دراسة خصائص عزلات من أنواع الفطر Alternaria وبيان كفاءتها الأنزيمية المعزولة من أوراق نباتات الزينة[١]

نور أحمد شهاب أحمد الحيالي أ.م.د. ورقاء سعيد قاسم الطائي

جامعة الموصل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

(قدم للنشر في ٢٠١٩/٥/١٤ ، قبل للنشر في ٢٠١٩/٦/٣٠)

ملخص البحث: تم عزل وتشخيص وتنقية الفطريات المُمرضة المسببة لتبقع الاوراق لعدة أنواع من نباتات الزينة، إذ تم الحصول على 299عزلة فطرية عائدة لعدة أجناس فطرية وانتخبت الأنواع التابعة لجنس *Alternaria* لإجراء التجارب عليها . جرى حساب مُعدلات أقطار مستعمرات الفطر *Alternaria* وقد حققت العزلة *A.dianthi*$_2$ المعزول من نبات الجربيرا أعلى نمو قطري 39.50ملم، بينما تدرجت باقي الأنواع في معدلات أقطارها حيث كان قطر العزلة *A.alternata*$_4$ 34.50ملم والعزلة *A.logipies* 31.50ملم ووصل معدل قطر العزلة *A.radicine* 29.5ملم. فضلاً عن الإستعانة بشريحة العد Haemocytometer لحساب عدد الأبواغ وقد حققت العزلة *A.alternata*$_5$ المعزولة من نبات الهايدرا أعلى إنتاج للأبواغ إذا بلغ $23*10^4$بوغ. ولبيان تأثير الدور البيئي على النمو الفطري تم دراسة تأثير درجات الحرارة المختلفة على مُعدلات أقطار المستعمرات الفطرية النامية، وتبين أن أفضل نمو للفطر *Alternaria* كان عند درجة الحرارة (25±2)°م إذا وصل قطر المستعمرة بعد 7 أيام من التحضين إلى 53.5ملم لعزلة الفطر*A.dianthi*$_3$ ولم يحدث نمو فطري عند درجة الحرارة 45°م لجميع العزلات المستخدمة في التجربة.

Studying the Properties of Isolates of the Alternaria Species and Indicating Their Enzymatic Efficiency Isolated from Leaves of Ornamental Plants

Abstract: The isolation, diagnosis, and purification of pathogenic fungi causing leaf stains for a variety of ornamental plants were done. Two-hundred and ninety nine fungal isolates belonging to several fungal genes were obtained and *Alternaria* species were selected for experimentation. The differences in the colonies diameter of *Alternaria* species were obtained. *A.dianthi*$_2$ species isolated from the Gerbera plant achieved the highest diagonal growth of 39.50 mm, the rest of the species were included in their diameter was *A.alternata*$_4$ 34.50 mm, the isolates of *A.logipies* 31.50 mm and *A.radicine* 29.50 mm. Moreover the results from the use of the count Haemocytometer, to calculate the number of spores were, *A.alternata*$_5$ isolated from the hydra plant scored the highest production of spores $23*10^4$ spore. To show the effect of the environmental role on the fungal growth, the effected different temperatures on the diameters of the developing fungal colonies was studied. The best growth of the *Alternaria* fungi was at 25±2°C that diameter of the colony after 7 days of incubation reached 53.5 mm for isolation *A.dianthi*$_3$ fungi. No fungal growth occurred at 45°C for all isolates used in the experiment.

---

(١) مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول.

المقدمة:

تعد الفطريات من مُسببات الأمراض النباتية وهي مجموعة من الكائنات الدقيقة التي تُظهر تنوع كبير جداً خلال دورات إصابتها (Fernandez-Acero وأخرون،2007). هذا التباين سمح لها بإصابة مدى واسع ومتباين من المحاصيل (Garrido وأخرون، 2010). إن تعرض النباتات لظروف بيئية مُختلفة يجعلها عُرضة للإصابة من قبل مجاميع مُتنوعة من الكائنات الدقيقة مثل الفطريات والفايروسات والديدان الخيطية والبكتريا المسببة للأمراض (Hof،2001; Chang وأخرون، 2008; Korres وأخرون، 2011; Bajpai وKang، 2012). وتشير العديد من التقديرات إلى تأثر مايقارب 25% من المحاصيل بالعالم بالنمو الفطري والأعفان (Jimenez-Reyes واخرون،2018). وتُعد الفطريات من عوامل الإصابة لدى النبات وتُسبب لهُ خسائر كبيرة. حيث إنها تُصيب عدة مضائف لنباتات الطبية ونباتات الزينة مثل نبات الجربيرا *Gerbera jamesonii* (Mirkova و onstantinova ،2003) وتتضمن الفطريات الناقصة Ascomycetes جنس *Alternaria* والذي يشمل أنواع رمية التغذية Saprophytic ومتغذية داخلية على الكائنات الحية Endophytic والتي تعرف بأنها مُدمرة لأعضاء النبات المصاب. حيث أنَ العديد من مُسببات الأمراض الفطرية تُسبب تبقع الأوراق وتساقطها في النباتات الحاضنة لها ويمكن القول بأن الأكثر ضرراً وإنتشاراً هي المُسببة بوساطة أنواع جنس *Alternaria*. كما إن إنتاجها للسموم المتخصصة-Host Specific Toxins (HSTs) يعد من عوامل نشوء الإمراضية (Mamgain وأخرون،2013). تختلف أنواع فطر *Alternaria* في أشكال المستعمرات، والابواغ من حيث أطوال الابواغ وعرضها، وجود المنقار وطوله بالإضافة إلى عدد الحواجز البوغية(Chethana وأخرون،2018). وابواغ هذا الجنس عادةً تكون بُنية غامقة إلى سوداء وتظهر على شكل كُتلة شبُه شُيعرية سوداء على الأوراق وعلى شكل بقع على الأوراق التويجية عِندما تكون الظروف مثالية. حجم الابواغ وإمتلاكها لعدة خلايا جعلها تعيش على سطح الأوراق لمدة أطول، كما إن اللون الداكن للسبور يحميها نوعاً ما من الأشعة فوق البنفسجية للشمس. إن أنتشار المرض المسبب عن الفطر *Alternaria* من نوع أزهار إلى أخر يمكن أن يحدث بنفس النوع الفطري لذلك فإن التدابير للسيطرة على المرض يجب تركز على كل النباتات التي تكون سريعة التأثر (Chase،2005). ومن مسببات الأمراض النباتية

الأخرى هي *A.longipies* التي تُعد عامل مسبب التبقع البني للتبغ، *A.mali* المُسببة تبقع التفاح، *A.gaisen* التي تُسبب التبقع الأسود للكُمثرى و*A.arborescens* المُسببة لتقرح السيقان في الطماطة. يعتمد جنس *Alternaria* في إمراضيتهِ على مقاومة وحساسية المضيف وإنتاجهِ للسمُوم المُتخصصة وغير المُتخصصة للعائل (Meena وأخرون، 2017a) .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Collection Specimens

جمعت عينات لأوراق نباتات الزينة المصابة بمرض تبقع الاوراق من مناطق المشاتل في الموصل شملت: الفيصلية، الدركزلية، المهندسين وحدائق جامعة الموصل للفترة من بداية شهر تشرين الثاني لسنة 2017 ولغاية شهر ايار لسنة 2018 وبواقع زيارة لكل 20 يوم وتمثلت هذه العينات بأخذ أوراق مصابة لكل من نباتات (الجمبد*Rose damascene* ، الكاردينيا *Gardenia Jasmineoides* ، الارس*Iris* ، التويا*Thuja Orientalis*، الفوجيرا*Ladder Fern* ، الجربيرا*Gerbera Jasmesonii* ، اليوغا الظلي*Yucca* ، اللبلاب المتسلق*Lablab Dolichos* ، الهايدرا *Canary island IVY* ، الشيفليرية *Umberlla tree* ، الفكس*Ficus Hawaii* ، رجل البطة *Syngonium Podophllum* ، الدراسينا الخيطي *Madagascar Dragontre*، الارااليا *Finger Aralia plant paper*).وحفظت في اكياس نايلون نظيفة ونقلت الى المختبر لإجراء الدراسة عليها .

الوسط الزرعي Culture Medium

وسط مستخلص البطاطا والسكروز والآكار Potato Sucrose Agar (PSA)

تم استخدام هذا الوسط لعزل وحفظ وتنشيط العزلات المستخدمة والموصوف من قبل (Pitt و Hocking،2009 ; Sibounnavonng وأخرون،2009b) .

عزلات الفطر *Alternaria*

عزل الفطر *Alternaria* من أوراق نباتات الزينة المصابة

تم اختيار الاوراق النباتية التي ظهرت عليها اعراض التبقع وغسلت بماء الحنفية وذلك للتخلص من الاتربة، ثم قطعت الى قطع صغيرة بمساحة 1سم وغمرت بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم 1% Sodium hypochlorite solution (NaOCI) لمدة دقيقتين وذلك لغرض التعقيم السطحي ، بعدها غسلت بالماء المقطر ثم نقلت باستخدام ملقط معقم إلى اوراق ترشيح تحت

ظروف التعقيم لتجفف ووزعت على الاطباق الحاوية على مستخلص البطاطا والسكروز والآكار وبواقع 4 قطع نباتية لكل طبق ،حضنت بالحاضنة لمدة 7 ايام عند الدرجة الحرارية (25±2)°م مع المراقبة اليومية اثناء فترة التحضين (Naik وأخرون،2010a). بعد انتهاء فترة التحضين حددت العزلات الفطرية التابعة لجنس *Alternaria* وحفظت.

التعرف على الصفات المزرعية للفطريات المعزولة و تشمل:-

أ- النمو القطري Radial Growth

تم متابعة النمو القطري لمستعمرات الفطر بأخذ قرص بقطر5 ملم من مستعمرات فطرية نقية فتية بعمر اسبوع ولقحت على اطباق حاوية على وسط PSA ووضعت في و٠سط الطبق وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة وحضنت لمدة 5 ايام عند الدرجة الحرارية (25±2)°م مع المتابعة اليومية .تم حساب المتوسط لقطرين متعامدين لكل مستعمرة.

ب- حساب عدد الابواغ

اعتمدت طريقة Sibounnavong وأخرون (2009b) لحساب عدد الابواغ للفطر حيث اخذ قرصين بقطر 5 ملم من مستعمرة فطرية بعمر 5 ايام وذلك لتحضير العالق البوغي ووضعت داخل انابيب اختبار Plane tube 10 مل حاوية على خرزات زجاجية صغيرة وماء مقطر معقم 5 مل ولتفتيت الآكار وتكسير السلاسل البوغية رجت الانابيب باليد وبوساطة جهاز الهز Vortex للحصول على العالق ذو التخفيف10^0 ولحساب عدد الابواغ لكل مستعمرة فطرية بالمللتر الواحد اخذت قطرات من العالق البوغي ووضعت على شريحة العد Haemocytometer واستخدمت قوة التكبير(40, 10x) لعد الابواغ وبمعدل ثلاث قراءات لكل عزلة.

تأثير درجة الحرارة على النمو

Effect of Temperature on Growth

لبيان تأثير الدرجات الحرارة المُختلفة على عزلات *Alternaria.sp* وتحديد الدرجة الحرارية المثالية لنمو العزلات الفطرية المختلفة أُستخدمت درجات حرارية مختلفة كالأتي:-

(5, 15, 25, 35, 45)°م مع ثبات الأس الهيدروجيني عند 6 للوسط ، أُخذ قرص 5 ملم من المُستعمرة الفطرية بإستخدام ثاقبة فلين مُعقمة ولُقح على طبق بتري حاوي على 20مل PSA وحُضنت لمدة 7 ايام وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة وقُدرت النتائج بعد إنتهاء فترة التحضين بقياس

المتوسط كل قطرين متعامدين (Garibaldi وأخرون،2007 ; الطائي،2007) .

اختبار قدرة عزلات بعض انواع جنس *Alternaria* على انتاج الأنزيمات الخارج خلوية

انتخبت (18) عزلة فطرية تابعة لجنس *Alternaria* وأُجرى الإختبار النوعي Qualitative لتوضيح قدرة العزلات على انتاج أنزيمي البكتينيز Pectinase والسليوليز Cellulose بإستخدام أوساط الزرع الصلبة وكما يلي:-

أ- فعالية انزيم البكتينيز Pectinase Activity

أستخدم الوسط الصلب الموصوف من قبل (Kitajima وأخرون1975 ; Reda وأخرون،2008; Simb، 2009) . لبيان قابلية العزلات على إنتاج أنزيم البكتينيز ولقحت الأطباق بأخذ قرص 5ملم من مستعمرة الفطر وحضنت لمدة 5 أيام عند الدرجة الحرارية(25±2)°م. وتم الكشف بإستخدام مادة (CTAB)

Cetyl trimethyl ammonium Bromide
تم اضافة الكاشف الى الطبق وترك لمدة 10 دقيقة ثم سكب المحلول وترك الطبق ليجف. حيث أن ظهور هالة شفافة حول المستعمرة يدل على إنتاج الفطر للأنزيم.

ب- فعالية انزيم السليوليز Celleolytic Activity

أستخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (Yeoh وأخرون،1985 ; Kluepfel،1988) . بأستخدام وسط الكاربوكسي مثيل سليوليز أكار Carboxy Methyl Cellulose Agar (CMC Agar) لبيان قابلية العزلات على إفراز أنزيم السليوليز ولقحت الأطباق بقرص قطر 5ملم وحضنت بدرجة حرارة (25±2)°م. وللإستدلال على انتاج انزيم السليوليز استخدم كاشف يود- حامض الهيدروكلوريك Iodine-Hcl الذي حضر(من 100مل من HCl بتركيز0.1 مولاري + 500مل من محلول 2% KI وزن/حجم +1% I وزن/حجم)، تم اضافة الكاشف الى الطبق وترك لمدة 10 دقيقة ثم سكب المحلول وترك الطبق ليجف. إن ظهور منطقة شفافة حول المستعمرة يدل على انتاج الفطر للانزيم (Sunitha وأخرون،2013 ; Meddeb-Mouelhi وأخرون، 2014).

النتائج والمناقشة

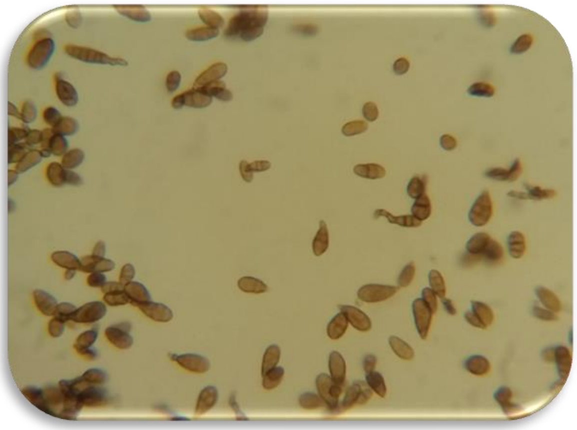
العزلات المستخدمة لإجراء التجارب قيد الدراسة

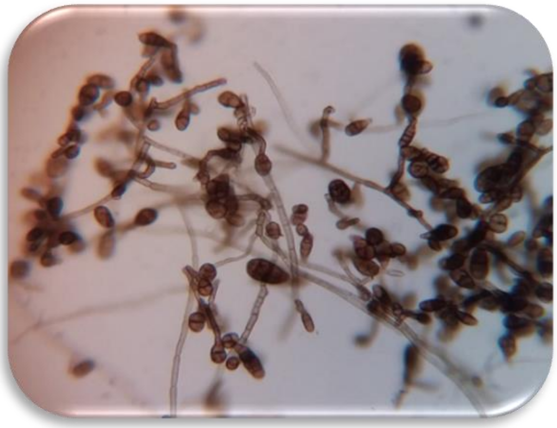
تم عزل الفطريات من اوراق نباتات الزينة المصابة بالتبقع والحصول على (229) عزلة فطرية لأنواع تابعة لجنس *Alternaria* بالإضافة إلى أجناس فطرية أخرى، وقد تباينت الأنواع الفطرية التابعة لجنس *Alternaria* التي ظهرت خلال العزل وظهرت أربع أنواع فطرية تابعة للجنس *Alternaria* وهي *A.dianthi, A.longipies, A.radicine, A.alternata* وكان النوع الفطري *A.dianthi* هو الأكثر تردداً . وأختيرت بعض من هذه العزلات العائدة لهذه الأنواع الاربعة العائدة لجنس *Alternaria* وتم ترميزها في الجدول تبعاً لرقم السلالة الفطرية العائدة للنوع الفطري ضمن المجموعة المعزولة من كل نبات وحسب الترميز في الجدول لإجراء التجارب عليها .

الجدول(1) يوضح ترميز العزلات الفطرية المستخدمة قيد الدراسة.

النبات العائل	اسم العزلة ورمزها
الارس *Iris*	*Alternaria dianthi*$_1$
الارااليا *Finger Aralia plant paper*	*Alternaria alternata*$_1$
التويا *Thuja Orientalis*	*Alternaria radicine* *Alternaria alternata*$_2$
الجربيرا *Gerbera Jasmesonii*	*Alternaria alternara*$_3$ *Alternaria dianthi*$_2$
الجمبد *Rose damascene*	*Alternaria alternata*$_4$
الدراسينيا *Madagascar Dragontre*	*Alternaria dianthi*$_3$
الشيفليرية *Umberlla tree*	*Alternaria dianthi*$_{4a}$ *Alternaria dianthi*$_{4b}$ *Alternaria dianthi*$_{4c}$

Alterrnaria dianthi$_{5}$	*Ladder Fern* الفوجيرا
Alternaria dianthi$_{6a}$ *Alternaria dianthi*$_{6b}$ *Alternaria dianthi*$_{6c}$	*Ficus Hawaii* الفكس
Alternaria dianthi$_{7}$	*Gardenia Jasmineoides* الكاردينيا
Alternaria longipies	*Lablab Dolichos* اللبلاب المتسلق
Alternaria alternata$_{5}$	*Canary island IVY* الهايدرا


Alternaria alternate


Alternaria dianthi

الصورة(1) توضح النوع الفطري الأكثر ترددا والمعزول من اوراق نباتات الزينة.

1–حساب مُعدل النمو القطري للمستعمرات وكثافة العالق البوغي للعزلات الفطرية

تم تنمية العزلات الفطرية المختلفة على وسط PSA وبعد 5 أيام من التحضين نمت العزلات الفطرية بشكل متباين كما موضح في الجدول (2) حيث حققت العزلة $A.dianthi_{2}$ المعزولة من نبات الجربيرا *Gerbera jasmesonii* أعلى مُعدل نمو (39.5) ملم تليها العزلة الفطرية $A.dianthi_{6c}$ المعزولة من نبات الفكس *Ficus Hawaii* حيث وصل مُعدل قطر المستعمرة إلى (37.50) ملم وتدرجت باقي العزلات التابعة لنفس النوع في أقطارها. كما وصل قطر المستعمرة للعزلة *A.longipies* إلى (31.50) ملم المعزولة من نبات اللبلاب *Lablab*، بينما إمتلكت العزلة الفطرية التابعة لنبات الثويا *Thuja orientalis* أقل مُعدل نمو إذ بلغ قطر المستعمرة (29.5) ملم والعائدة للنوع الفطري *A.radicine* وهذا مطابق لماذكره (Gilbertson وPryor، 2000) بوصفه بأنه بطيء النمو، أما باقي العزلات التابعة للنوع *A.alternata* كانت مختلفة معنوياً في معدلات أقطارها ووصل أعلى قطر مستعمرة إلى (34.50) ملم في العزلة $A.alternata_{4}$ المعزولة من نبات الجمبد *Rose damascene*. إن زيادة فترة التحضين تؤدي إلى زيادة أقطار المُستعمرات عند الدرجة الحرارية (25±2) °م وهي الدرجة الحرارية الملائمة لنمو الفطر على وسط PSA وهذا يتفق مع ما ذكره (Mishra وThawani، 2016; Chethana وأخرون، 2018) .

أما بالنسببة لكثافة العالق البوغي فقد أظهرت النتائج بأن جميع عزلات الفطر *Alternaria* كفؤة في إنتاجها للأبواغ عند درجة حرارة(25±2) °م ومدى PH حامضي وهذا يتفق مع ماتوصل إليه (Mishra وThawani، 2016) . كما أن لكل نوع فطري حد أعلى وأدنى للنمو وإنتاج الأبواغ حيث أعطت العزلة $A.alternata_{5}$ أكثف عالق بوغي إذ بلغ (23×10^{4}) بوغ/مل بينما أعطت العزلة $A.dianthi_{4a}$ أقل كثافة للأبواغ وهي (3×10^{4}) بوغ/مل. ولأن الظروف المستخدمة في إجراء القياسات لأقطار المستعمرات ولحساب الأبواغ كانت موحدة فإن سبب الإختلاف قد يعود إلى طبيعة كل عزلة فطرية. كما أن الإنتاج الغزير للأبواغ تعد من العوامل الرئيسية في إنتشار الفطر وتمكينه من غزو عوائل جديدة والإنتشار بصورة سريعة (Agrios، 2005).

الجدول(2) يوضح متوسطات اقطار المُستعمرات للعزلات الفطرية وعدد الأبواغ (10^4X بوغ/مل) بعد التنمية على وسط PSA لمدة 5 ايام وعند الدرجة الحرارية (25±2) °م.

العزلات	أقطار المستعمرات/ملم	عدد الأبواغ 10^4X
A.dianthi₂	39.50* أ	11.5 ب ج د
A.dianthi₆c	37.50 أ ب	14 ب ج
A.dianthi₆a	36.50 أ ب ج	13 ب ج
A.dianthi₄c	35.50 أ ب ج د	4 د هـ
A.dianthi₄a	35 أ ب ج د	3 هـ
A.alternata₄	34.50 أ ب ج د	17أ ب ج
A.dianthi₁	34 أ ب ج د	11ج د هـ
A.dianthi₄b	33.50 أ ب ج د	4.5 د هـ
A.alternata₃	33 أ ب ج د	13.5 ب ج
A.dianthi₇	32.50 ب ج د	10.5ج د هـ
A.dianthi₆b	32.50 ب ج د	15 أ ب ج
A.alternata₅	32 ب ج د	23 أ
A.dianthi₃	32 ب ج د	13 ب ج
A.longipies	31.50 ب ج د	17 أ ب ج
A.alternata₂	30.50ج د	9.5ج د هـ
A.radicine	29.50 د	20 أ ب

*الأرقام في الجدول ناتجة عن أخذ المتوسط لثلاث مكررات.

**الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تعبر عن وجود فروقات معنوية ضمن إختبار دنكن متعدد المدى .

2 تأثير درجة الحرارة على النمو

تعد درجة الحرارة من اكثر العوامل الفيزيائية اهمية لتنظيم النمو والتكاثر للفطريات (Marin وFernandez، 2006 Garibaldi; وأخرون، 2007) . ويسبب الفطر *Alternaria* خسائر نوعية وكمية للمحاصيل وإن زيادة المرض تتأثر بمختلف العوامل الفيزيائية مثل الضوء، الحرارة، PH وغيرها (Jadhav وWadikar، 2018) . ومن خلال التجربة أُستخدمت خمس درجات حرارية تراوحت ما بين (5-45) °م ولفترة تحضين 7أيام كما موضح في الجدول(3)وذلك لإيجاد الدرجة المُثلى وأقل وأعلى درجة حرارية يحدث خلالها النمو الفطري للعزلات التابعة لجنس *Alternaria*. وقد أظهرت جميع العزلات نمواً جيداً عند الدرجة الحرارية 25°م حيث وصل مُعدل النمو الفطري للعزلة *A.dianthi*$_3$ إلى (53.5) ملم تلتها الدرجة 15°م وبمعدل نمو (25.25) ملم للعزلة *A.dianthi*$_{6c}$بينما وصل قطر المستعمرة للعزلات*A.dianthi*$_7$ و*A.dianthi*$_3$ (18.5) ملم عند الدرجة الحرارية 35°م، و (16.75) ملم للعزلة *A.dianthi*$_7$ عند 5°م وهذا يتفق مع (Rout وأخرون، 2015) . وبالنسبة للجنس *A.Alternata* كان أفضل نمو عند الدرجة الحرارية 25°م إذ بلغ قطر المستعمرة الفطرية للعزلة *A.alternata*$_1$ (50.5) ملم و (14.5) ملم لنفس العزلة عند الدرجة 5°م، بينما كان النمو جيد عند الدرجة 15°م ووصل إلى (23) ملم للعزلة *A.alternata*$_4$، بينما وصل قطر المستعمرة للعزلة *A.longipies* إلى (38.5) ملم وإلى (36.75) ملم للعزلة *A.radicine* عند الدرجة الحرارية 25°م. وهذا يدل على ضراوة هذه الأنواع لإحداث الإصابة ومقدرتها على الإصابة حتى عندما تكون الظروف غير مناسبة وهذا ما أشار إليه (Agrios، 1997) . بينما كانت أقطار المستعمرات لنفس النوع الفطري منخفضة النمو عند 35°م ومتوسطة عند الدرجة 5°م وهذا ما بينه كلاً من (Pitt وHocking، 1997; Martin وFernandez، 2006; Garibaldi وأخرون، 2007) بأن الدرجة الحرارية المثالية لنمو هذا النوع الفطري كانت عند 27°م. أما النوع *A.dianthi* أيضاً كان أفضل نمو فطري عند 25°م إذ كان قطر المستعمرة (53.5) ملم كما لوحظ نمو جيد للفطر عند (5-15) °م بسبب طبيعة الفطر في إصابة نباتات الزينة والتي تنمو عادةً في درجات حرارة منخفضة للحفاظ عليها وبذلك نلاحظ إستمرار النمو للمستعمرات وبشكل جيد حتى عند وصول درجة الحرارة إلى 5°م (Ellis، 1971 ;Chase، 1998) . بينما لم

يلاحظ حدوث أي نمو فطري لكافة الانواع عند الدرجة الحرارية 45°م وهذا يتماشى مع مابينهُ (Wolf وWolf، 1947)، بأن القليل من الفطريات تكون ذات فعالية بعد 40°م وبأن الفطريات تكون عالية الحساسية للدرجات الحرارية المتوسطة. وبذلك يتبين أن أفضل درجة حرارة لنمو الفطر *Alternaria* هي ما بين (25-30) °م وهذه النتيجة تتطابق مع ما توصل إليه (Jadhav وWadikar، 2018) حيث بينا أن العزلات الفطرية التابعة لجنس *Alternaria* تزداد بالنمو عند وصول درجة الحرارة إلى 25°م. وبصورة عامة تبين أن الحد الأقصى للنمو الفطري يتراوح مابين (5-35) °م وهذا يتماشى مع ماذكره (Ferron، 1978) .

الجدول(3) يوضح تأثير درجات الحرارة المختلفة على معدل أقطار المستعمرات الفطرية التابعة لعزلات أنواع جنس *Alternaria* بعد التنمية على وسط PSA ولمدة 7 أيام من التحضين.

العزلات/درجة الحرارة	5°م	15°م	25°م	35°م	45°م
$A.dianthi_{6c}$	15.5*	25.25	41	17	0
$A.dianthi_{3}$	15.5	24	53.5	18.5	0
$A.\ alternata_{4}$	12.75	23	48	15	0
$A.dianthi_{1}$	15.5	22.5	44.5	17.25	0
$A.dianthi_{5}$	13	21.25	51	17.5	0
A.radicine	12	21	36.75	15	0
$A.alternata_{1}$	14.5	19.75	50.5	10	0
$A.dianthi_{7}$	16.75	19.25	50	18.5	0
$A.dianthi_{4a}$	14	16.75	47.5	14.5	0
A. longipies	13.75	14.5	38.5	11	0

*الأرقام في الجدول ناتجة عن أخذ المتوسط لثلاث مكررات .

3-إفراز الأنزيمات الخارج خلوية (البكتينيز والسليوليز)

تم من خلال التجربة الكشف عن قابلية العزلات التابعة لجنس *Alternaria* على إنتاج انزيمي البكتينيز والسليوليز في الاوساط الصلبة، حيث أختبرت الكفاءة الأنزيمية لعدد من العزلات كما موضح في الجدول(4) وتم أختيار عزلات عائدة للنوع الفطري *A.dianthi* والنوع *A.Alternata* وبعد إنتهاء التحضين لمدة 5 أيام تم إضافة الكاشف حيث أن ظهور هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية دلالة على إنتاج الفطر للأنزيم. بالنسبة لأنزيم البكتينيز بعد إضافة الكاشف CTAB يعد ظهور هالة حول المستعمرة دلالة على إنتاج العزلات للأنزيم، فقد أعطت العزلة $A.dianthi_2$ أعلى نصف قطر هالة تحلل (8.50) ملم، تلتها العزلة $A.dianthi_3$ (8) ملم،، وكانت العزلة التابعة للنوع *A.longipies* أيضاً كفوءة في إنتاج الأنزيم إذ وصل نصف قطر هالة التحلل فيها إلى (8) ملم، أما العزلات التابعة للنوع *A.alternata* فقد تدرجت في أنصاف أقطار هالات التحلل وكان أعلى نصف قطر هالة تحلل هو للعزلة $A.alternata_2$ إذا وصل (6.25) ملم، وكانت العزلة$A.dianthi_{4b}$ أقل كفاءة في إنتاج الأنزيم حيث وصل نصف قطر هالة التحلل إلى (2) ملم. وبذلك تبين أن جميع العزلات كانت مُنتجة للأنزيم كما موضح في الجدول(4) وهذا يتفق مع ماتوصل إليه (Saleem وأخرون، 2012) إلى إنتاج جميع عزلات الفطر *Alternaria* لأنزيم البكتينيز وزيادة إنتاج الأنزيم مع زيادة فترة التحضين، وأن ظهور الهالة حول المستعمرة هي نتيجة تحطم البكتين وإنتاج الأنزيم كما موضح في الصورة(ب) (Kitajima وأخرون، 1975).

وللكشف عن أنزيم السليوليز كما أستخدم كاشف يود–حامض الهيدروكلوريك حيث أن ظهور هالة شفافة حول المستعمرة يدل على إنتاج الفطر للأنزيم نتيجة تحول الكاربوهيدرات إلى سكريات بسيطة، وقد تميزت العزلة $A.dianthi_2$ بأعلى إنتاجية للأنزيم إذ بلغ نصف قطر هالة التحلل (9) ملم بينما كان نصف قطر هالة التحلل للعزلة$A.alternata_3$ (7) ملم تلتها العزلات الفطرية الأخرى بفروقات معنوية ووصل نصف قطر هالة التحلل للعزلة *A.longpies* (5.75) ملم وكان أقل نصف قطر هالة تحلل هو للعزلة *A.radicine* (2.50) ملم كما في الصورة (أ). وبذلك تبين أن جميع العزلات كانت منتجة لكلا الأنزيمين وبدرجات متفاوتة وإن فعالية إنتاج هذه الأنزيمات تزداد مع زيادة فترة التحضين كما في الصورة(1). حيث تعد الأنزيمات الخارج خلوية التي تنتجها الفطريات المرضية ذات علاقة بالنمو وخصوصاً عند غزوها للعائل وعليه فإن مقارنة الفطريات المرضة يعتمد على نوع

الأنزيم المفرز ومدى الضرر الذي يسببه العائل النباتي (1976 Bodenmann; ،Bateman وأخرون، 1985) . كما أن للفطريات الممرضة قدرة متباينة في إنتاج هذه الانزيمات حتى بين العزلات العائدة لنفس النوع الفطري (Fergus،Trigianoو 1979) . وإن دراسة مقدرة الفطر على إنتاج هذه الأنزيمات من الممكن أن يكون له علاقة بتوضيح ميكانيكية الإصابة. إن لبعض الفطريات قدرة عالية على إنتاج العديد من السُموم الفطرية والأنزيمات المُحللة التي تتمكن من تحليل جدران الخلايا في الأنسجة النباتية وبالتالي فإن هذه الإفرازات تؤدي إلى زيادة إفراز أكثر من مُركب في آن واحد من قبل الفطر مثل إفراز أنزيمي البكتينيز والسليوليز (صالح واخرون، 2016) . بالإضافة إلى تأثير أنزيمات Pectinase وPolygalacturanase والتي تكون مسؤولة عن ذبول الخلايا وموت الأنسجة النباتية (Fernando وأخرون، 2001) .

الجدول(4) يوضح متوسطات أنصاف اقطار هالات التحلل لأنزيمي البكتينيز والسليوليز بالملم بعد التنمية على وسط PSA لمدة 7 ايام من التحضين عند الدرجة الحرارية (25±2) °م.

العزلة	أنزيم البكتينيز		أنزيم السليوليز	
	نصف قطر هالة التحلل/ملم	كفاءة الفطر على الإنتاج	نصف قطر هالة التحلل/ملم	كفاءة الفطر على الإنتاج
A.dianthi$_2$	8.50* أ	+++	9 أ	+++
A.longipies	8 أ ب	+++	5.75 أ ب ج د هـ	++
A.dianthi$_3$	8 أ ب	+++	7 أ ب ج	++
A.dianthi$_1$	6.75 أ ب ج	++	7.25 أ ب	++
A.alternata$_2$	6.25 أ ب ج د	++	4 ب ج د هـ	++

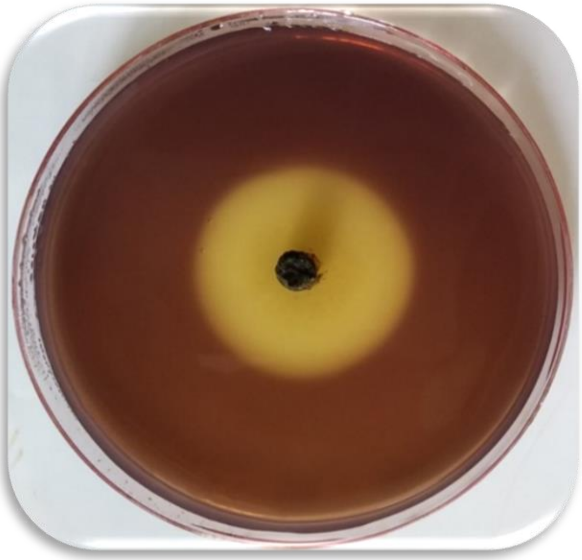
A.dianthi$_7$	6.125 أ ب ج د	++	6.25 أ ب ج د	++
A.alternatia$_5$	5.50 ب ج د	++	6 أ ب ج د	++
A.alternata$_4$	5.25 ج د هـ	++	6.25 أ ب ج د	++
A.dianthi$_{6c}$	5.25 ج د هـ	++	3.75 ج د هـ	+
A.alternata$_3$	4.75 ج د هـ	++	7 أ ب ج	++
A.dianthi$_{6a}$	4.50 ج د هـ و	++	3 د هـ	+
A.dianthi$_5$	4 ج د هـ و	++	3.75 ج د هـ	+
A.dianthi$_{4a}$	4 ج د هـ و	++	3.5 د هـ	+
A.dianthi$_{4c}$	4 ج د هـ و	++	4.50 ب ج د هـ	++
A.alternata$_1$	3.75 د هـ و	+	6 أ ب ج د	++
A.radicine	3.5 د هـ و	+	2.50 هـ	+
A.dianthi$_{6b}$	2.5 هـ و	+	4 ب ج د هـ	++
A.dianthi$_{4b}$	2 و	+	5.25 ب ج د هـ	++

*الأرقام في الجدول ناتجة عن أخذ المتوسط لثلاث مكررات.

**الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تشير إلى وجود فروقات معنوية ضمن إختبار دنكن متعدد المدى.

ملحق الجدول(4) يوضح كفاءة عزلات أنواع الفطر *Alternaria.spp* على إنتاج أنزيمي البكتينيز والسليوليز.

-	يشير إلى أن الفطر غير منتج للأنزيم
+	يمثل كفاءة الفطر على إنتاج الأنزيم وتكوين هالة تحلل حول المستعمرة الفطرية بنصف قطر (1-3) ملم.
++	يمثل كفاءة الفطر على إنتاج الأنزيم وتكوين هالة تحلل حول المستعمرة الفطرية بنصف قطر (4-7) ملم.
+++	يمثل كفاءة الفطر على إنتاج الأنزيم وتكوين هالة تحلل حول المستعمرة الفطرية بنصف قطر (8-11) ملم.
++++	يمثل كفاءة الفطر على إنتاج الأنزيم وتكوين هالة تحلل حول المستعمرة الفطرية بنصف قطر (12) ملم.


أ- انزيم السليوليز

ب- انزيم البكتنيز

الصورة (2) توضح كفاءة الفطر *Alternaria* لإفراز أنزيمي البكتينيز والسليوليز في الأوساط الصلبة.

المصادر

الطائي، ورقاء سعيد قاسم (2010) . فقدان الميلانين واثره على الامراضية في الفطر *A.alternata* مجلة علوم الرافدين، 21(3):103 -120.

الطائي، ورقاء سعيد قاسم (2007).دراسة تصنيفية لأنواع جنس *Alternaria* المسبب لمرض تبقع الأوراق وتهيئة موديل للسيطرة البيولوجية في مدينة الموصل، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، 153 صفحة.

Agrios, G.N. (1997)Plant pathology. 4th ed. Academic press. Pp.635.

Agrios, G.N.(2005). Plant Pathology, 5th ed, Elsevier Academic Press, San Francisco. 922p.

Bajpai VK and Kang SC.(2012) In Vitro and In Vivo inhibition of plant patHoganic fungi by essential oil and extracts of Magnolia liliflora. *Desr J Agr Sci Tech* ; 14: 845-856.

Bateman, D.F.(1976). Plant Cell Wall Hydrolysis by pathogens. In: Biochemmical Aspects of Plant-Parasite Relationships. Annual Proceedings of the phytochemistry Society. *Academic Press. London.pp*.97-103.

Bodenmann, J.; Heiniger, U. and Hohl, H.R.(1985). Extraccellular enzmes of phytopathoraendo-cellulase, β-glucosidases, and 1,3-β-glucanases. *Can. J. Microbiol*.,31(1):75-82.

Chang HT, Cheng YH, Wu CL, Chang ST, Chang TT and Su YC.(2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from Calocedrus macrolepis var. formosana, florin leaf against plant patHoganic fungi. *Bioresource Technol*, 99: 6266-6270.

Chase, A. R. (2005) pest and disease. Advanced Treatment of Alternaria.

Chase, A.R.(1998). Alternaria diseases of ornamentals. Western Connection Turf and Ornamentals Newsletter. 3(1): 1-4.

Chethana, B.S., Girija Ganeshan, Archana S. Rao and Bellishree, K.(2018). Morphological and Molecular Characterization of Alternaria Isolates Causing Purple Blotch Disease of

Garrido C, Cantoral JM, Carbu M, Gonzalez-Rodriguez EV and FernandezAcero FJ (2010) New proteomic approaches to plant pathogenic fungi. Curr Proteomics 7: 306-315.

Hof H.(2001).Guest Commentary: Critical Annotations to the use of azole antifungals for plant protection. Antimicrob Agents Chemother, 45(11); 2987-2990.

Jadhav.SB and Wadikar.M.S.,(2018). Effect of different physical factors on growth of Alternaria isolates from Capsicum annum L. *International Journal of Botany Studies*,Vol.; 1,Page No.137-139.

Jiménez-Reyes.M.F., Carrasco.H., Olea. A.,V. Silva-Moreno. And E., Corresp.(2018). Natural compounds: A sustainable alternative for controlling phytopathogens Peerj Preprints https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26664v1.

Kitajima K., Hanking, L. and Anagnostakis, S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67:397-501.

Onion.*Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*.7(4):3478-3493. ISSN:2319-7706.

Ellis,MB.,(1971).Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey,UK.608pp. England.

Fernandez-Acero FJ, Carbu M, Garrido C, Vallejo I and Cantoral JM (2007) Proteomic advances in phytopathogenic fungi. Curr Proteomics 4: 79-88.

Fernando THPS, Jayasinghe CK and Wijesundera RLC (2001). Cell wall degrading enzyme secretion by *Colletotrichum acutatum*, the causative fungus of secondary leaf fall of Hevea brasiliensis (rubber). Mycolology Research 105: 195-201.

Ferron, P.(1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi, anti – inflammatory activity. Rev. Entomol., 23: 409-42.

Garibaldi, A., G. Gilardi and M.L. Gullino, (2007). First report of Alternaria leaf spot on Camellia in Italy. Plant Disease, 91(3): 324.

Kluepfel D (1988) Screening of prokaryotes for cellulose-and hemicellulosedegrading enzymes. In: Wood WA, Kellogg ST (eds) Methods in enzymology, vol 160. Elsevier, Amsterdam, pp 180–186.

Korres AMN, Buss DS, Ventura JA, and Fernandes PMB.(2011) Candida krusei and Kloeckera apis inhibit the causal agent of pineapple fusariosis, Fusarium guttiforme. *Fungal Biology* ,115: 1251-1258.

Mamgain.A., Roychowdhury.R., and Tah.J.,(2013). Alternaria pathogenicity and its strategic controls.*Research Journal of Biology Vol.1: 01-09.*

Marin, J.E. and Fernandez, H.S.,(2006). First Report of Alternaria brown spot of Citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. *Plant Disease*, 90: 686.

Martin, J.E. and Fernandez, H.S.,(2006). First Report of Alternaria brown spot of Citrus caused by *Alternaria alternata* in Peru. *Plant Disease*, 90: 686.

Meddeb-Mouelhi F, Moisan JK, and Beauregard M (2014) A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. *Enzyme Microb Technol* 66:16–19.

Meena, M., Prasad, V., and Upadhyay, R. S. (2017a). Evaluation of biochemical changes in leaves of tomato infected with *Alternaria alternata* and its metabolites. *Vegetos* 30:2.

Mirkova E, Konstantinova P (2003) First report of Alternaria leaf spot on gerbera (Gerbera jamesonii H. Bolux ex J. D. Hook) in Bulgaria. *J Phytopathol* 151:323–328.

Mishra,P.K., and Thawani,V.,(2016). Characterization of *Alternaria alternata* Isolated from *Calotropis gigantean* Plant Leaf. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 5((10): 459-466.

Naik MK, Prasad Y, Bhat KV, and Rani DGS.(2010a).Morphological, physiological, pathoganic and molecular variability among isolates of *Alternaria solani* from tomato. *Indian Phytopathology*. 63(2):168 -173.

OsonoT.(2014). Diversity and ecology of endophytic and epiphytic fungi of tree leaves in Japan: Areview.In :

Sporulation of Alternaria alternate and Sclerotium rolfsii Causing Bud Rot and Collar Rot in Marigold. *Trends in Biosciences* 8(24), *Print : ISSN* 0974-8431, 6785-6787.

Saleem.A., El-Said.A., Maghraby.T.A., Hussein. M.A., (2012). Pathogenicity and Pectinase Activity of Some Facultative Mycoparasites Isolated from Vicia faba Diseased Leaves in Relation to Photosynthetic Pigments of Plant. *J.Plant Pathol Microb* ,3:6.

Sibounnavong, P.; Kalaw, S.P.; Divina, C.C. and Soytong, K.(2009b). Mycelial growth and sporulation of *Emericella nidulans*, a new fungal antagonist on two culture media. *Journal of Agriculture Technology* 5(2): 317-324.

Simb A. (2009).The role of pectinase enzyme in the development of soft rot Caused by Pseudomonas fluorecens in the purple variety of on ions (Allium Cepa).*African Journal of Microbiology Researeh*. 3(4):163-167.

Sunitha, V.H. Nirmala,D. and Srinivas. C.,(2013)Extracellular Enzymatic Ve Verma, Ac Gange (Eds), Advances in Endophytic Research. New Delhi, India, *Springer* India,3-26.

Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997). Fungi and Food Spoilage, 2nd ed.Gaithersburg, Maryland. 593.

Pitt, J.I. and Hocking, A.D.(2009). Fungi and food spoilage Third ed. Springscience Business Media, LLC,New York USA. 519pp.

Pryor, B.M. and Gilbertson, R.L.(2000). Molecular phylogenetic relationships among Alternaria species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mtSSU rDNA sequences. *Mycol. Res*.,104(11): 1312-1321.

Reda A.,M. Hesham,A. Mahmoud and Z.Ebtsam.(2008).Production of bacterial pectinase(s) from agro-industrial wastes under solid state fermentation conditions.*Journal of Applied Sciences Research*, 4(12):1708-1721.

Rout.M.K., Mohanty.P., Dash.S.R., and Parida.D.(2015). Studies on Effect of pH, Temperature and Relative Humidity on Growth and

Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. *World Journal of Agricultural Science*. 9. 01-09.

Trigiano, R.N. and Fergus, C.L.(1979). Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. *Mycologia*.20:9088-917.

Vivek R. , Rajasekharan, M. Ravichandran,K. R. Sriganesh and Vaithees,V. (2010).Pectinase production from orange peel extraction and dried orange peel solid as substrates using Aspergillus niger .*International Journal of Biotechnology and Biochemistry*.6(3):445-453.

Wolf, F. A. and F. T. Wolf. (1947). The fungi Vol. I. John Wiley and Sons Inc., N. Y.

Yeoh, H.H.; Khew, E. and Lim, G. (1985). A simple method for screening cellulolytic fungi. *Mycologia*, 77: 161-163.