على النسيج النباتي .

تأثير تغطيس ابصال البصل في المستخلص المائي الحار للزنجبيل على أصابة الأبصال بالفطر *A.niger* :

يتضح من نتائج الجدول 3 ان معاملة عالق أبواغ الفطر + جروح قد أدت الى زيادة مقدار التلف للابصال اذ بلغ معدل مقدار التلف 4.49 سم . وعند دراسة تأثير معدل الأسابيع يتضح من النتائج ان اعلى معدل تلف حصل في الأسبوع الثالث إذ بلغ معدل التلف 2.13 سم ، اما بالنسبة للتداخل يتضح ان وجود الجروح في ابصال البصل مع العالق البوغي للفطر *A.niger* وبوجود مستخلص الزنجبيل بالتركيزين 20 و 30 غم .لتر$^{-1}$ قد أدى الى زيادة نسبة تلف الابصال إذ بلغ أمتداد الأصابة 6 سم في حين أن أستخدام الزنجبيل مع العالق البوغي ومن دون جروح لم تحدث أصابة على الأبصال ، وربما يعزى السبب في ذلك الى أن أبواغ الفطر الموجودة في الجروح استطاعت الأنبات وتغلغل الفطر بعيداً عن تأثير مستخلص الزنجبيل ، وهذا بخلاف ما ذكر في بعض المصادر اذ اشارت ان للزنجبيل فعالية عالية ضد الفطر *A.niger* وهذا يتفق مع ما ذكره Grzanna (12) اذ ان الزنجبيل يحتوي على مايقارب 400 مركب من المركبات المختلفة وهي خليط من زيوت طيارة ومكونات غير طيارة مثل Gingerols و Shogaols وZingerone و Sesquiterpenoids وقد يعزى سبب تثبيط نمو الفطر *A.niger* بواسطة العصير الطازج للزنجبيل الى عدم تأثر المكونات الفعالة المتواجدة في المستخلص بسبب عدم استخدام مواد كيميائية اثناء الاستخلاص وقابلية الماء على اذابته في النبات وتحرير مواده الفعالة لذلك يتضح ان فعالية العصير الطازج عالية مقارنة بالمسحوق وهذا يتفق مع ماذكره Kapoor (14) الذي أوضح الى ان العصير الطازج للزنجبيل قد أدى الى تثبيط الفطر نمو الفطر *A.niger* .

كما إن الجدول 3 يوضح أن الزنجبيل ذو تأثير قليل أو غير واضح على نمو الفطر *A.niger* خصوصاً في التراكيز العالية وربما يعود السبب الى أن الفطر *A.niger* يزداد نشاطه الأنزيمي في تحطيم المركبات المؤثرة على جدار الخلية في الفطر مما يمنعه من الدخول

جدول (3) تأثير تغطيس أبصال البصل في المستخلص المائي الحار للزنجبيل على الأصابة بالفطر *A.niger*

المعاملات	نسبة التلف .سم$^{-1}$ عدد الاسابيع الأول	الثاني	الثالث	معدل المعاملات
ماء مقطر فقط	0.00	0.00	0.00	0.00
عالق بوغي + ماء مقطر	0.80	1.71	2.54	1.68
جروح فقط	0.25	0.25	0.25	0.25
عالق + جروح	1.83	5.63	6.00	4.49
زنجبيل 10*	0.00	0.08	0.10	0.06
زنجبيل 20*	0.00	0.08	0.08	0.06
زنجبيل 30*	0.00	0.08	0.08	0.06
زنجبيل 10 + جروح	0.25	0.42	0.50	0.39
زنجبيل 20 + جروح	0.33	0.58	0.75	0.56
زنجبيل 30 + جروح	0.25	0.83	1.00	0.69
زنجبيل 10 + عالق بوغي	0.00	0.00	0.00	0.00
زنجبيل 20 + عالق بوغي	0.00	0.00	0.00	0.00
زنجبيل 30 + عالق بوغي	0.00	0.00	0.00	0.00
زنجبيل 10+ عالق بوغي+ جروح	1.08	1.58	4.83	2.50
زنجبيل 20+ عالق بوغي + جروح	1.38	2.25	6.00	3.21
زنجبيل 30 +عالق بوغي +جروح	1.75	2.67	6.00	3.47
معدل الاسابيع	0.59	1.21	2.13	
L.S.D 0.05	للاسابيع 0.12			للمعاملات 0.24
	للتداخل 0.41			

10* اضافة الزنجبيل بحجم 10 غم. لتر$^{-1}$

20*إضافة الزنجبيل بحجم 20 غم .لتر$^{-1}$

30* إضافة الزنجبيل بحجم 30 غم .لتر$^{-1}$

جدول (4) تقدير سموم الاوكراتوكسين A و الأفلاتوكسين B1,B2 التي ينتجها الفطر *A.niger* باستخدام تقنية HPLC

المركب	زمن الاحتجاز	مساحة العينة	التركيز (مايكوغرام .مل$^{-1}$)		
			راشح فطري	الجزء المصاب	الجزء السليم
Ochratoxin	1.60	53251	0.568	1.129	0.449
Aflatoxin B_1	2.83	84890	0.231	0.578	0.188
Aflatoxin B_2	3.77	100865	0.141	0.319	0.162

الى داخل خلايا الفطر وأحداث تلف لها ، أما في معاملة الأبصال بالأبواغ وبوجود الجروح كان للفطر تأثير واضح في تلف نسيج البصلة لأن الفطر عندما يدخل من خلال الجروح

حتى لو كانت بسيطة سوف يتغلغل بسرعة الى مناطق بعيدة عن تأثير الزنجبيل ومن خلال أفرازه للأنزيمات والمواد السامة التي تم الكشف عنها في هذه الدراسة أدى الى تلف مناطق واسعة من الأبصال المعاملة .

تقدير سموم الاوكرا A و الأفلا B2,B1 باستخدام تقنية HPLC :

اشارت نتائج تحليل HPLC الموضحة في جدول 4 بأن للفطر *A. niger* له القدرة على أفراز ثلاثة أنواع من السموم وهي Ochratoxin وB_1 Aflatoxin و Aflatoxin B_2 ، حيث كان أعلى تركيز ل Ochratoxin في معاملة الجزء المصاب من البصلة إذ بلغ التركيز 1.129 مايكروغرام. مل$^{-1}$ وأقل تركيز هو 0.449 مايكروغرام .مل$^{-1}$ في معاملة الجزء السليم من البصلة في حين كان أعلى تركيز من B_1 Aflatoxin هو 0.578 مايكروغرام .مل$^{-1}$ في معاملة الجزء المصاب من البصلة ايضاً وأقل تركيز في معاملة الجزء السليم والتي كانت 0.188 مايكروغرام. مل$^{-1}$، أما B_2 Aflatoxin حيث كان أعلى تركيز للسم 0.319 مايكروغرام / مل في معاملة الجزء المصاب من البصلة وأقل تركيز 0.141 مايكوغرام. مل$^{-1}$ في معامل الراشح الفطري مقارنة مع بقية المعاملات، في حين كان تركيز Ochratoxin أعلى من تركيز Aflatoxin

B_1 و B_2 Aflatoxin على التوالي في جميع المعاملات .

يمتاز الجنس *Aspergillus* sp. بأنواعه المنتجة لمركبات سامة غاية في الخطورة ، فقد بين Weidong (26) بأنه ينتج مركبات مسرطنة ومطفرة مثل مركبات الـ Aflatoxins وهي مصنفة إلى أنواع منها B1 وB2 وG1 و G2 وM1 وكذلك مركبات Ochratoxins ، وان قدرة الفطر على افراز السموم تعتمد على كثير من العوامل منها سلالة الفطر والمادة الغذائية التي ينمو عليها الفطر والظروف البيئية (18) ، وهذه النتائج تتفق مع ماذكره Gherbawy (10) ، والذي اشار الى ان 25% من عزلات *A. niger* المعزولة من التمر قادرة على انتاج الاوكراتوكسين A .

المصادر :

1. المنظمة العربية للزراعة والتنمية،2008. الكتاب السنوي للإحصاءات الزراعية – المجلد (28) – الخرطوم ، السودان.

2. ديوان ، مجيد متعب ، عذراء عمران صاحب وسحر محمد جواد. 2007. تعزيز قدرة الفطر *Trichoderma harzianum* Rifai لتحسين نمو ومقاومة الذبول الرايزوكتوني على الباميا. مجلة جامعة كربلاء. 5(3) 505-511 .

3. Akiyma H and D.Y. Chen , 1999 . " simple HPLC determination of aflotoxin B1.B2.G1.G2 in nut and corn , J of food Hygienic Scocity of Japan . 37(4):195-201.

4. Anonymous. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) website.

5. Balzer , I ; C , Boddanic and Pepljujak S., 1978. Rapid thin layer Chrmatographic method for determining Aflatoxin B1,Ochratoxin A, and Zearalenon in Corn . J . Assoc . of . Anal . Chem., 61: 584 – 585 .

6. Domsch, K.H; W, Gams and Anderson، T.H. 2003. Compendium of soil fungi . Academic press , London.England .pp. 894.

7. EL-Abd, S.M. 2002. Studies on some fungal diseases infection crop in Egypt. Ph. D. Thesis Submitted to University. of Alexandria.Egypt. pp 204.

8. El-Nagerabi, S.A.F. and R.M.O, Abdalla . 2004. Survey of seedborne fungi of Sudanese cultivars on onion, with new records. Phytoparasitica, 32(4): 413-416.

9. El-Nagerabi, S.A.F. and A.H.M, Ahmed, 2003. Storability of onion bulbs contamination by *Aspergillus niger* mold. Phytoparasitica, 31(5): 515-523.

10. Gherbawy , A. Y ;H. M, Elhariry and Bahobial . A. S., 2012. Mycobiota and Mycotoxins (Aflatoxins and Ochratoxins) Associated with some Saudi Date Palm Fruits . Food Borne Pathogens and Disease , 9 (6) :561-567.

11. Griffith , G. ; L, Truemen , T, Crowther, B,Thomas and Smith B. 2002. Onion – Aglobal benefit to health . Phytotherapy Researsh , 16 (7): 603-615.

12. Grzanna, R., L, Lindmark and Frondoza,C.G. 2005. Ginger herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. J. Med. Food , 8: 125- 132 .

13. Hrazdina, G.; W, Borejsza-Wysocki and Lester, C. 1997. Phytoalexine production in an apple cultivars resistant to *Venturia inaeqalis*. Phtyopathology, 87: 868-876.

14. Kapoor, A. 1997. Antifungal activities of fresh juice and aqueous extracts of turmeric and ginger (*Zingiber officinale*). J. Phytological Res, 10: 59.

15. Lozovaya , V.V.; A.V,Lygin ; O.V, Zernova ; S., Li; J.M, Windholm and Hartman. G.L.. 2006. Lignin degradation by *Fusarium solani* f. sp. *glycines.*Plant Dis.9,77-82.

16. Macfoy, C.A. and I.M. Smith. 1985. Interrelationship between nutrients, pathogenicity, and phytoalexin metabolism of *Botrytis cinerea* on clover leaves. Phytopath., 116:193-200.

17. Mumtaz, K. I. 2008. Heath and nutrition. Bawarchi Health and Nutrition Onion. The Kitchen Herb.htm.
feedback@bawarchi.com.

18. Nachman, P . and R, Barkai-Golan. 2011.Mycotoxins In Fruits And Vegetables , CA :Academic press ,SanDiego , pp.185-203.

19. Ozbay, N and S. E, Newman. 2004. *Fusarium* crown and root rot of tomato and control methods. Plant Pathol, J.3,(1):9-18.

essential oils and methanol extracts of the *Salvia cryptantha* (Monthbret et Aucher ex Benth.) and salvia multicaulis (Vahl). Food Chemistry, 84(4): 519-525.

24. Tian, S. ; Q, Fan ; Y, Xu and Liu, H. B. 2002 . Biocontrol Efficacy of Antagonist Yeasts To Gray Mold and Blue Mold on Apples And Pears In Controlled Atmospheres . Plant Dis; 86:848 853 .

25. Wani AH and Taskeen-Un-Nisa. 2011. Management of black mold rot of onion. Journal of Mycology and Plant Pathology, 9 (1): 43-49.

26. Weidong. W.U. 1993. Components of a mycotoxin problem. Published under the joint sponsorship of the united Nations Environmental program and the world Health organization . Agric Sci; 20(1): 164-165.

27. Randle, W.M. 1997. Onion flavor chemistry and factors influencing flavor intensity. Amer. Chem. Soc. 5: 42-52.

20. Raju K. and M.K, Naik . 2007. Survey and assessment for the post harvest diseases of onion in north-eastern Karnataka. Karnataka J Agric Sci , 20(1): 164-165.

21. Samson RA; J, Houbraken, RC, Summer bell, B, Flannigan and Miller, J.D. 2001 . Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: Microorganisms' in Home and Indoor Work Environments. New York: Taylor & Francis.USA. pp. 287– 292 .

22. Singh, D.K.; J.P.N, Pandey and Srivastava, K.J. 2003. Studies on the physico-chemical constituents of some important varieties of onion (*Allium cepa*).News Letter National Horticultural Research and Development Foundation,23(1):4-9.

23. Tepe, B.; E, Donmez; M,Unlu; F,Candan; D,Daferera ; G,Vardar-Unlu; M,Polissiou, and Sokmen, A. 2004 . Antimicrobial and antioxidative activities of the

مجلــة الكوفــة للعلــوم الزراعيــة 9 (4) : 181 – 199 2017

Effect of some isolates of *Aspergillus niger* on onion(*Allium capa* L.) bulbs rot and its control by hot extract of ginger

Burair Ahmed Nasir Gammaaz Majeed M. Dewan

Department of Plant Protection ,Faculty of Agriculture ,University of Kufa ,Republic of Iraq

Abstract :

Pathogenicity test of 13 isolates of *A.niger* on onion bulbs revealed that all tested of onion cultivars, Texas Early Grano (TEG) , Early White Grano (EWG) and Red Baron (RB) , were susceptible to all tested isolates . However, the isolate 3 was the most distrutivars isolate that caused diagonal damage on bulbs that reached 4.29 cm . while the EWG was a highly effected cultivars by all isolates , the mean diagonal damage was 2.19 cm during of 4 weeks.

Exudates of *A.niger* isolates also had the ability to rot bulbs and caused diagonal damage, the isolate 7 caused highly affected diagonal damage of 4.19 cm, while the cultivar RB was the most affected cultivar by all tested isolates,the diagonal damage mean of this cultivars was 2.17 cm . The isolate 3, among all tested isolates, was the most pathogenicity of all cultivars. Also the result of dipping of bulbs in a hot extract of ginger for 5 minutes showed decreasing in bulbs infection by blak rot rot .

Isolate 3 had the ability to produce ochratoxin , aflatoxin B_1 and aflatoxin B_2 in the infected bulbs , the ochratoxin had the highest concentration in infected parts reaching to 1.129 $mg.ml^{-1}$. The non-infected part of bulb, showed containing of ochratoxin, aflatoxin B_1 and aflatoxin B_2 at concentrations of 0.449 , 0.188 and 0.162 $mg.ml^{-1}$, respectively .

Key words : *Aspergillus niger* , Ochratoxin , Aflatoxins , Onion , Ginger

Part of M.Sc of the first author