دور بيكاربونات الصوديوم وبكتريا *Bacillus polymyx* والمعاملة الحرارية والتداخل فيما بينهم في تثبيط نمو الفطر *Aspergillus parasiticus* المرافق لثمار التفاح المستورد والمحلي المشخص جزئيا والمنتج لسم افلاتوكسين B1

رجاء غازي الجنابي
كلية الزراعة/جامعة كربلاء
Samiabd2007@yahoo.com

سامي عبد الرضا الجميلي
كلية العلوم الطبية التطبيقية/ جامعة كربلاء

ذوالفقار عبد الستار جبار
كلية الزراعة/جامعة كربلاء
Zulfiqear@yahoo.com

الملخص

أجريت هذه الدراسة لعزل وتشخيص الفطر *Aspergillus parasiticus* المرافق لثمار التفاح المستوردة والمحلية باستخدام الطرق التقليدية وقد أجري تشخيص تأكيدي لهذا الفطر باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain Reaction و اختبار فعالية عدد من برامج المكافحة المتكاملة في السيطرة عليه.بين الكشف الكيميائي باستخدام تقنية ألواح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatography أنَّ سبع عزلات من الفطر *A.parasiticus*من مجموعة 12 عزلة (58%) منتجة لسم أفلا توكسينB1.كما اظهرت نتائج العزل وجود عزلتين من البكتريا لها القدرة على التضاد مع الفطر *A.parasiticus* وأعطت عزلة البكتريا(Bp4) *Bacillus polymyxa* المعزولة من ثمار التفاح اعلى نسبة تثبيط للفطر اذ بلغت 80%،وأظهرت النتائج ايضا ان برنامج المكافحة المتكاملة والمكون من العزلة **Bp4** مع مادة بيكاربونات الصوديوم هو الافضل من حيث القدرة على مكافحة التعفن الناتج عن الفطر *A.parasiticus* ، اذ بلغت النسبة المئوية للإصابة الفطر *A.parasiticus* من 8.53%وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة (ثمار معاملة بلقاح *A.parasiticus*فقط)والبالغة 58.33%في حين بلغت نسبة الإصابة للثمار المجرحة والمطبق عليها نفس البرنامج 75% في الوقت الذي بلغت نسبة الإصابة في معاملة المقارنة 91.66.

الكلمات الدالة: ثمار التفاح،المكافحة المتكاملة،الفطريات، *Aspergillus parasiticus*،*Bacillus polymyxa*.

Role of Sodium bicarbonate, *Bacillus polymyx* beacteria and thermal pressure with the Interaction of heas factors in inhibition of molecular identified *Aspergillus parasiticus* that produced the poison aflatoxin B1 and Combined local and imported apple fruits

Abstract

This study was conducted to isolate and diagnose the fungus *Aspergillus parasiticus* Combined local and imported apple fruits using traditional methods have confirmatory diagnosis of this fungus was conducted using the Polymerase Chain Reaction technique (PCR) and test the effectiveness of a number of integrated pest management programs to control it. chemical detection using thin layer chromatography plates Technology (TLC) showed that seven isolates of the fungus *A.parasiticus* from 12 isolation (58%) Would producing poison aflatoxin B1. Insulation results also showed the presence of two isolate of bacteria ,have the ability to contrast with fungus *A.parasiticus* and gave the isolation of bacteria Bp4*Bacillus polymyxa* isolated from apple fruits inhibition highest percentage inhibition of the fungus as reached at 80%, and the results also showed that the integrated pest management program, consisting of isolation Bp4 with substance sodium bicarbonate is the best in terms of the ability to fight against rot caused by the fungus *A.parasiticus*, as the percentage of infected fungus *A.parasiticus* of 8.53% which was significantly differente from the increase in the control treatment (fruits treatment vaccine *A.parasiticus* only), which was to 58.33%, while the infection rate of the injured fruits that applied on it the same program 75% at the time that infection rate in the treatment of comparison reaghed 91.66.

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث

المقدمة

تتعرض الثمار والخضار للتلوث بالسموم الفطرية في الحقل وأثناء النقل والخزن نتيجة إصابتها بالعديد من الفطريات اهمها *Aspergillus* و*Alternaria* و *Penicillium* و *Rhizopus*وغيرها (Collee واخرون،1996)وبالرغم من الجهود المبذولة سواء من قبل الباحثين في مختلف أنحاء العالم او المنظمات ذات العلاقة في التقليل من خطر السموم الفطرية وذلك من خلال وضع الخطط الفعالة للحد من تلوث الأغذية بها إلا أن اغلب هذه المحاولات بقيت في نطاق محدود ولم تعطِي حلول ناجعة لحل هذه المشكلة (Fazekas واخرون،2002). استخدمت عدة وسائل للحد من إصابة الثمار بالفطريات والتلوث بسمومها منها الطرق الفيزيائية والمتمثلة بمعاملة الثمار بالماء الحار والهواء الساخن أو استخدام الأشعة، كما استخدمت المكافحة الإحيائية من خلال معاملة الثمار في الحقل وأثناء الخزن ببعض أنواع البكتيريا والخمائر التي تمنع نمو الفطريات على الثمار وبالتالي تمنع تلوثها بالسموم الفطرية كما استخدمت برامج المكافحة المتكاملة Integrated control (IC) والتي تعني استخدام أكثر من وسيلة واحدة في مكافحة المسبب المرضي كاستخدام الطرق الفيزيائية والحيوية معاً(Deo واخرون،1999). بالنظر لانفتاح السوق العراقية على الاسواق العالمية واستيراد كميات كبيرة من ثمار الفواكة ولقلة المخازن ذات المواصفات الفنية التي تستطيع حفظ الثمار من الاصابات الفطرية فضلا عن ضعف الرقابة الحدودية ادى إلى دخول كميات من الثمار مصابة بانواع فطرية مختلفة،ولأهمية الإصابات الفطرية المنتجة للسموم الضارة للمستهلك والمرافقة لثمار التفاح المستوردة والمحلية وقلة الدراسات حول هذا الموضوع هدفت الدراسة إلى:

1-عزل وتشخيص الفطر *A.parasiticus* المرافق لثمار لتفاح وتحديد قدرته على أنتاج سم الافلاتوكسين B1.

2- اختبار فاعلية بعض برامج المكافحة المتكاملة في حماية ثمار التفاح من الاصابة بهذه الفطر.

مواد وطرائق البحث

عزل وتشخيص الفطر *A.parasiticus* المرافق لثمار لتفاح

جمعت عينات من ثمار التفاح بصورة عشوائية من الأسواق المحلية في محافظة كربلاء خلال الفترة من 2013/9/1 - 2014/2/1 وضعت في اكياس بولي اثلين ونقلت إلى مختبر الدراسات العليا في قسم وقاية النبات كلية الزراعة-جامعة كربلاء . أخذت من مناطق الإصابة قطع صغيرة بطول 0.5 سم وعقمت القطع سطحيا بمحلول هايبو كلورات الصوديوم بتركيز0.5% لمدة دقيقتين ومن ثم غسلت بالماء المقطر المعقم بعدها وضعت على اوراق نشاف معقمة لإزالة الماء منها . زرعت القطع في إطباق بتري معقمة حاوية على الوسط البطاطا دكستروز اكر(P.D.A) Potato Dextrose Agar المضاف الية المضاد الحيوي تتراسايكلين بتركيز 200 ملغم / لتر ،وبواقع 5 قطع في كل طبق. حضنت الإطباق في درجة حرارة 25±1°م لمدة 2-3 أيام وبهدف تهيئة مزارع نقية للفطريات النامية تم نقل طرف الخيط الفطري للمستعمرات النامية بشكل مستقل الى إطباق حاوية على وسط P.D.A المعقم بعدها شخصت الفطريات إلى مستوى النوع اعتمادا على شكل المستعمرة وشكل وتركيب حوامل الابواغ والتراكيب الاخرى التي يكونها الفطر بإتباع المفاتيح التصنيفية المعتمدة . Carmichael (1957) {وParameter و Whitney (1970)وElis (1971) وPitt وHocking (1997) وBooth(1977) }
بعدها تم حساب نسبة ظهور كل فطر من عينات التفاح حسب المعادلة التالية

$$\text{النسبة المئوية للظهور} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الجنس أو النوع}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$$

تشخيص الفطر *Aspergillus parasiticus* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

نُمّي الفطر *A.parasiticus* على وسط P.D.A تحت درجة حرارة 25±2م° لمدة 7 يوم.

استخلاص وتنقية DNA

استخلص DNA من الغزل الفطري باستخدام محلول(Kit)الخاص باستخلاص الـ DNA من الفطريات والمجهز من شركة Biobasic الكورية وتمت عملية الاستخلاص باتباع تعليمات عدة الاستخلاص .

طريقة عمل تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

استخدمت تقنية PCR لتضخيم DNAالفطر *A. Parasticus* وتشخيصه وفقا لطريقة Khoury واخرون (2011) واستخدمت 4 بادئات كما موضح في الجدول(1) .

جدول (1):البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل Khoury)PCR واخرون (2011).

Anneling Temp.	Lenth (BP)	Nucleotide sequence	Primer
54	24	5-AAGGAATTCAGGAATTCTCAATTG-3	IGS-F, 5
73	23	5′-GTCCACCGGCAAATCGCCGTGCG-3′	IGS-R,
51	21	CTCGAGCGTATGAACGTCTAC	TubF
58	19	AAACCCTGGAGGCAGTCG	TubR

جدول(2): مواد تفاعل البلمرة المتسلسل.

الحجم	مكونات التفاعل
2مايكروليتر	Primer Forward
2مايكروليتر	Primer Reverse
10مايكروليتر	DNA
1مايكروليتر	D.W
15مايكروليتر	Total

بعد اكتمال الاضافات جميعها طردت العينات مركزيا بوساطة جهاز الطرد المركزي الخاص بأنابيب PCRونقلت إلى جهاز البلمرة الحراري PCR Thermal Cycler وضبط الجهاز على البرنامج التالي في الجدول(3).

جدول (3): برنامج جهاز البلمرة الحراري لتضخيم الـ DNA.

عدد الدورات	الزمن (دقيقة)	الحرارة	الخطوات	ت
1	4	94م°	Denaturation 1	-1
40	3	94م°	Denaturation 2	-2
	1	56م°	Annealing	-3
	1	72م°	Extention 1	-4
1	10	72م°	Extention 2	-5

الكشف عن نواتج التضاعف

كُشفَ عن نواتج التضاعف لجميع تفاعلات الـ SSR (Simple sequence Repeats) بتقنية الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز1.5%في محلول منظم(دارئ)-1X-TBE،وخُلط 23مايكرولتر من وسط التفاعل مع 4مايكرولتر من دارئ التحميل،وحملت العينات في كل حفرة من حفر الهلام وحمل نموذج الـ DNAالدليل (DNA marker)في حفرة مستقلة .اجرت عملية الترحيل في البداية على فرق جهد واطئ(45فولت)مدة 15دقيقة وبعد دخول الـ DNAفي الهلام رفع فرق الجهد إلى 80فولت مدة 4.5 ساعة .غمر الهلام بعد انتهاء عملية الترحيل في صبغة بروميد الاثديوم بتركيز 0.5مايكروغرام/مل مدة15دقيقة ثم عرض للاشعة فوق البنفسجية لاظهار الحزم .وصورت حزم الـ DNAالمضاعفة وقورنت وسجلت النتائج.

تحضير السم القياسي

حُصلَ على السم القياسي للافلاتوكسين B1من شركة (Sigma- Aldrich,Chemie.Gmbh Munich,Germany) على هيئة مسحوق متبلور في عبوة زجاجية تحتوي على 1 ملغم أذيبت محتويات العبوة في 1 مل من الكلوروفورم ومزجت بصورة جيدة للحصول على محلول متجانس تركيزه 1000 مايكرو غرام \مل،كما حُصلَ على السم القياسي الاوكراتوكسينAمن شركة Sigmaالأمريكية معبأ بعبوة زجاجية وبوزن 1ملغم .

اختبار قدرة عزلات الفطر*A.parasiticus* على أنتاج سموم الافلاتوكسينB1

اتبعت الطريقة التي ذكرها SobolevوDorner(2002)في الكشف عن سم الافلاتوكسين B1وتتضمن الخطوات الآتية نميت عزلات الفطرين *A.parasiticus* على وسط P.D.A بوضع أقراص منها بقطر 5ملم بعمر أسبوع في مركز كل طبق وكررت العملية ثلاث مرات (مكررات) لكل عزلة فطرية

بعدها حضنت عند درجة حرارة 25±2م°لمدة أسبوع بعدها أخذت أطباق كل عزلة وقطعت إلى قطع صغيرة بوساطة شفرة معقمة ونقلت بوساطة ابرة معقمة إلى خلاط كهربائي معقم حاوي 75مل من الماء المقطر المعقم مزج الخليط لمدة 10دقائق بعدها رشح عبر قطعة شاش نظيفة ثم نقل الراشح إلى قمع الفصل واضيف بمقدار حجمه كلوروفورم ورج جيدا لعدة مرات مع فتح الصمام بين الحين والأخر خلال عملية الرج للسماح للغازات بالخروج ، بعدها وضع القمع على حامل حديدي وترك قليلا إلى ان تكونت طبقتين طبقة الماء وطبقة الكلوروفورم ،اخذت طبقة الكلوروفورم وركزت باستخدام المكثف العاكس إلى ما يقارب 1مل. كشف عن وجود الافلاتوكسين**B1**باستخدام تقنية صفائح الكروموتوغرافي الرقيقة (TLC)ذات أبعاد(20×20)سم حيث نشطت الصفائح الزجاجية في الفرن الكهربائي بدرجة 105م°لمدة ساعة قبل الاستخدام (الجميلي،2014)واستخدم نظام الفصل كلوروفورم :ميثانول2:98 واخذ 15مايكروليتر بوساطة أنبوبة شعرية من السم القياسي ,AFB1ووضع على الخط بمسافة 2سم من الحافة اليسرى للصفيحة وعلى مسافة 2سم بين بقعة السم القياسي ووضعت كمية مساوية للسم القياسي من مستخلص العزلة الاولى وهكذا لبقية مستخلصات العزلات الأخرى بعدها وضعت الصفيحة في حوض الفصل الحاوي على نظام الفصل والمكون من مزيج الكلورفورم والميثانول وبنسبة 2:98حجم/حجم ،وروقبت لحين وصول المحلول إلى مسافة تقارب2سم من النهاية العليا للصفيحة ،واخرجت الصفائح وجففت تحت ظروف المختبر ولمدة 5 دقائق ثم فحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية وبطول الموجي 360نانومتر وكشف عن وجود الافلاتوكسين **B1**بمطابقة معامل الترحيل (Rf) ولون التألق للسم القياسي مع لون ومعامل ترحيل عينات مستخلصي الفطرين من الافلاتوكسينات .

$$Rf = \frac{\text{المسافة التي يقطعها كل مركب}}{\text{المسافة التي يقطعها نظام الفصل}} \times 100$$

(الجميلي،2014)

عزل البكتريا المرافقة لثمار التفاح

اخذت أجزاء من عدد من الثمار من العينات التي جلبت في عزل الفطريات وبطول 0.5 سم ومن اماكن مختلفة من كل ثمرة وزرعت على وسط الاكار المغذي Nutrient agar وبواقع خمس قطع لكل طبق وبأربع مكررات لكل عينة من عينات الثمار بعدها حضنت الاطباق تحت درجة حرارة 35 م° لمدة 24ساعة (الجميلي والموسوي،2011).بعد انتهاء مدة الحضن تم معاينة الخصائص المظهرية لمستعمرات البكتريا من حيث حجم ولون وقوام المستعمرات البكتيرية المعزولة(Carmichael،1957).

اختبار فاعلية البكتريا المعزولة من الثمار في تثبيط نمو الفطر *A.parasiticus* على وسط P.D.A.

نميت عزلات البكتريا في 100مل من وسط المرق المغذي(Nutrient Broth) وذلك بأخذ مسحة بواسطة ابرة التلقيح ذو العقدة من كل عزلة بكتيرية. حضنت المزارع بدرجة حرارة 35م° لمدة 24ساعة تم تهيئة وسط P.D.A بحجم 100مل مكررة في اربعة دوارق زجاجية حجم 250مل وعقم بالموصدة . اضيف لكل دورق بعد التبريد 1مل من لقاح إحدى عزلات البكتريا مزج اللقاح جيدا و صبت في ستة أطباق معقمة وتركت حتى تصلب الوسط و لقحت ثلاثة أطباق بأقراص من الفطر *A.parasiticus* فضلا عن معاملة المقارنة التي لقحت بالفطر فقط وكررت نفس الطريقة مع عزلات البكتريا الاخرى بعدها حضنت جميع الاطباق بدرجة حرارة 30م°لحين اكتمال النمو في معاملة المقارنة و حسبت أقطار النمو الفطري بأخذ معدل قطرين متعامدين يمران بمركز الطبق لمستعمرات الفطر في جميع الاطباق باستخدام مسطرة مدرجة (Gamliel وKatan،1992). حسبت النسبة المئوية للتثبيط باستخدام معادلة Abott(1923)والواردة في كتاب المبيدات (شعبان والملاح،1993)

$$\text{نسبة التثبيط (\%)} = \frac{\text{معدل قطر المستعمرة في معاملة المقارنة – معدل قطر المستعمرة في المعاملة}}{\text{معدل قطر المستعمرة في معاملة المقارنة}} \times 100$$

تشخيص عزلة البكتريا Bp4

شخصت العزلة Bp4 لإظهارها أفضل تثبيط لنمو الفطر *A.parasiticus* اعتمادا على دراسة بعض الصفات المظهرية و المزرعية مثل لون المستعمرة وشكل الخلايا البكترية (Collee واخرون،1996) فضلا عن الاختبارات الكيمو حيوية والتي ذكرها كل من Collee واخرون(1996) وMacfaddin(2000).

تاثير مادة بيكاربونات الصوديوم في نمو عزله البكتريا Bp4

حضر وسط (Nutrient broth) حسب تعليمات الشركة المصنعة. وزع الوسط على اربعة دوارق زجاجية سعة كل منها 250 مل احتوى كل منها على 100مل. بعدها أضيفت مادة بيكاربونات الصوديوم بتراكيز 1،2،3%غم/مل وبواقع تركيز واحد لكل دورق اما الدورق الرابع فترك بدون اضافة (معاملة المقارنة). رجت الدوارق جيدا ومن ثم عقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121م°وضغط 1جو لمدة 20 دقيقة . تركت الدوارق لتبرد إلى درجة حرارة 45 م° ثم لقحت جميع الدوارق ببكتريا Bp4 وحضنت بدرجة حرارة 35م°لمدة 24ساعة .ثم عملت سلسلة تخافيف من محتويات كل دورق (10^{-1}–10^{-7})في نفس الوقت تم تهيئة عدد مناسب من الاطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي وتم تلقيح اربع أطباق من التخفيف الأخير لكل تركيز من تراكيز بيكاربونات الصوديوم وذلك بأخذ 1مل من التخافيف (10^{-6}،10^{-7}) بواسطة ماصة دقيقة معقمة ونشرة على الوسط الزرعي في كل طبق بعدها حضنت الاطباق بدرجة حرارة 35 م° لمدة 24 ساعة بعدها حسبت أعداد المستعمرات ومن ثم حساب إعداد الخلايا البكترية في كل تركيز بتطبيق معادلة Clark(1965)

عدد خلايا البكتريا/مل = عدد مستعمرات البكتريا × مقلوب التخفيف.

تاثير درجات الحرارة المختلفة في أنبات ابواغ الفطر *A.parasiticus*.

تم تنمية عزلة الفطر *A.parasiticus* على وسط P.D.A المعقم والمضاف اليه المضاد الحيوي تتراسايكلين ولمدة اسبوع بعدها تم اجراء عملية حصاد للابواغ الفطرية وذلك باضافة 10مل من الماء المقطر المعقم لكل طبق و اخذ العالق البوغي وتم حساب إعداد الابواغ للفطر *A.parasiticus* باستخدام طريقة العد بالأطباق فضلا عن استخدام شريحة العد (Haemocytometer) في عد الابواغ ايضا . ضبط تركيز الابواغ للفطر بحيث كان 1×10^{6} بوغ/مل وذلك بعمل سلسلة من التخافيف للوصول الى هذة التركيز بعدها تم تعريض تلك الابواغ لدرجات حرارة (45و50 و55 و60)م°ولفترات زمنية 1، 5، 10/دقيقة لكل درجة حرارة .ثم زرعت ثلاث اطباق بالعالق الفطري المعامل حراريا بكل درجة حرارة ولكل فترة زمنية على حدة وبثلاثة اطباق كذلك زرعت ثلاث اطباق دون معاملتها بالحرارة كمعاملة مقارنة وحسبت عدد الابواغ بطريقة العد بالأطباق (Clark، 1965).

اختبار فعالية عدد من برامج المكافحة المتكاملة في حماية ثمار التفاح من الإصابة بالفطر *A.parasiticus*

طبقت برامج المكافحة المتكاملة على ثمار التفاح وبواقع ثلاث مكررات وبمعدل 500غم لكل مكرر وكما موضح في الجدول أدناه .

جدول(4) وصف المعاملات المنفذة لحماية ثمار التفاح في من الإصابة *A.parasiticus* .

رمز المعاملات	وصف المعاملة المختبرة
ث س+م ح +BS+ Bp4	ثمار سليمة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة حراريا (60م°لمدة 60ثانية) ومعاملة أيضا بالبكتريا *B. polymyxa* وبيكاربونات الصوديوم (بتركيز 2%).
ث س+م ح +Bp4	ثمار سليمة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة حراريا (60م°لمدة 60ثانية) ومعاملة أيضا بالبكتريا *B. polymyxa*.
ث س+م ح +BS	ثمار سليمة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة حراريا (60م°لمدة 60ثانية) ومعاملة أيضا بيكاربونات الصوديوم (بتركيز 2%).
ث س+ Bp4 +BS	ثمار سليمة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة بيكاربونات الصوديوم (بتركيز 2%) ومعاملة أيضا بالبكتريا *B. polymyxa*.
ث س+م ح	ثمار سليمة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة حراريا (60م°لمدة 60ثانية).
ث س +Bp4	ثمار سليمة ملوثة بالفطر *A.parasiticus* ومعاملة بالبكتريا *B. polymyxa* .
ث س +BS	ثمار سليمة ملوثة بالفطر *A.parasiticus* ومعاملة أيضا بيكاربونات الصوديوم (بتركيز 2%).
ث س**1**	ثمار سليمة ملوثة بالفطر *A.parasiticus*
ث س**2**	ثمار سليمة.
ث م+م ح +BS+Bp4	ثمار مجرحة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة حراريا (60م°لمدة 60ثانية) ومعاملة أيضا بالبكتريا *B. polymyxa* وبيكاربونات الصوديوم (بتركيز 2%).
ث م+م ح +Bp4	ثمار مجرحة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة حراريا (60م°لمدة 60ثانية) ومعاملة أيضا بالبكتريا *B. polymyxa*.
ث م+م ح +BS	ثمار سليمة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة حراريا (60م°لمدة 60ثانية) ومعاملة أيضا بيكاربونات الصوديوم (بتركيز 2%).
ث م+ +BS+ Bp4	ثمار مجرحة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة بالبكتريا *B. polymyxa* ومعاملة أيضا وبيكاربونات الصوديوم (بتركيز 2%).
ث م+م ح	ثمار مجرحة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة حراريا (60م°لمدة 60ثانية).
ث م +Bp4	ثمار مجرحة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة بالبكتريا *B. polymyxa* .
ث م +BS	ثمار مجرحة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* ومعاملة بيكاربونات الصوديوم (بتركيز2%).
ث م1	ثمار مجرحة ملوثة بلقاح الفطر *A.parasiticus* .
ث م2	ثمار مجرحة

*تم معاملة جميع الثمار المجروحة والسليمة الملوثة اصطناعيا بالعالق الفطري بنسبة 20مل /كغم .

بعدها وضعت الثمارفي اكياس من النايلون في درجة حرارة المختبر لمدة أسبوع وتم حساب المعاير التالية :

1- نسبة الإصابة على أساس ظهور الإعراض المرضية على الثمار والمتمثلة بتكون بقع مائية على الثمار وبحسب المعادلة التالية

$$\text{نسبة الإصابة (\%)} = \frac{\text{عدد الثمار التي ظهرت عليها أعراض الإصابة}}{\text{عدد ثمار في كل مكرر}} \times 100$$

(1994)Tongdee

2- شدة الإصابة وفق الدليل المرضي الذي جاء به Al-Rawashdeh وMuwaffaq(2014)مع تحوير النسبة المئوية إلى اقطار تقاس ب(ملم) حسب صالح (2006)

الدرجة	مظهر الاصابة
0	لاتوجد إصابة
1	قطر البقعة أكثر من 1- 10ملم
2	قطر البقعة أكثر من 11 -25ملم
3	قطر البقعة أكثر من 26- 50ملم
4	قطر البقعة أكثر من51 - 75ملم
5	قطر البقعة أكثر من 76 - 100ملم

ويتطبيق معادلة Mckinney (1923)تم حساب النسبة المئوية لشدة الإصابة

$$\text{شدة الاصابة (\%)} = \frac{\text{قطر البقعة من الدرجة 1×عدد الثمار + ----- + قطر البقعة من الدرجة 5×عدد الثمار}}{\text{عدد الثمار ×5}} \times 100$$

3- النسبة المئوية للتلف الجرثومي بحسب المعادلة التالية

$$\text{\% التلف الجرثومي} = \frac{\text{وزن الثمار المصابة بالتلف الجرثومي في المكرر الواحد}}{\text{وزن الكلي للمكرر}} \times 100$$

يوسف (2004)

التحليل الأحصائي

طبقت تجربة عامليه بالتصميم تام التعشية (CRD) لدراسة تاثير درجة الحرارة والعامل الحيوي وبيكاربونات الصوديوم في مدى تثبيط الفطر *A.parasiticus* وتقليل حيوية السبورات حيث استعملت درجة حرارة 60±1 في التجربة المخزنية وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي LSD على مستوى 0.05 ، كما طبقت تجربة عاملية لمعرفة تاثير درجات الحرارة المختلفة على انبات الابواغ للفطر *A.parasiticus* واستعمل البرنامج الأحصائي SAS (2001) في تحليل البيانات **.**

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطر *A.parasiticus* المرافق لثمار لتفاح

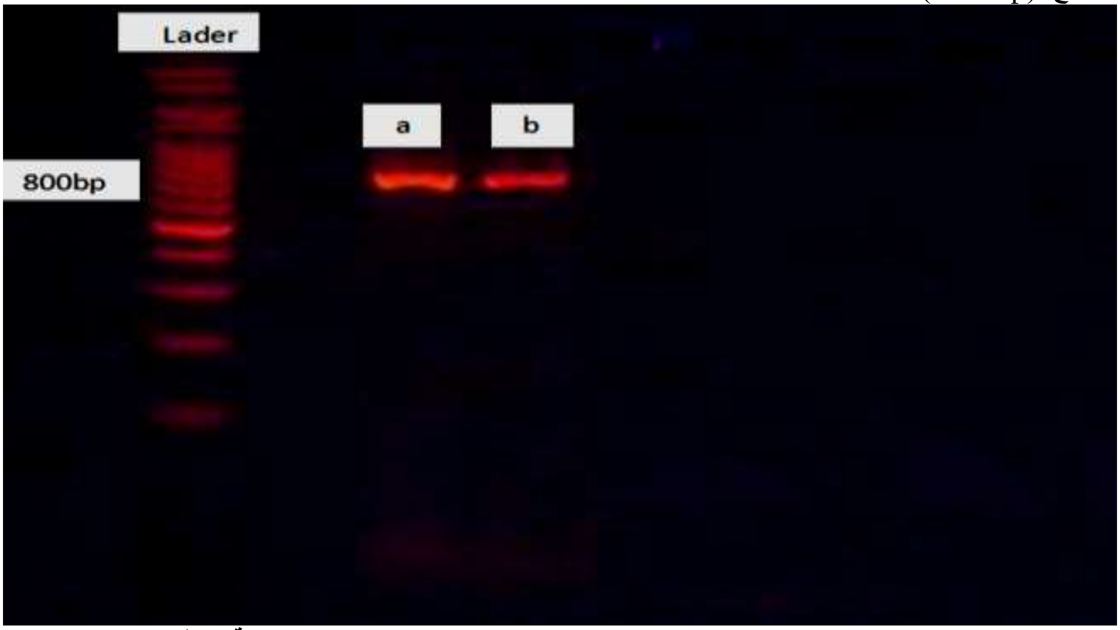
تم عزل ثلاثة أنواع من الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus* فضلا عن نوع واحد يعود للفطر *Rhizopus* كما تم عزل جنسين اخرين هما *Penicillium* و *Fusarium* ، اظهر الفطر *A.parasiticus* اعلى نسبة تردد في عينات ثمار التفاح المستورد والمحلي بلغ 66.2% و48.7% (جدول5)هذة النتائج تتفق مع ما توصل الية الجميلي والموسوي(2011)من سيادة الجنس *Aspergillus* في ثمار التفاح المستورد ويعود سبب سيادة الفطر *Aspergillu* spp. في الثمار لانتشاره الواسع في البيئة والناتج عن قدرتة على تكوين إعداد كثيرة من الوحدات التكاثرية المقاومة لظروف البيئية الغيرملائمة اذ تشكل هذه الوحدات التكاثرية (ابواغ لاجنسية)طريقة مهمة لانتشار الفطر في الهواء كون اقطارها اقل من 15 نانوميتر Alexopoulos واخرون(1979). كذلك قدرتها على النمو في مديات واسعة من الحرارة تتراوح مابين 5- 45م° او اعلى من ذلك (Moubasherواخرون،1982) فضلا عن ذلك فان لهذه الفطريات القابلية على النمو في مستويات رطوبة منخفضة اذ تسود الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus* spp. عند محتوى رطوبي يتراوح 15- 18 % وتلعب الحشرات دورا مهما في احداث الاصابات الفطرية من خلال الجروح التي تحدثهاAgarwal واخرون (1997) و الإصابة تحدث بصورة رئيسية من مواقع الجروح والخدوش التي تحصل عند عمليات الجني والتعبئة والنقل او من خلال العديسات خاصة بعد ضعف الثمار عند النضج والتقدم بالعمر.

جدول(5) النسبة المئوية لتردد الفطريات المرافقة لثمار التفاح المستوردة والمحلية.

الفطريات المعزولة	مصادر الثمار	نسبة التردد (%)
Aspergillus parasiticus	مستورد	66.2
	محلي	48.7
Aspergillus flavus	مستورد	8.9
	محلي	19.1
Penicillium spp.	مستورد	44
	محلي	40.3
Fusarium spp.	مستورد	5.8
	محلي	0.0
Rhizopus stolonifer	مستورد	32
	محلي	44

التشخيص التأكيدي لعزلة الفطر *A.parasiticus* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

اظهرت العزلة الفطرية نتيجة موجبة وكان البادئ متخصصا للمنطقة المعروفة باسم IGS-F/IGS-R (Repetitive) والخاصة بنوع الفطر *A.parasiticus* وضمن الموقع (800 bp) وهذا ما يجعل النتيجة مؤكدة ومتوافقة مع تشخيص الفطر مظهرياً. وتتفق هذه النتائج مع ماذكره Khoury و جماعته (2011)عند استخدام البادئ نفسه للقطعة في تشخيص نوع الفطر*A.parasiticus* والتي تقع ضمن الموقع 800 bp (شكل1)،كذلك تتفق مع ما ذكره الجميلي (2014).



شكل(1)الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% لناتج التضاعف DNA لعزلة الفطر *A.parasiticus* .
a: عزلة الفطر *A .parasiticus* الحاملة للجين *afLR*.   b : المقارنة Control.

اختبار قدرة عزلات الفطر *A.parasiticus* على أنتاج سم الافلاتوكسينB1

اظهرت نتائج التحليل الكيميائي باستخدام تقنية TLC ان 7 عزلات من الفطر *A.parasiticus*من مجموعة 12عزلة (58%) كانت منتجة لسم الافلاتوكسين B1(جدول 6)،وهذه النتائج تتقارب مع نتائج سابقة اشارت إلى ان غالبية عزلات الفطر *A.parasiticus* التي يجري الكشف على قابليتها على انتاج سم افلاتوكسينB1تكون موجبة (الورشان واخرون،2002 ; الساعدي،2012). وقد يعود تباين العزلات في انتاج الافلاتوكسين B1 الى اختلاف تلك العزلات وراثيا.

جدول(6):قدرة عزلات الفطر *A.parasiticus* على افراز سم الافلاتوكسين B1.

عزلات الفطر *A.parasiticus*	القدرة على انتاج الافلاتوكسين B1
Ap1	+
Ap2	+
Ap3	+
Ap4	+
Ap5	+
Ap6	-
Ap7	-
Ap8	-
Ap9	+
Ap10	+
Ap11	-
Ap12	-

+ قدرة العزلة على انتاج السم
- عدم قدرة العزلة على انتاج السم

تاثير مادة بيكاربونات الصوديوم في نمو عزلة البكتريا Bp4

اظهرت النتائج تاثير مادة بيكاربونات الصوديوم على تحسين نمو العزلة البكتريا Bp4.حيث نمت العزلة بعد 72ساعة من التحضين وكانت معدل عدد المستعمرات البكترية 230.7مستعمرة/طبق بينما كان معدل عدد المستعمرات البكترية للاطباق غير المعاملة ببيكاربونات الصوديوم 200.2مستعمرة/طبق على وسط الاكار المغذي .وتتفق هذة النتائج مع Spadaro واخرون (2002) في قدرة بيكاربونات الصوديوم في تنشيط الاحياء المجهرية في المكافحة الإحيائية واختلفت هذه النتائج إذ وجده Karabulutواخرون (2003) أن التوليفة من الخميرة *M.fructicola* مع بيكربونات الصوديوم لم تحسن كفاءة الخميرة إلاّ انهم وجدوا بأن استخدام بيكربونات الصوديوم لوحدها دور فعال في مكافحة أمراض ما بعد الجني في العنب.

تاثير درجات الحرارة المختلفة في أنبات ابواغ الفطر *A.parasiticus*.

اعطت درجة الحرارة 60 م°اقل نسبة انبات لابواغ الفطر *A parasiticus*. حيث كان عدد الابواغ 1.64×10^7، 1.13×10^7، 1.3×10^7 بوغ/مل على التوالي للمدد 1،5، 10دقيقة بينما كان عدد الابواغ النابتة لاطباق المقارنة 1.91×10^8 بوغ/مل وجاءت بعدها درجة الحرارة 55م° اذ كانت أعداد الابواغ في المدد الزمنية 1،5،10دقيقة 2.1×10^7، 1.6×10^7، 2.65×10^7بوغ/مل على التوالي(جدول7).ان انبات الابواغ يتاثر بدرجة الحرارة بشكل طردي بحيث كلما زادت درجة الحرارة والمدة زمنية قلت اعداد الابواغ النابتة وصولا الى اعلى درجة حرارية(60م˚) والتي استخدمت في البرامج اللاحقة بمدة زمنية 1دقيقة وذلك لتقليل الاضرار الحرارية على الثمار اذ يجب ايجاد حالة من التوازن بين المدى الحراري المؤثر في حيوية الابواغ الفطرية وقدرة الثمار على تحمل تلك الدرجات الحرارية دون حدوث اضرار(Al-Rawashdeh وMuwaffaq،2014).

جدول(7):تاثير درجات الحرارة ومدد التعرض على انبات ابواغ الفطر *A.parasiticus*.

درجات الحرارة (م°)	معدل لوغاريتم أعداد الابواغ - المدد الزمنية(دقيقة) 1	5	10	معدل درجات الحرارة(م°)
45	$(10^8\times3.4)$8.53	$(10^8\times1.3)$8.11	$(10^7\times5.9)$7.77	8.13
50	$(10^8\times2.8)$8.44	$(10^8\times1.7)$8.23	$(10^7\times4.3)$7.63	8.10
55	$(10^8\times2.1)$8.32	$(10^8\times1.6)$8.20	$(10^7\times2.65)$7.42	7.98
60	$(10^7\times1.64)$7.21	$(10^7\times1.13)$7.05	$(10^7\times1.3)$7.11	7.12
المقارنة	$(10^8\times1.91)$8.28	$(10^8\times1.91)$8.28	$(10^8\times1.91)$8.28	8.28
معدل الزمن(دقيقة)	8.15	7.97	7.64	**7.92**

L.S.D لمعدل درجات الحرارة =1.235.
L.S.D لمعدل الزمن = 0.961.
L.S.D للتداخل بين لوغاريتم درجة الحرارة والزمن = 1.179.

تقييم فعالية البرامج في مقاومة تعفن ثمار التفاح الناتج عن الفطر *A. parasiticus*

النتائج المبينة في الجدول (8) تُظهِر أنّ فعالية برامج المكافحة المتكاملة في المقارنة على إصابة ثمار التفاح بالفطر *A. parasiticus* كانت متفاوتة إذ بلغت نسبة إصابة الثمار السليمة والمطبق عليها برنامج المقاومة المتكاملة المؤلفة من معاملة الثمار بمادة كاربونات الصوديوم وبكتريا *B.polymyxa* 8.53% مقارنة بنسبة الإصابة لثمار معاملة المقارنة والبالغة 58.33%.أمّا الثمار المجرحة والمعاملة بمادة بيكاربونات الصوديوم كانت الافضل من حيث خفض معدل الإصابة للثمار إذ بلغت 33.3%في الوقت الذي وصلت نسبة الإصابة في معاملة المقارنة 91.66%.

من جانب آخر أوضحت النتائج أنّ معاملة (ث س+م ح+Bs+ Bp4) كانت هي الأكثر فعالية من المعاملات الاخرى إذ بلغت شدة الإصابة 0.1%في حين كانت في ثمار معاملة المقارنة 5.2%أمّا في حال الثمار المجرحة والمطبق عليها في نفس البرنامج فبلغت شدة الإصابة 2.5%في حين كانت في ثمار معاملة المقارنة 9.86%(جدول 8).

أمّا نسب التلف في الثمار بفعل الفطر *A. parasiticus* فتفاوتت بحسب البرنامج المطبق اذ ان البرنامج الاول والمطبق على الثمار السليمة كان هو الافضل إذ بلغت نسبة التلف 3.3%في الوقت الذي وصلت نسبة التلف في معاملة المقارنة 37.5% وارتفعت نسبة التلف في البرنامج الاول في حال الثمار المجرحة إلى 12%مقارنة بنسبة التلف في ثمار معاملة المقارنة والبالغة 85.3%(جدول8)

يمكن تعليل فعالية البرنامج المكون من معاملة الثمار ببكترياBp4 وبيكاربونات الصوديوم والمعاملة الحرارية الى قدرة البكتريا على تثبيط الفطر بآلياتٍ متعددة حيث تمتلك بكتريا *B.polymyxa* آليات متعددة تمكنها من التغلب على الممرضات والتي تتضمن المنافسة على الحديد والمغذيات وإفرازالمضادات الحياتية المتعددة المتمثلة بالـ polymyxins، وآليات عمل هذه المضادات ضد الكائن الممرض تكون من خلال منع التخليق الحيوي لبروتينات الخلية واحماضها النووية والتأثير على النشاط الانزيمي و منع تخليق جدار الخلية او الغشاء السايتوبلازمي فضلا عن قدرة هذه البكتريا على انتاج الانزيمات المحللة لهايفات الفطريات وخاصة انزيم Chitinase المحلل لمادة الكايتين والتي تشكل جزءاً مهماً من مكونات جدر الخيوط الفطرية الفطرية (Deo وآخرون،1999) وقد اشارت العديد من الدراسات فعالية برامج المقاومة المتكاملة والمكونة من عوامل حيوية +المعاملات الحرارية +مادة بيكاربونات الصوديوم على توفير حماية للعديد من أصناف الثمار المختلفة من امراض التعفن الناتجة عن الفطريات كالفطريات *Aspergillus* spp. و*Penicillium* وغيرها (Porat واخرون،2002) . وتعد مادة بيكاربونات الصوديوم من المضافات الامينة بحسب منظمة الغذاء و الدواء الأمريكية ، و عدت وكالة حماية البيئة الأمريكية السلع الزراعية المعاملة بهذه المادة خالية من المتبقيات (Palou واخرون،2001) . كما أنها أقل خطراً للانسان بسبب قلة سميتها للبائن و أنها غير غالية الثمن (Moubasher واخرون ،1982)و فيما يتعلق بآلية تأثير مادة بيكاربونات الصوديوم فمن الممكن أن تُعزى إلى أنّ هذة المادة تجعل الوسط قاعدياً وهذا لايناسب نمو الفطريات إذ أنّها تفضل الوسط المائل إلى الحموضة Karabulut واخرون (2003). لقد تضمنت بحوث أخرى نتائج مماثلة لنتائج هذه الدراسة و اقترحت تفسيرات أخرى ، إذ فسر تأثير البيكاربونات المثبط لنمو الفطريات بخفض ضغط انتفاخ الخلية الفطرية الذي يسبب انهيار و انكماش الخيط الفطري و الابواغ (Zhou واخرون،2001)، وهذة النتائج تتفق مع ما جاء به Helbig (2001) في قدرة بكتريا *B.polymyxa* على تثبيط الفطر *Botrytis cinerea* المسبب للعفن الرمادي على الفراولة كما تتفق مع Yang واخرون (2004) في قدرتها على تثبيط الفطرين *Fusarium oxysporum* و *Pythium* spp. المسببة لتعفن البذور وتعفن وموت الجذور في الخيار والبطيخ.

من جانب آخر تتفق هذه النتائج مع Palou (2001)في تقليل اومنع حدوث الاعفان باستخدام الحرارة الرطبة على الرغم من التاكيد على ضرورة ايجاد حالة من التوازن بين المدى الحراري المؤثر في حيوية الأبواغ الفطرية وقدرة الثمار على تحمل تلك الدرجات الحرارية من دون حدوث اضرار ،وعليه فان فعالية بيكاربونات الصوديوم تتكامل مع المعاملة الحرارية التي اختزلت حيوية أبواغ الفطريات الممرضة مضافاً اليها الدور الفعال لبكتريا *B.polymyxa* في تثبيط نمو الفطريات كل هذه العوامل تظافرت مع بعضها في الحد من نمو الفطريات المسببة للتعفن وبالتالي اختزال الأضرار في الثمار الناتجة عنها .

الاستنتاجات

1-ان الفطر *A.parasiticus* من اكثر الفطريات المتواجدة على ثمار التفاح و الكمثرى المستوردة والمحلية المتواجدة في الأسواق.

2- معظم عزلات الفطر *A. parasiticus* منتجة لسم الافلاتوكسين **B1**.

3- وفر برنامج المقاومة المتكاملة والمكون من معاملة ثمار التفاح والكمثرى بالحرارة ولقاح البكتريا *B. polymyxa* ومادة بيكاربونات الصوديوم حماية جيدة لتلك الثمار من إصابتها بالفطر *A. parasiticus*.

جدول (8): تأثير عدد من برامج المكافحة المتكاملة في معدلات النسبة المئوية للإصابة بالفطر *A. parasiticus* في ثمار التفاح .

برامج المكافحة	نسبة الاصابة	شدة الاصابة	نسبة التلف الجرثومي
ث س+م ح +BS+ Bp4	48.33	0.10	3.33
ث س+م ح +Bp4	50	1.96	9.16
ث س+م ح +BS	41.66	3.86	23.33
ث س+ +BS+ Bp4	8.53	3.13	21.33
ث س+م ح	58.33	2.70	18.46
ث س +Bp4	58.33	2.16	16.66
ث س +BS	41.66	2.90	13.66
ث س+م ح +BS	50	5.96	24
ث س1	58.33	5.20	37.55
ث س2	0	0	0
ث م+م ح +BS+Bp4	66.66	2.50	12
ث م+م ح +Bp4	75	6.56	32.33
ث م+م ح +BS	58.33	5.53	35.46
ث م+ +BS+ Bp4	75	7.73	30.66
ث م+م ح	66.66	6.26	47.13
ث م +Bp4	75	6.76	44.33
ث م +BS	33.33	7.86	53.53
ث م+م ح +BS	50	7.96	58
ث م1	91.66	9.86	85.33
ث م2	80	6.73	41.33
L.S.D0.05	12.4578	2.6472	16.818

*كل رقم في الجدول يمثل معدلا لثلاثة مكررات.

المصادر

الجميلي،سامي عبد الرضا ورغد علي الموسوي (2011) عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لثمار التفاح المستورد ودراسة التأثيرات السمية للفطر *A.terreus* في ذكور الجرذ الابيض.مجلة الكوفة للعلوم البايلوجية .جامعة الكوفة.

الورشان ، سالم حسن وأياد عبد الواحد الهيتي وحكمت عباس العاني (2002) فاعلية التربة في خفض تاثيرات الافلاتوكسين B1 الملوث لعلائق فروج اللحم . مجلة القادسية- العلوم الصرفة – المجلد 7 – العدد 1. عدد خاص ببحوث البيئة .

الساعدي، ابتسام بشير كاظم (2012) توصيف عزلات الفطر *Aspergillus SPP.* الحاملة لجين aflR الملوثه لبعض الاغذيه في اسواق النجف الاشرف وامكانية مقاومتها احيائيا.رسالة ماجستير.قسم علوم الحياة-جامعة الكوفه.

الجميلي،سامي عبد الرضا.(2014).السموم الفطرية.دار الكتب.كربلاء .العراق.422 صفحة.

شعبان، عواد و نزار مصطفى الملاح (1993) المبيدات. دار الكتب للطباعة و النشر. جامعة الموصل. 520 صفحة.

صالح ، ناهدة مهدي(2006) المكافحة الإحيائية لبعض مسببات تعفن ثمار التفاح بعد الجني.أطروحة دكتوراه.كلية الزراعة.جامعة بغداد.

يوسف،محمد يوسف (2004) تأثير بعض المسببات المرضية الفطرية وبعض المعاملات الخزنية لثمار الطماطة والخيار تحت ظروف الخزن المبرد.رسالة ماجستير.كلية الزراعة .جامعة بغداد.

Al-Rawashdeh, Z.B. and Muwaffaq R. K . (2014). Post –harvest control of apple blue mold under cold storage condition . American Journal of Agricultural and Biological Sciences .9 (2): 167-173.

Agarwal, V. K. and Sinclair. J. B. (1997).Principles of seed pathology .2 end ed. Lewis puplishers.CRC press Inc. 539 pp.

Alexopoulos, C.J., and Mims, C. W. (1979) Introductory Mycology, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York,USA, 632 pp.

Booth,C.(1977) *Fusarium* Laboratory Guide to the identification of the major species

Lippincott. Williams and Wilkins , Baltimore .USA, 964 pp.

McKinney , H.H. 1923 . Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum* . J. Agric. Research . 26 : 195-212. (Cited in Juber , K.S. 1996). Complex of root knot nematode *Meloidogyne javanica* and the fungus *Fusarium solani* and its biological control. Ph. D. Thesis . College of Agric. Univ. of Baghdad.

Moubasher,A.H.;Abdel-Hafez,S.I.I.;Abdel-fattah,H.M.and Mohrran .(1982). Fungi of wheat and broad-bean staw composts- *Mycopathology*.78:161-168.

Parameter, J.R. and Whitney, H.S., 1970. Taxonomy and Nomenclature of the Imperfect State of *Rhizoctonia solani* Biology and Pathology. Los Angles press, pp.7-10.

Pitt, J.I. and Hocking ,A.D. (1997) Fungi and Food Spoilage Blackie Academic and Professional,593pp.

Porat, R. Daus, A. , Weiss, B. Cohen, L. and Droby, S. (2002) . Effects of combining hot water , sodium bicarbonate and biocontrol on postharvest decay of citrus fruit . J. Hort .Sci . Biotechnol. 77: 441-445.

Palou, L. , Smilanick, J. L. , Usall, J. , and Viñas, I. (2001) . Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water , sodium carbonate , and sodium bicarbonate . Plant Dis. 85: 371-376 .

Spadaro, D.; Vola, R.; Piano, S.; and Gullino M.L.(2002) Mechanisms of action and efficiency of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biological*.4:346-352.

Sobolev,V.S. and Dorner,J.W.(2002).Cleanup procedure for determination of Aflatoxin in major agriculture commodities by liquid chromatography .J. of Association of Official analytical Chemist International ,85:642-645.

Tongdee, S. C. (1994) Sulfur dioxide fumigation in postharvest handling of fresh longan and ly-chee for export. *ACIAR Proceedings* .J. 50: 186-195.

common Wealth Mycological Institute,Kew,Surrey,England.58pp.

Carmichael, J.W.(1957) *Geotrichum candidum* .Mycologia, 49:820 -830.

Collee,J.G.; .Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996) Pratical Medical Microbiology,14th ed.Churchill Livingston,London.UK. a 37.

Clark, F.E. (1965) Agar-plats Method for totalmicrobial. (C.F:Black,1965.method of soil analysis part. Publisher Madison, Wisconson, USA, 1572pp.

Deo, N.; Vasan, S.S.; Modak, M.J. and Natarajan, K.A. (1999) Selective bio dissolution of calcium and iron Fabriks Bangalore, for providing the pure minerals to have from bauxite in the presence of *Bacillus polymyxa*. an experimental data to work with the bauxite. 9: 463-472.

Elis, M. (1971). Dematacious Hyphomycetes. Common Wealth Mycological Institute, Kew, Surry England. 605 pp.

Fazekas, B.; Tar, A. K. and Zomborszky-Kovacs, M. (2002) Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Vet.* Hung. 50: 177–188.

Gamliel, A. and Katan ,J. M.(1992) Chemotaxis of *fluorescent pseudomonads* towards seed exudates and germination seed in solarized soil .*phytopathology* .82:328-332.

Karabulut, O.A.;Smilanick, J. L. ; Mlikota Gabler,F. ; Mansour, M. and Droby, S.(2003) Near-harvest application of *Metschnikowia fructicola* , ethanol , and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in Central California . *Plant disease*. 87:1384-1389 .

Khoury, A.; Ali, A.; Toufic , R.; Roger, L.; Mireille, K. and Ahmed, L.(2011). Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of *aflR-aflJ* Intergenic Spacer.J. Open Archive Toulouse Archive Ouverte .76: 247-253.

Macfaddin. J.F.(2000) Biochemical test for identification of medical bacteria 3 ed .

Helbig, J. (2001). Biological control of Botrytis cinerea Pers. exFr. in strawberry by Paenibacillus polymyxa (Isolate18191). Journal of Phytopathology .149: 265-273.

Yang, J.; Kharbanda, P.D.and Mirza, M.(2004). Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* pkb1 for biocontrol of *Pythium* disease of cucumber in a hydroponic system. Acta Horticulturae 635: 59-66.

Zhou, T., C.L. Chu, W.T. Liu and K.E. Schaneider (2001) Postharvest control of blue mold and gray mold on apples using isolates of *Pseudomonas syringae*. Canadian J. Pl. Pathol. 23: 246-252.