التحري عن سمية الأنواع التابعة للجنس *Alternaria* المعزولة من أوراق نباتات الزينة*

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

جامعة الموصل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

(قدم للنشر في ٢٠١٩/٥/٢٠ ، قبل للنشر في ٢٠١٩/٧/١٧)

ملخص البحث:

تم الحصول على (229)عزلة فطرية خلال العزل من اوراق نباتات الزينة وانتخبت الأنواع التابعة لجنس *Alternaria* لإجراء التجارب عليها . ولبيان التأثير السمي للراشح الفطري لبعض الأنواع المدروسة والتابعة للجنس *Alternaria* على نسبة انبات بذور الرشاد وبإستخدام راشح السم الفطري بتركيز (100,50)% وصلت نسبة إنبات البذور المعاملة براشح الفطر إلى صفر% لكلا التركيزين (100,50)% في العزلة $A.dianthi_3$ وبنسبة تثبيط 100% بينما كانت نسبة التثبيط للعزلة $A.alternata_4$ 96.43% عند التركيز 100% و 58.9% للتركيز 50%. كما تم دراسة النضح الالكتروليتي للأوراق النباتية وإستخدم نبات الأريس لإجراء التجربة وقياس النضح وكانت أعلى قيمة للنضح بعد 72 ساعة عندما كان تركيز الراشح 100% هي($9*10^{-6}$)سيمنز/ساعة بالمقارنة مع قيمة النضح للأوراق في المقارنة والمعاملة بالماء المقطر والتي بلغت ($1*10^{-6}$)سيمنز/ساعة. كذلك قدر محتوى الكلوروفيل للورقة النباتية لمعرفة تأثره بالراشح الفطري وقدرت نسبة كلوروفيل a,b والكلوروفيل الكلي وتم حسب النسبة المئوية للفقد إذ وصلت النسبة المئوية إلى 72% عندما كان تركيز الراشح 100% وكمية الكلوروفيل الكلي 5.865 ملغم/غرام وزن رطب ، بينما وصلت نسبة الفقد إلى 33.9% عند التركيز50% وكان تركيز الكلوروفيل الكلي 13.98 مقارنة بتركيز الكلوروفيل الكلي للمعاملة والذي وصل إلى 21.2 ملغم/غم وزن رطب.

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 fungal species were obtained and Alternaria species were selected for experimentation. To determine the toxic effect of some species of Alternaria on the percentage of germination of the seeds of Sativum lepidium, the fungal toxin at a concentration of (50,100)% was used. The germination percentage of seeds treated with fungal toxin was 0% for both concentrations (100,50)% for A.dianthi3 , as to mean 100% inhibition and A.alternata4 was 96.43% at 100% and 58.9% for 50% concentration. The electrolytic perfusion of plant leaves was studied, The highest yield value after 72 hours when the concentration of leachate was 100% was (9*10-6) Siemens/hr. compared with the value of the perfusion of leaves in comparison and treated with distilled water, It reached(1*10-6) Siemens/hour. The chlorophyll content of the plant leaf was estimated to be known toxic affected and estimate chlorophyll a, b ratio and total chlorophyll and percentage of loss, The percentage was 72% when the concentration of leachate was 100% and total chlorophyll was 5.865 mg/g wet weight; while the percentage of loss 33.95% and total chlorophyll 13.98 at concentration 50% compared to the total chlorophyll of the treatment 21.2 mg/g wet weight.

(*)مستل من رسالة ماجستير الباحث الاول.

المُقدمة Introduction

إن الفطريات المُسببة للأمراض النباتية هي 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). وتقوم بإستخدام إستراتيجيات متنوعة لإصابة وإستعمار النباتات وتكون تفاعل مُعقد بين الأنواع الفطرية ومضائفها(Idnurm و Howlett،2001 ;Tivoli وأخرون،2006).

وبالرغم من الأمراض التي يسببها هذا الجنس للعديد من نباتات الزينة، لكنها لم تُلقى إهتماماً خلال السنوات الأخيرة. كما أن الكثير من الدراسات القت الضوء عن تواجد السموم وتأثيرها على الخلية الحيوانية ولكن القليل منها كانت عن تواجد هذه المواد في الخلايا النباتية (Ismaiel و Papenbrick،2015). إن المميزتان الرئيسيتان لأنواع جنس *Alternaria* هي إنتاجها للسموم الفطرية المُتخصصة للعائل Host-specific toxin لدى الأنواع الممرضة وإنتاجها للميلانين Melanin خصوصاً في الابواغ (Thomma،2003). ويعتمد جنس *Alternaria* في إمراضيتهِ على مقاومة وحساسية المضيف وإنتاجهِ للسمُوم المُتخصصة وغير المُتخصصة للعائل (Meena وأخرون، 2017). فمثلا *Alternaria alternata* لوحدها تُعرف بقدرتها على إصابة أكثر من 100 نوع نباتي مسببة تبقع الأوراق وأمراضاً أخرى (Rotem ، 1994; Thomma، 2003). وإصاباتها للجهاز التنفسي للإنسان (Kurup وأخرون، 2000). وإنتاجها لأكثر من 60 نوع من المركبات الأيضية الثانوية (Saha وأخرون، 2012). إن إنتاج هذه الأنواع الفطرية لمختلف السموم النباتية phytotoxins والسموم الفطرية المتخصصة للعائل يمكن أن يُعتبر كمفاتيح لنجاح هذهِ المُمرضات (Nishimura وKohmoto، 1983). وتُماثل الفطريات المجاميع الأخرى المسببة للأمراض في النبات بإمتلاكها طرق متطورة للبقاء عند غياب المضيف السريع التأثُر وكذلك عند الظروف البيئية غير الملائمة فتتمكن من الإنتشار والإصابة والنمو والتكاثر ضمن وعلى النبات. وبين Chase (1998) أن أنواع جنس *Alternaria* تسبب أمراضاً لنباتات الزينة فهي تصيب أوراقها وأزهارها وعند حدوث الإصابات الشديدة تسبب تساقط الأوراق بسرعة.

المواد وطرائق العمل

جمع العيناتCollection 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، الكاردينيا، الاريس، التويا، الفوجيرا، الجربيرا، اليوغا الظلي، اللبلاب المتسلق، الهايدرا، الشيفليرية، الفكس ، رجل البطة، الدراسينا الخيطي، الاراليا). وحفظت في اكياس نايلون نظيفة ونقلت الى المختبر لإجراء الدراسة عليها .

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 لتجف ووزعت على الاطباق الحاوية على مستخلص البطاطا والسكروز والاكار 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* باستخدام المفاتيح التشخيصية الموصوفة من قبل(Ellis،1971،1976) وحفظت.

وسط تشابك دوكس Czapek's Dox Agar Medium (CDA)

يتكون هذا الوسط من نترات الصوديوم ($NaNo_3$) 3غم، فوسفات البوتاسيوم الثنائية (K_2Hpo_4) 1غم، كلوريد البوتاسيوم (KCl) 0.5غم، كبريتات الحديد ($FeSo_4$) 0.01غم، كبريتات المغنيسيوم المائية ($MgSo_4, 7H_2o$) 0.5غم، سكروز 30غم، اكار 15غم، اذيب الأكار في 500مل ماء مقطر، واذيبت بقية المكونات في 500مل ماء مقطر ثم مزج المحلولان السابقان الى ان اصبح الحجم لتر ضُبط الأُس الهيدروجيني للوسط عند 7.0ثم عُقم بإستخدام المؤصدة Autoclave ثم اضيف المضاد الحيوي Streptomycin

100ملغم/لتر (Sohail وأخرون،2007 ; Al-Shamary و Kadem،2012 ; Koley و Mahapatra،2015) .

دراسة سمية الفطر *Alternaria*

1- تحضير الراشح الفطري

أُختيرت 5 عزلات فطرية للحصول على راشح السم الفطري من مُستعمرات فطرية نقية فتية المعزولة من اوراق نباتات الزينة المُصابة، وذلك بتنمية الفطر على وسط جابكس دوكس السائل، بعد تحضير الوسط حسب ما ذكر سابقاً باستثناء عدم إضافة الأكار،قسم الوسط في 5فلاسكات سعة 250مل، وضع في كل فلاسك 20مل من الوسط، اخذ قرصين من المستعمرة الفطرية بقطر 5 ملم ولقحت جميع الفلاسكات وحضنت بدرجة حرارة(25±2)°م لمدة (21) يوم مع مراعاة رج الفلاسكات كل يومين (Kohmoto وأخرون،1979). بعد انتهاء فترة التحضين رشحت المزارع الفطرية باستخدام عدة طبقات من الشاش المعقم ثم باستخدام ورق ترشيح filter paper من نوع Whatman no.2 لازالة خيوط المايسيليوم ثم تم إجراء الطرد المركزي باستخدام جهاز Centerfuge وبسرعة 2500 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق. وبذلك تم الحصول على 250مل من الراشح لكل عزلة، حفظ الراشح بدرجة حرارة 4°م لاجراء التجارب عليه.

2- تأثير راشح السم الفطري على نسبة انبات البذور

استخدمت بذور الرشاد *Sativum Lepidium* لدراسة نسبة الانبات. عقمت البذور سطحيا باستخدام محلول هايبوكلورايت الصوديوم 1% لمدة 2 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر وجففت على اوراق الترشيح ، وزعت البذور على اطباق بتري حاوية على ورقة ترشيح وبواقع (15)بذرة لكل طبق وعُوملت بالراشح الفطري وذلك برش البذور بحوالي (2-3)مل من الراشح بتركيز (100 ,50)% وبمعدل ثلاث مكررات لكل معاملة بالإضافة الى طبق المقارنة المعامل بالماء المقطر. حضنت الاطباق لمدة 5 ايام بدرجة حرارة (25±2)°م.عند انتهاء فترة التحضين تم حساب عدد البذور النابتة في كل طبق وايجاد النسبة المئوية للإنبات (جلال الدين ومؤيد، 2007 ; الفضل وأخرون،2012) باستخدام المعادلة :-

النسبة المئوية للإنبات =عدد البذور النابتة /العدد الكلي للبذور المزروعة × 100

النسبة المئوية للتثبيط=عدد البذور النابتة في المقارنة – عدد البذور النابتة في المعاملة/عدد البذور النابتة في المقارنة × 100

3-تقدير النضح الالكتروليتي للأوراق

اختيرت احد الاوراق النباتية المستخدمة في التجارب السابقة لدراسة النضح الالكتروليتي عليها ،عقمت الورقة النباتية باستخدام محلول هايبوكلورايت الصوديوم 1% لمدة 2 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر وجففت على ورقة ترشيح وقطعت الى اقراص باستخدامCorkborer، وضع 2مل من الراشح بتركيز (100, 50)% داخل أنابيب إختبار سعة 10مل مع إضافة3 قطع من الورقة النباتية إلى كل تركيز بالإضافة إلى انبوب المقارنة الحاوي على الماء المقطر وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة، حضنت الأنابيب عند درجة (25±2)°م مع مراعاة رج الأنابيب بين فترة وآخرى. وتم قراءة النتائج خلال الفترات(24 ، 48 ، 72) ساعة بإستخدام جهاز قياس التوصيل الكهربائي Conductivity meter لغرض قياس النضح الألكتروليتي (Kohmoto وأخرون،1979) .

4- إختبار تحلل الكلوروفيل

أُستخدم المذيب العضوي الإيثانول بتركيز 100% (Rowan،1989) وذلك بوضع (2-3)مل منه داخل أنابيب إختبار Plane tube سعة 10مل ثم أُضيفت 3 قطع من الأوراق النباتية المُعقمة والمُقطعة على شكل قرص بإستخدام ثاقبة الفلين إلى الأنابيب بالإضافة إلى إنبوب المقارنة الحاوي على الماء المقطر وبواقع ثلاث مكررات وتركت لمدة 72 ساعة. تم قياس تحلل الكلوروفيل بإستخدام جهاز Spectrophotometer عند الطولين الموجيين (649-665) نانوميتر وحساب كمية الكلوروفيل أ ،ب والكلوروفيل الكلي بالاعتماد على المعادلة التالية حسب (Rowan، 1989) :-

تركيز كلوروفيل أ ملغم/مل= أ(665) نانوميتر× 13.7 – أ (649) نانوميتر×5.76 نسبة خطأ 0.1486

تركيز كلوروفيل ب ملغم/مل= ب(649) نانوميتر× 25.8– ب (665) نانوميتر× 7.6 نسبة خطأ 0.2690

ثم تم حساب الكلوروفيل الكلي= كلوروفيل أ + كلوروفيل ب

ويتم القياس عند الطول الموجي 665 أ والذي يعرف بأنهُ ذروة الكلوروفيل النقي الذي يظهر عند الطول الموجي 665 نانوميتر، بينما (25.8) هو المعامل الخطي عند مدى التراكيز المتحققة للكلوروفيل حيث أن أ هو الامتصاصية عند الطول الموجي المشار اليه كما تجرى القياسات عند مُنتصف النهار للتقليل من تأثير الكثافة الضوئية على حركة البلاستيدات (Kitajima

و Hogan،2003 ; Darmawan و Abasaeed ،2017).

النتائج والمناقشة

تقدير سمية العزلات الفطرية العائدةللجنس *Alternaria*

تم خلال العزل للفطريات من أوراق نباتات الزينة الحصول على (229) عزلة فطرية لأنواع تعود لجنس *Alternaria* ، ومن المعروف أن هذا الجنس الفطري يسبب أمراض لنباتات الزينة وفي حالات الإصابة الشديدة قد يسبب سقوط أوراقها . وبذلك تم الحصول على أربع أنواع فطرية تابعة لهذا الجنس وهي *A.dianthi,A.alternata,A.longipies,A.radic ine* وتفاوتت في نسبة ترددها . بالإضافة إلى ظهور انواع فطرية أخرى مثل *Ulocladium.sp* , *Cladiosporum.sp* . وقد أختيرت عدد من العزلات لإجراء التجارب عليها .

1- تأثير الراشح الفطري على نسبة إنبات البذور

تُعرف السُموم كعامل مهم ومحدد للإمراضية في أجناس مُختلفة، تكون سموم *Alternaria* متخصصة للعائل Host-specific toxins وتلعب دور مهم في التسبب بالأمراض ويمكن أن تكون إختيارية وإنتقائية على المستويات الخلوية لمقاومة المرض. تم من خلال التجربة إستخدام بذور نبات الرشاد لدراسة نسبة الإنبات ولمعرفة مدى تأثرها براشح السم الفطري التابع لعزلات الفطر *Alternaria*، وقد وصلت النسبة المئوية للإنبات في المقارنة إلى (89.85) % وهي تُمثل أعلى نسبة إنبات بالمقارنة مع نسبة إنبات البذور المُعاملة بالراشح الفطري. تميزت العزلة الفطرية $A.dianthi_3$ بوصول نسبة التثبيط 100% عند كِلا التركيزين ونسبة مئوية للإنبات إلى صفر%. وبصورة عامة تراوحت النسبة المئوية لإنبات البذور عند تركيز الراشح 100% بين (0-43.33) % وتدرجت بقيت النسب من (96.43) % وصولاً لأقل نسبة مئوية للتثبيط وهي (78)%. أما عند تركيز الراشح 50% تراوحت النسبة المئوية للإنبات ما بين (0-40) % وتدرجت النسبة المئوية للتثبيط من (70.8)% للعزلة $A.alternata_1$ بينما كانت أقل نسبة مئوية للتثبيط هي (51.9) % كما في الجدول(1). إن جميع عزلات الفطر *Alternaria* كانت ذات تأثير على نسبة إنبات البذور وهذا يتطابق مع توصل إليه(جفات واخرون، 2015). حيث تفاوتت نسبة إنبات البذور المُعاملة بالراشح بإختلاف التراكيز المُستخدمة وقد يرجع السبب في ذلك لتركيز ونوع المادة السامة الموجودة في الراشح بالإضافة إلى أن هذه السُموم الفطرية تؤثر بالدرجة الرئيسية

على نوعية البذور، نمو الجذر والقلنسوة Cleoptile والإنبات (Jens وأخرون، 2007; IsmaielوPapenbrock، 2015) .

أو قد يعود السبب في فشل انبات البذور إلى إفراز الأنزيمات المحللة للسليوليز والبكتينيز من قبل الفطر وبالتالي افراز المادة الايضية المسببة فشل إنبات البذور حيث أن نسبة إصابة البذور بالفطريات المختلفة تتباين بسبب اختلاف افراز المواد السامة والانزيمات المحللة للبكتين من قبل الفطريات وخصوصاً انزيم Polygalacturonase (جبر والربيعي، 2008: عبدو وأخرون، 2012;جفات وأخرون، 2015) . أو تكون أنزيمات أو تأثير الراشح على هرمونات الجبرلين، السايتوكاينين والاوكسين أو نتيجة السمية العالية للراشح (Omar وأخرون، 2009; Khedri وأخرون، 2014) .

الجدول(1) يوضح متوسط النسبة المئوية للإنبات والتثبيط لبذور نبات الرشاد المعاملة براشح الفطر *Alternaria* بعد 5 أيام من التحضين.

العزلات	تركيز 50%		تركيز 100%	
	النسبة المئوية للإنبات	النسبة المئوية للتثبيط	النسبة المئوية للإنبات	النسبة المئوية للتثبيط
Control	*89.85 أ	0 و	89.85 أ	0 و
A.dianthi$_1$	43.33 ب	51.9 هـ	16.5 د هـ و	81.55 ب ج
A.alternata$_4$	36.5 ب ج	58.9 د هـ	6.6 هـ و	96.43 أ ب
A.dianthi$_5$	29.85 ب ج د	66.6 ج د هـ	19.8 ج د هـ	78 ج
A.alternata$_1$	26.5 ب ج د	70.8 ج د	6.6 هـ و	96.43 أ ب
A.dianthi$_3$	0 و	100 أ	0 و	100 أ

*الأرقام في الجدول ناتجة عن أخذ المتوسط لثلاث مكررات.

**الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فروقات معنوية ضمن إختبار دنكن متعدد المدى.

control **%50** **%100**

Control البذور النابتة عند تركيز50% راشح البذور النابتة عند تركيز100% راشح

الشكل(1) يوضح نسبة إنبات بذور الرشاد *Sativum lepidium* بعد 5 أيام من التحضين والمعاملة بالراشح الفطري.

2-تقدير النضح الألكتروليتي

تم من خلال التجربة إستخدام الراشح الفطري للنوع *A.Alternata* و*A.dianthi* وبتركيز (100,50)% وبيان تأثيره على النفاذية في الورقة النباتية لنباتات الزينة، أستخدمت ورقة نباتية تابعة لنبات الأريس وتم قياس النضح خلال فترات (24 ,48 ,72) ساعة. وكانت النتائج كما موضح في الجدول ادناه حيث وصلت قيمة النضح بعد 24 ساعة ($4*10^{-6}$) سيمنز في العزلة $A.alternata_1$ و($6*10^{-6}$) سيمنز بعد 48ساعة و ($6.5*10^{-6}$) سيمنز بعد 72ساعة لنفس العزلة وهي تمثل أعلى قيمة للنضح عند تركيز 50%. أما عند التركيز 100% وصلت أعلى قيمة للنضح بعد 24ساعة إلى ($6.75*10^{-6}$) سيمنز للعزلة $A.dianthi_5$، وإلى ($8*10^{-6}$) سيمنز للعزلة $A.alternata_4$ بعد 48ساعة و ($9*10^{-6}$) سيمنز بعد 72ساعة لنفس العزلة، إي إرتفاع قيمة النضح مع زيادة الفترة الزمنية، بالمقارنة مع نسبة النضح في المقارنة التي عوملت بالماء المقطر والتي كانت ($1*10^{-6}$) سيمنز خلال جميع الفترات الزمنية. وبذلك تبين أن لراشح السم الفطري قدرة على إختراق أغشية الخلية مُؤدياً إلى تحطم هذه الأغشية وتغيير في

طبيعة نفاذيتها وزيادتها ووصوله إلى مواقع التأثير فيها مثل الزمنية (Abbas وأخرون، 1995) .

البلاستيدات والمايتوكوندريا وأن مقدار النضح يزداد بزيادة الفترة

الجدول(2) يوضح تأثير راشح عزلات الفطر *A.alternata* و *A.dianthi* على مقدار النضح الألكتروليتي لأوراق نبات الأريس مقدراً بالسيمنز/ساعة.

العزلات	مقدار النضح (سيمنز/ساعة) عند تركيز 50%			مقدار النضح (سيمنز/ساعة) عند تركيز 100%		
	24	48	72	24	48	72
المقارنة	1*10^{-6}ع	1*10^{-6}ع	1*10^{-6}ع			
A.dianthi$_5$	1ع	2.5 ي ش ع	6 ب ج د هـ وص	6.75أ ب ج د هـ و	7 أ ب ج د هـ	8 أ ب ج
A.alternata$_1$	4 وي س ش ص	6 ب ج د هـ وص	6.5 أ ب ج د هـ و	5 د هـ وس ش ص	6.5 أ ب ج د هـ و	7.5 أ ب ج د
A.dianthi$_3$	1.5 ي ع	2.5 ي ش ع	2.5 ي ش ع	3 ي س ش ع	4.5 هـ وس ش	5.5 ج د هـ وس ص
A.dianthi$_1$	3 ي س ش ع	3.5 ي س ش ص ع	5 د هـ وس ش ص	3 ي س ش ع	5.5 ج د هـ وس ص	8.5 أ ب
A.alternata$_4$	3.5 ي س ش ص ع	4 وي س ش ص	4 وي س ش ص	4 وي س ش ص	8 أ ب ج	9 أ

*الأرقام في الجدول ناتجة عن أخذ المتوسط لثلاث مكررات.

**الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فروقات معنوية ضمن إختبار دنكن متعدد المدى.

3-إختبار تحلل الكلوروفيل

لأن صبغات البناء الضوئي مسؤولة عن إمتصاص الطاقة الشمسية للقيام بعملية البناء الضوئي في النباتات المُضيفة وأن أي تغير في محتوى هذه الصبغات سوف ينعكس بصورة مباشرة على كفاءة البناء الضوئي وبالتالي على النمو وحاصل النباتات. تم من خلال التجربة إستخدام تراكيز مُختلفة من الراشح الفطري (100,50) % وقياس نسبة الكلوروفيل الكلي للورقة النباتية. إن تركيز الكلوروفيل يزداد تدريجياً مع زيادة الوقت حيث وصلت نسبة الكلوروفيل الكلي في المقارنة إلى 21.2 (ملغم/غرام وزن رطب) بعد 72 ساعة، أما بالنسبة للأوراق النباتية المعاملة بالراشح الفطري تراوحت نسبة الكلوروفيل الكلي عند تركيز الراشح 50% بين 13.98 (ملغم/غرام وزن رطب) للعزلة*A.dianthi*$_3$ و16.8 (ملغم/غرام وزن رطب) للعزلة *A.dianthi*$_1$بينما كانت نسبة الكلوروفيل عند تركيز الراشح 100% بين 5.865 (ملغم/غرام وزن رطب) للعزلة *A.alternata*$_4$ و10.125 (ملغم/غرام وزن رطب) للعزلة *A.alternata*$_1$. كما تباينت النسبة المئوية لفقد الكلوروفيل تبعاً لتركيز الراشح حيث كانت أعلى نسبة فقد للكوروفيل هي 72% للعزلة *A.alternata*$_4$ عند تركيز الراشح 100% بينما كانت أعلى نسبة فقد عند التركيز 50% هي 33.9%. وبذلك تبين دور السم الفطري في إحداث نقص في نسبة الكلوروفيل الكلي وزيادة نسبة فقدانه مع زيادة تركيز الراشح. عادة نسبة كلوروفيل أ هي أعلى من كلوروفيل ب وذلك بسبب إختلاف أدوارهما حيث أن كلوروفيل أ ينتشر أكثر من كلوروفيل ب خلال عملية البناء الضوئي (Shibghatallah وأخرون، 2013) . إن صبغات البناء الضوئي المتمثلة بكلوروفيل أ، ب والكاروتينات تقل عند الإصابة بالفطريات النباتية وإن تركيز هذه الصبغات النباتية تتأثر بشكل سلبي إعتماداً على درجة المرض (Darmawan و Abasaeed، 2017) . حيث أن السُموم الفطرية تعمل على تحطيم البلاستيدات وإنخفاض نسبة الكلوروفيل مؤدية إلى شحوب الأوراق وإصفرارها وتساقطها (Abbas وأخرون، 1995) . كما بينت التقارير أن نسبة الكلوروفيل تتناقص نسبة خلال شيخوخة الورقة (Watts وEley، 1981 ; Castro وSanchez-Azofeifa، 2008) . كما إن إنتقال الضوء خلال الورقة النباتية يتأثر بالتوزيع المكاني وتركيز الصبغات في الأوراق حيث أن التوزيع الغير الموحد أي تكتل أو ثقل جزيئة الكلوروفيل مُسبباً زيادة النقل للضوء عند التراكيز العالية للكلوروفيل ويُقلل من إنتقال الضوء عند التراكيز الواطئة. كما يتأثر

توزيع الكلوروفيل ضمن الورقة بالتنظيم البنوي للكرانا ضمن البلاستيدات الخضراء وللبلاستيدة ضمن الخلية وللخلية ضمن طبقات النسيج (Fukshanky وأخرون،1993). إن التغيرات البيئية تؤثر على القياسات حيث أن التغير في بيئة الورقة يغير من شكل الورقة وسمكها وتوزيع البلاستيدات الخضراء فيها كما أن التغيرات في مساحة خاصة في الورقة تحدث عادةً نتيجة درجة الحرارة أو الجهد المائي وعادة يكون الضوء المبعثرعالي في الأوراق السميكة (Naus وأخرون، 2010) . كما إن وجود تباين في التقنيات التجريبية المستخدمة للإستخراج والقياس يؤدي إلى تغاير القياسات بين الدراسات لأن تركيز الكلوروفيل يكون ذو تباين مكاني كبير فمن المُهم قطع قرص الورقة النباتي من نفس المكان تماماً، وهذه الإجراءات لم يتم وصفها دائماً في طريقة التجربة. كما أن إلاختلافات في القياس والعينات أدى إلى تباين كبير بين الدراسات فالعديد من مذيبات الإستخلاص، معادلات طيفية، الأطوال الموجية والأدوات المتفاوتة الدقة تم إستخدامها لقياس الكلوروفيل (Parry وأخرون، 2014). وإن نسبة الإستخلاص تزداد بزيادة الكتلة الحيوية وزيادة الذوبان، كما أن زيادة درجة حرارة الإستخلاص تؤدي إلى زيادة الذوبانية (Frank وأخرون، 1999).

الجدول(3) يوضح تأثير الراشح الفطري على كمية كلوروفيل أ، ب والكلوروفيل الكلي (ملغم/غرام وزن رطب) والنسبة المئوية للفقد للأوراق المعاملة بالراشح الفطري عند التركيزين(50 ، 100) %.

العزلات	تركيز الراشح 50%				تركيز الراشح 100%			
	كمية كلوروفيل أ	كمية كلوروفيل ب	كمية الكلوروفيل الكلي	النسبة المئوية للفقدان%	كمية كلوروفيل أ	كمية كلوروفيل ب	كمية الكلوروفيل الكلي	النسبة المئوية للفقدان%
المقارنة	14.48* أ	6.67أ	21.2 أ	0 د				
A.dianthi$_1$	9.835 ب	7 أ	16.8 ب	20.5 ج	4.015 هـ	2.45 ب	6.465 د	69.5 أ
A.dianthi$_5$	9.6 ب	6.9 أ	16.5 ب	22.1 ج	4.905 هـ	3.03 ب	7.935 ج د	62.4 أ ب
A.alternata$_4$	9.38 ب	6.4 أ	15.78 ب	25.54 ج	3.865 هـ	2 ب	5.865 د	72 أ
A.alternata$_1$	8.935 ب ج	6.73 أ	15.67 ب	26.08 ج	6.13 د هـ	3.99 ب	10.125 ج	52 ب
A.dianthi$_3$	7.84 ب ج د	6.14 أ	13.98 ب	33.9 ج	6.4 ج د هـ	2.99 ب	9.395 ج	55.5 ب

*الأرقام في الجدول ناتجة عن أخذ المتوسط لثلاث مكررات.

**الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فروقات معنوية ضمن إختبار دنكن المتعدد المدى.

المصادر العربية

جبر، كامل سلمان. حميد عباس الربيعي.(2008) . تأثير الفطر *Rhizoctonia Solani* في إنبات بذور القطن ومكافحته باستعمال بعض المستخلصات النباتية. مجلة العلوم العراقية الزراعية -25(4)39 37.

جفات، مريم حسين و محمد، ان طه والجنابي، رجاء غازي.(2015) . مقارنة عزلات مختلفة للفطر *Alternaria alternate* في قدرتها الأمراضية وتشخيصها جزيئيا . مجلة كربلاء للعلوم الزراعية 2(3) .

جلال الدين، انفال مؤيد .(2007) . تأثير الراشح السمي للفطر *Stemphylium botryosum*في نمو بعض الفطريات المصاحبة للبذور وعلى انبات بذور بعض النباتات.مجلة علوم الرافدين.18(2): -1. 9

عبدو، رانيا حاج، بسام بياعة وعباس عباس.(2012) . تحديد المجموعات التشابكية لمجتمع الفطر على البطاطا/البطاطس في سورية. مجلة وقاية النبات العربية 30 : 1-10. عبدو، رانيا حاج، بسام بياعة وعباس عباس.(2012) . تحديد المجموعات التشابكية لمجتمع الفطر على البطاطا/البطاطس في سورية. مجلة وقاية النبات العربية 30 : 1-10.

الفضل ،عبد المحسن و الحيدري، فراس هادي و وسن (2012) . تأثير رواشح بعض الفطريات المعزولة من مخلفات الرز على انبات حبوب الحنطة ونمو الفطرين *Fusarium graminearum* و *Rhizoctonia solan*i الممرضين وفطر المقاومة الحيوية *Trichoderma harzianum* مختبريا . قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة الكوفة العراق.

المصادر الانكليزية

Abbas, H. K.; S. O. Duke and R.N. Paul.(1995). AAL-toxin A potent natural herbicide which disrupts sphingolipid Metabalism of plant pest. Sci. 43, 181-187.

Al-Shamary E.E., and Kadem.B.H., (2012). PRODUCTION OF PECTINASE FROM ASPERGILLUS NIGER BY USING SOME FRUIT PEELS. **Dept. of Food Sci. & Biotech* - Coll. Of Agri. Coll. Of Agri-Baghdad University.267-257:(1)4.

Castro K.L. and Sanchez-Azofeifa G.A. (2008) Changes in spectral properties, chlorophyll content and internal mesophyll structure of senescing populus balsamifera and populus tremuloides leaves. Sensors, 8, 51–69.

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

Darmawan.A, and Abasaeed.A.E, (2017).Extraction of chlorophyll from pandan leaves using ethanol and mass transfer. Riyadh 11421, Saudi Arabia (Received 3 December 2016, revised 20 March, accepted 22 March 2017).

Ellis MB.(1976). More Dematiaceou Hyphomycetes, Commonwealth Mycological Institute(C.M.I). Publication, Kew, Survey,UK.507 pp.England.

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

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

Frank,T.C.,Downey,J.R., and Gupta, S.K.(1999) *Chem. Eng*. *Prog*. 95; 41.

Research of Microbiology, 2(11):881-884.

Khedri, Z., A. Heydari and H. Azimi(2014)**.** Effects of damping-off disease caused by Rhizoctonia solani on growth characteristics of cotton seedlings. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*.vol; 7 (11) / 786-790.

Kitajima K. and Hogan K.P. (2003) Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. Plant, *Cell and Environment* 26, 857–865.

Kohomoto, K; R.P. sheffer and J.O. whiteside.(1979). Host selective toxins from *Alternaria Citri* phytopathol. 69:661 – 671.

Koley S., and Mahapatra, S.S.,(2015).Evaluation of culture Media for growth characteristics of *Alternaria solania* ,Causing Early Blight of Tomato.*J Plant Pathol*. *Microbiol*.S1:005. Orissa University of Agriculture and Technology.756111, India.

Fukshansky L., Vonremisowsky A.M., McClendon J., Ritterbusch A., Richter T. and Mohr H. (1993) Absorption-spectra of leaves corrected for scattering and distributional error–a radiative-transfer and absorption statistics treatment. *Photochemistry and Photobiology* 57, 538–555. Garrido C, Cantoral JM, Carbu M, Gonzalez-Rodriguez EV,

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

Idnurm A, Howlett BJ (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol. Plant Pathol* 2: 241-255.

Ismaiel,A. A. and Papenbrock.J,(2015). Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Germany.Agriculture*, 5, 492-537.

Jens, C. ; Frisvad , J.S. and Samson , R.A.(2007) Fumonisin B2 production by Aspergillus niger.

Nishimura, S., and Kohmoto, K. (1983). Host-specific toxins and chemical structures from Alternaria species. Annu. *Rev. Phytopathol*. 21, 87–116.

Omar M.R., Hussein,E.M., and Kasem,K.H.K.,(2009). Pathoganicity and Protein Electrophoresis of Different Cotton *Rhizoctonia solani* Isolates. Egypt. *J.Phytopathol*. 37: 21-33.

Parry.J., blonquist.M.Jr., and Bugbee. B., (2014). Original Article In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship Christopher. *Plant, Cell and Environment.*37, 2508–2520.

Rotem, J.(1994) The genus *Alternaria*. Biology, epidemiology and Pathoganicity APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Rowan. KS,(1989) Photosynthetic pigments of algae. Cambridge University Press, Cambridge.

Kurup, V.P. Shen, H.-D. and Banerjee, B.(2000). Respiratory fungal allergy Microbes and Infection, pp.(2); 1101-1110.

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.

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.

Naus J., Prokopova J., Rebicek J. and Spundova M. (2010) Spad chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynthesis Research* 105, 265–271.

Saha, D., Fetzner, R., Burkhardt, B., Podlech, J., Metzler, M., Dang, H., Lawrence, C. and Fischer, R. (2012). Identification of a polyketide synthase required for alternariol (AOH) and alternariol-9-methyl ether (AME) formation in *Alternaria alternata*. *PLoS One* 7:e40564.

Shibghatallah.M.A.H ,Suhandono.S, Kesuma.T,(2013) Measuring Leaf Chlorophyll Concentration from Its Color: A Way in Monitoring Environment Change to Plantations. School of Life Sciences and Technology, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia 3 i-Sprint Innovations, Blk 750A Chai Chee Road, #01-01 Technopark @ Chai Chee, Singapore 469001, Singapore *viridi@cphys.fi.itb.ac.id.2013.

Sohail.M, Ishrat Rani, Shaista Akhund and Hidayatullah Abro.(2007).Abrus sucrose agar anew medium for the growth of fungi. Institute of Botany, University of Sindh Jamshoro, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 39(5).

Thomma, B. P. (2003). *Alternaria spp*.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol*. 4, 225–236.

Tivoli B, Baranger A, Avila CM, Banniza S, Barbetti M,.(2006) Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147: 223-253.

Watts, D.F. and Eley J.H. (1981) Changes in the chlorophyll a-b ratio during autumn coloration of populus-sargentii. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 108, 379–382.