دراسة قابلية بعض عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على إنتاج سموم الأفلاتوكسين الملوثة لبعض المحاصيل المحلية.

مؤيد سلمان حسن
كلية الزراعة/ جامعة القاسم الخضراء

الخلاصة:

اجريت هذه الدراسة في كلية الزراعة/ جامعة القاسم الخضراء خلال الفترة 2013-2014 وتهدف لدراسة قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* لإنتاج سم الأفلاتوكسين B1 من محاصيل حبوب محلية مختلفة. عزلت (19) عزلة من الفطريات عائدة الى جنس الـ *Aspergillus* المعزولة من محاصيل حبوب محلية مختلفة. تم تشخيص (7) انواع من جنس فطر الـ *Aspergillus* . شخصت (10) عزلات تعود الى الفطر *A.flavus* التي تم تحليل مستخلصاتها لمعرفة إنتاجها لسموم الأفلاتوكسين في المختبر بطريقة TLC. وجد (4) عزلات من الفطر *A.flavus* كانت منتجة لسموم الأفلاتوكسين والتي عزلت من حبوب الشعير، الذرة، فستق الحقل، وبذور الكريب فروت المحلية، أعطت مستخلصات هذه العزلات كميات 4000، 400، 130، 10، μg من Aflatoxin B1 لكل كيلوغرام من الوسط الطبيعي الرز بالتعاقب. كما وجدت ان العزلة المكونة للأجسام الحجرية (Sclerotia) أعطت أعلى انتاج من سموم الأفلاتوكسين B1 من بقية العزلات الأخرى المنتجة.

Studying of *Aspergillus flavus* isolates ability to produce Aflatoxin contaminated some local crops.

Mooaid Selman Hassan
College of Agriculture/ Al – Qasim green university

Summary:

This study was carried out at College of Agriculture- Al.Qasim greween university at period 2013 – 2014, the aims of this study were to study *Aspergillus flavus* isolates ability to produce Aflatoxin B1. (19) isolates of *Aspergillus* genus were isolated from various local crops. Seven species belong to *Aspergillus* genus were classified. (10) isolated of *Aspergillus flavus* were classified which their extracts were analyzed to know their abilities to produce Aflatoxins in vitro by TLC method. Only four isolates of *A.flavus* produced Aflatoxins isolates from barely, corn, pistachio nuts and grapefruit seed, then the positive isolates extracts gave 4000, 400, 130, 10μg Aflatoxin B1/ kg of rice medium, one of them which produce Sclerotia bodies gave higher quantity of AF.B1 than others of *A.flavus* isolates.

المقدمة

تنتشر الفطريات إنتشاراً واسعاً في الطبيعة حيث يوجد حوالي مليون ونصف نوعاً منها. هناك انواعاً من الفطريات (الأعفان) التي تنمو على الأغذية المختلفة والأعلاف مسببة تعفنها وفسادها، كذلك تنمو على الحبوب وبذور المحاصيل الزراعية مسببة خسائر إقتصادية كبيرة كما أشار الباحث (Moreau 1974) ان الأعفان تفرز أثناء نموها على المحاصيل الزراعية مواد كيمياوية سامة تدعى بالسموم الفطرية (Mycotoxins) حيث أستعملت هذه الكلمة عام (1960) بعد حادثة الديك الرومي في إنكلترا التي هلك فيها 100,000 رأس من الديك الرومي بسبب تناولها علف فستق الحقل الملوث بسموم سميت بالأفلاتوكسين نسبة إلى الفطر المنتج لها وهو *Aspergillus flavus* ، إكتشاف سموم الأفلاتوكسين حفز الباحثين على اكتشاف العديد من السموم الفطرية التي وصل عددها حالياً(400)نوعاً (Adejumoetal.;2014) اكثر السموم الفطرية التي تمت دراستها حالياً هي Ochratoxin, Aflatoxin , Fumonisin, Trichothecenes, بسبب تواجدها بكثرة

على المواد الغذائية ولتأثيرها السمية المرضية والمسرطنة للأنسان والحيوان(Moreau 1974)،تشير أحصائية منظمة (FAO) الى ان 25% من منتجات العالم الزراعية ملوثة بهذه السموم (Trungetal.;2008). أغلب أجناس الاعفان تلوث الحبوب والبذور أثناء الخزن لذلك تسمى Storage fungi وهي تشمل أجناس الفطريات *Aspergillus*، *Penicillum*، *Fusarium* المعروفة بإنتاجها سموم فطرية مختلفة بسبب توفر عوامل بيئية مناسبة لنموها كالرطوبة النسبية ودرجة الحرارة والمحتوى الرطوبي للمادة الغذائية إضافة إلى ذلك هناك عوامل داخلية تتعلق بالطبيعة الوراثية لعزلات الفطريات السامة وتكوينها السبورات الكويندية وتأثيرات تفاعلات الأكسدة و الأختزال Redox(Chang etal.;2007). إن الانواع الرئيسية لسموم الأفلاتوكسين هي B1,B2,G1,G2 وأصبح هناك (19) مركب مشتق لهذه السمـوم لحد الآن (Adejumo etal.;2014). أهم سموم الأفلاتوكسين هو Aflatoxin B1 الذي صنفته الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (International Agency for Research on cancer) بأنه المادة المسرطنة الأولى لسرطان كبد الإنسان (Adejumo etal.;2014). يعتبر الفطرين *A.flavus, A.parasiticus* الأكثر تلويثاً لمحاصيل الحبوب والبذور بسموم الأفلاتوكسين؛ فالفطر الأول ينتج أربعة أنواع من الأفلاتوكسين وأما الفطر *A.flavus* ينتج سموم الأفلاتوكسين B1 أو B2 أو كلاهما معاً. أكد الباحثين أن بعض عزلات الفطر *A.flavus* قادرة جينياً لإنتاج سموم الأفلاتوكسين بمستويات مختلفة كمياً ونوعياً (Carol etal.;1997) وإنتاج أجسام تكاثر لا جنسية متحجرة التي يلجأ الفطر لتكوينها عندما تكون ظروف الوسط الغذائي الذي تنمو عليه عزلات الفطر سيئة (Chang etal.;2006). إن للوسط الغذائي الذي ينمو عليه الفطر دوراً كبيراً على إنتاج سموم الأفلاتوكسين من خلال تكوينه السبورات الكويندية (conidiospores) والتي تكون أعدادها تفوق أعداد الأجسام الحجرية(Sclerotia) كما أشار إليه الباحث (Chang etal.;2006)، بعض عزلات الفطر *A.flavus* تكون أو لا تكون الأجسام الحجرية Sclerotia حسب الظروف المحيطة بالفطر، ولتلك الأجسام الحجرية Sclerotia علاقة بمستويات سموم الأفلاتوكسين B1 التي يفرزها الفطر خاصة بعد أن أكد العديد من الباحثين في العراق إلى أن وجود سموم الأفلاتوكسين B1 بمستويات عالية على الحبوب وخاصة الذرة الصفراء في السايلوات المحلية أو في أعلاف الدواجن التي تدخل في تركيبها الذرة الصفراء (الهيتي، 1997، ناجي سعد وآخرون، 2007). تهدف هذه الدراسة إلى:

1- تشخيص بعض انواع عزلات الفطريات العائدة الى جنس الـ *Aspergillus* الملوثة لبعض انواع الحبوب والبذور المحلية.
2- دراسة إنتاج عزلات الفطر *A.flavus* لسموم الأفلاتوكسين B1,B2 كماً ونوعاً في المختبر، وتحديد العزلات الأكثر إنتاجاً للأفلاتوكسين B1.
3- معرفة تأثير الأجسام التكاثرية الحجرية Sclerotia التي تنتجها عزلة الفطر *A.flavus* على كمية الأفلاتوكسين B1 المنتجة.

2- المواد وطرق العمل:

2.1. عزل الفطريات:-

عزلت (19) عزلة من فطر *Aspergillus* من محاصيل الحبوب والبذور المختلفة المحلية على الوسط الغذائي (Potato Dextrose Agar) وذلك بأخذ جزء من المايسيليوم أو سبورات العزلة النامية على تلك الحبوب بواسطة اللوب. وزرعها على الوسط المذكور وحضنتها على درجة حرارة (25م°) لمدة (7) أيام وفي ظروف الظلام لملاحظة وتشخيص العزلات الفطرية النامية ويستعمل نفس الوسط أعلاه لتنقية هذه العزلات الفطرية المعزولة. أعيدت زرع هذه العزلات على الوسط (*Aspergillus* Differntial medium) الذي يستخدم لتشخيص أنواع الفطريات التابعة لجنس الفطر *Aspergillus* وحضنت المزارع الفطرية على درجة حرارة (28م°) لمدة (3 أيام) وهي الدرجة الملائمة لنمو اغلب أنواع *Aspergillus* ويتكون الوسط الزرعي (A.D.M) من المكونات التالية:-

Typtone	15g
Yeast extract	10g
Ferric Citrat	0.5g
Dist.water	1000ml

تعقيم الوسط الزرعي على درجة حـرارة (121م°) لمدة (20) دقيقة.

2.2- تصنيف الفطريات:-

فحصت الشرائح الزجاجية (السلايدات) التي حضرت بأخذ نماذج من المزارع الفطرية النامية على الوسط. (A.D.M) وصبغت هذه الشرائح بصبـغة Blue lactophenol لإجراء الفحص المجهري عليها، وأستخدم مايكروسكوب مركب مجهز بكاميرا (Camera lucida) التي تعطي قياسات لنموات الفطر كالمايسليوم والسبورات الكونيدية والحامل الكونيدي. أستعمل المفتاح التصنيفي (Key) الخاص بأنواع جنس الفطر *Aspergillus* حسب المصدر (Onions etal.;1981)، وتم تشخيص وتصنيف جميع العزلات الفطرية. بعد تشخيص العزلات الفطرية، نقلت المزارع الفطرية للفطر *A.flavus* في أطباق بتري الى الحاضنة على درجة حرارة (37م°) لمدة (10-12) يوماً لملاحظة تكوين الاجسام التكاثرية المتحجرة (Sclerotia) التي يكونها الفطر في الظروف الغير ملائمة للنمو كالجفاف ودرجة الحرارة العالية.

- تحضير المزارع الفطرية:-

أستعمل الوسط الطبيعي المكون من الرز (50غم) مضافاً اليه (50مل) ماء مقطر في دورق سعة (250مل) وعقم هذا الوسط على درجة حرارة (121م°) لمدة (20) دقيقة في جهاز الـ autoclave، بعد ذلك زرعت كل عزلة من عزلات الفطر *A.flavus* النقية على هذا الوسط الطبيعي لمعرفة انتاجها لسموم الأفلاتوكسين وعمل لكل عزلة أربع مكررات ثم حضنت المزارع الفطرية على درجة (25م°) لمدة (21) يوماً بحيث غطى النمو (90 – 100%) من مساحة سطح الدورق.

2.4- إستخلاص الأفلاتوكسين من المزارع الفطرية:-

استخدمت طريقة(Moreau1974) مع إجراء بعض التحويرات وذلك بإضافة (150مل) من المذيب العضوي (Chlorofrom) إلى المزارع الفطرية مباشرة لإجراء عملية الإستخلاص (Extraction) ومزجها به بإستخدام جهاز هزازة دوارق Shaker لمدة نصف ساعة وترشيح المستخلصات خلال ورق ترشيح يحتوي على كمية من كبريتات الصوديوم اللامائية للتخلص من الماء.

2.5- تنقية المستخلصات (Clean up):-

تمت تنقية المستخلصات في إستخدام طريقة (Jarvis etal.;1982) حيث تم تحضير طبقات العمود الكروماتوغرافي الزجاجي قياس (300m×20mm) بالترتيب الآتي:-

4- كبريتات الصوديوم اللامائية. (15غم)

3- Silica gel نوع **S** (0.2-0.5).(10غم)

2- كبريتات الصوديوم اللامائية. (5غم)

1-صوف الزجاج.

أضيفت المذيبات العضوية التالية لإزالة الدهون والصبغات:-

جمع الأفلاتوكسين عن طريق ترشيح المستخلصات أعلاه في العمود الكروماتوغرافي وذلك بإستخدام نظام المحاليل العضوية للفصل Chloroform:methal (97:3) وتركيز هذه المستخلصات لأصغر حجم ممكن بإستخدام جهاز مبخر دوار. Rotary evaporator vaccum.

2.6- التقدير النوعي للأفلاتوكسين بطريقة صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة TLC :-

تم التقدير النوعي للمستخلصات بعد أجراء عملية التنقية أعلاه بطريقة Thin layer (TLC) chromatography بإستعمال محلول قياسي لسموم الأفلاتوكسين Aflatoxin standard mixtures ، B1,B2,G1,G2 (المرسل الينا من قبل الدكتور Ir van Rgmond من هولندا) وتحت طول موجة 366nm من الأشعة فوق البنفسجية في داخل جهاز UV Cabinet نوع CAMAG حسب المصدر (Shotwell et al.; 1981).

2.7-الفحص التأكيدي(Confirmatony Test):-

تم هذا الفحص بإستخدام محلول من حامض النتريك مع الماء بنسبة (2:1) وذلك برش المحلول على الصفائح (TLC) فتغير لون البقع المتوهجة للأفلاتوكسين من الأزرق إلى الأصفر مما يؤكد على وجود الأفلاتوكسين حسب ما ذكره الباحث في (Shotwell etal.; 1981).

2.8- التقدير الكمي للأفلاتوكسين B1:-

تم التقدير الكمي للمستخلصات الفطرية الحاوية على سم الأفلاتوكسين B1 بطريقة (TLC) بإستخدام صفائح كروماتوغرافي الزجاجية الجاهزة المطلية عادة Silica gel 60G سمك (0.2)mm قياس (20 cm ×20) من شركة Merk وكذلك أستخدم محلول قياسي لـAflatoxin B1 (المجهز إلينا الدكتور Van Rgmond من هولندا). تم تحليل النتائج وفق تصميم الأحصائي (C.R.D) بأربعة مكررات لكل معاملة وأستخدم (L.S.D) بمستوى معنوية 0.05 حسب المصدر(الراوي وآخرون 2000).

- النتائج والمناقشة:-

أسفرت نتائج البحث عن تشخيص(7) انواع مختلفة من جنس الفطر *Aspergillus* الملوثة للحبوب والبذور المحلية (جدول1، جدول2)، أن معظم عزلات الفطريات *A.terreus* ، *A.niveus*، *A.candidus* معروفة بإنتاجها لسموم فطرية هي الـ Citrinin و patulin المعروفة بتأثيراتها على الإنسان والحيوان.

اظهرت النتائج الى تشخيص عشرة عزلات تعود الى الفطر نوع *A.flavus* الذي يعتبر الملوث الأكثر إنتشاراً على الحبوب والبذور المحلية وهو معروف بإنتاجه لسموم الأفلاتوكسين. أظهر التحليل النوعي لمستخلصات عزلات الفطر *A.flavus* على الوسط الطبيعي (الرز) وجود عزلات غير منتجة لسموم الأفلاتوكسين وهناك أربعة عزلات من هذا الفطر أنتجت سم Aflatoxin B1 بضمنها عزلة واحدة رمزها (55) أنتجت سم Afaltoxin B1 مع سم Aflatoxin B2 (جدول2).

جدول رقم (1) انواع عزلات فطر الـ *Aspergillus* الملوثة للمحاصيل المحلية.

رمز العزلة	*الفطر*	المصدر	المنطقة
8	*A. candidus*	حبوب الذرة البيضاء	أبو غريب
80K	=	حبوب الذرة الصفراء	أبو غريب
81	=	حبوب الذرة الصفراء	أبو غريب
86	*Aspergillus* sp	بذور الباقلاء	أبو غريب
20	=	بذور الباقلاء	أبو غريب
90	*A. wentii*	بذور الرقي	أبو غريب
17	*A. terreus*	بذور العصفر	أبو غريب
S4.1	*Aspergillus* sp	ثمار الخضراوات	الراشدية
59.2	*A. niger*	ثمار التفاح	بغداد /أسواق محلية
96	*A. niveus*	ثمار التفاح	بغداد /كلية الزراعة
77	*A.* niger	حبوب الشعير	سايلو التاجي
74	*A. niger*	حبوب الرز	سايلو التاجي
56	*Aspergillus* sp	ثمار التفاح	بغداد /أسواق محلية
58	*Aspergillus* sp	ثمار التفاح	بغداد /أسواق محلية
113	*A. niger*	حبوب الذرة الصفراء	سايلو بابل
112	*A. niger*	حبوب الذرة الصفراء	سايلو بابل
87	*A. wentii*	حبوب الذرة البيضاء	محافظة بابل
142	*A. ochraceous*	بذور الكريب فروت	مستوردة / السودان
14.2	*A. terreus*	حبوب الذرة الصفراء	محافظة بابل

جدول (2) عزلات فطر الـ *A.flavus* المنتجة وغير المنتجة لسموم Aflatoxins الملوثة للمحاصيل المحلية.

رمز العزلة	المصدر	المنطقة	الأفلاتوكسين
55	الفستق	السليمانية	B1 , B2
85	بذور الرقي	أبو غريب	N.d
91	بذور الرقي	أبو غريب	N.d
95	بذور الرقي	أبو غريب	N.d
89	بذور الرقي	أبو غريب	N.d
125	الشعير	أبو غريب	B1
78	الحنطة	سايلو التاجي	N.d
124	الحنطة	أسواق بغداد	N.d
103	الذرة الصفراء	سايلو بابل	B1
141	بذور الكريب فروت	مستورد / السودان	B1

N.d = Note detected

اظهر التحليل الكمي لمستخلصات عزلات الفطر *A.flavus* الأربعة قابليتها على إنتاج سم Aflatoxin B1 بنسب متفاوتة والتي تراوحت (10ppb – 4000ppb) (جدول 3)، كانت اكثر العزلات الفطرية إنتاجاً لسم Aflatoxin B1 هي عزلة الفطر *A.flavus* ذات الرمز(141) على وسط غير معزول منه وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث(Carol.etal.;1997)على أن قابلية عزلات هذا الفطر النامي على الوسط الصلب أعطت كميات متباينة وعالية من حيث الكمية(100ppb-1000ppb)بدرجة حرارة (28م°)

وكذلك يتفق أيضاً مع ما ذكره الباحث (Chang etal.; 2007) بإختلاف قابلية إنتاجها للأفلاتوكسين على الأوساط الغذائية الصلبة ،السائلة والأوساط الطبيعية.

أظهر الفحص المجهري لعزلة الفطر *A.flavus* (141) الأكثر إنتاجاً لسم Aflatoxin B1 وجود صفات مورفولوجية خاصة بها، وقد أخذت قياسات لأجزاء جسم الفطر وسبوراته بواسطة كاميرا Iucida المثبتة على جهاز المايكروسكوب المركب (جدول4).

جدول (3) نتائج التحليل الكمي لمستخلصات عزلات الفطر *A.flavus* المنتجة للسم الفطري Afltoxin B1 مقدرة بـ(ppb) µg/kg.

رمز عزلة الفطر	كمية Aflatoxin B1 مقدرة بـ µg / Kg or (ppb)
85	0
125	10
103	130
55	400
141	4000
L.S.D	1106.179

*ان النتائج الموضحة أعلاه هو معدل أربع مكررات لكل عزلة.

* ان العزلة المستخدمة للمقارنة (Control) رمزها 85.

جدول رقم (4) الصفات المورفولوجية لعزلة الفطر (141) *A. flavus*

أجزاء جسم الفطر	الشكل	الجدار الخلوي	الطول µm	العرضµm
1 - Conidial Head	Uniseriate Biseriate	أملس	-	7.2-15.7
2 - Phialide	متطاولة الى هراوية الشكل	أملس	8-11.2	3.2-4
3 - Vesicl	بيضوية الى دائرية الشكل	أملس	40	37.6
4 - Conidiospores	دائرية الى كروية الشكل	املس الى قليل الخشونة	-	2.4-4.8
5 - Foot cell	متضخمة	أملس	-	5.7-8.6

ظهرت فروق معنوية في كمية Aflatoxin B1 المنتجة (جدول3)، بعد تشخيص الصفات المورفولوجية للعزلة الأكثر إنتـاجاً للفطـر *A.flavus* ورمزها (141) (جدول4) لوحظ وجود اجسام حجرية بنية اللون، مختلفة الأشكال، خشنة الجدران، والتي كونتها عزلة الفطر عند تقدمها بالعمر وفي ظروف نقص الغذاء والرطوبة، يتحول المايسليوم الى هذا التركيب المقاوم الذي يسمى بالـ (Selerotia) والتي تنبت عند توفر الظروف الملائمة لـتعيد دورة الحيـاة وهـذا يتفـق مـع مـا ذكره البـاحث(Christos et al .; 2006). إن سبب الإختلاف الكمي لإنتاج السم Aflatoxin B1 يعود إلى الظروف البيئية (كدرجة الحرارة، والرطوبة النسبية، والمحتوى الرطوبي للوسط الزرعي، والعناصر الغذائية) كعوامل خارجية وعوامل أخرى داخلية تتعلق بالطبيعة الوراثية لعزلة الفـطر السامـة كوجود جين مسـؤول (Responsible gene) عـن إنتـاج Aflatoxin B1 كنظام دفاعي كيمياوي يختلف من عزلة إلى أخرى، وكذلك حدوث جهد تأكسدي Oxidative stress على عزلة الفطر مسـبباً تكوين الأجسام الحجرية (Sclerotia) وزيـادة تركيز سم Afaltoxin B1 في هذه الأجسام التكاثرية الحجرية على حساب أعداد السبورات الكونيدية Condiospore التي تحتوي على السم Aflatoxin B1 أقل كمية مما في Sclerotia، هذا يفسر زيادة إنتاج كمية السم Aflatoxin B1 في عزلة الفطر ذات الرمز (141)، وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث(Wicklowetal.;1983) والباحث (Christos et al., 2006) بأن كمية السم Aflatoxin B1 في الـ Sclerotia تكون أكثر مما هي عليه في السبورات الكويندية. من خلال ما تقدم يمكن القول إلى أن وجود هذه العزلات الأربعة للفطر *A.flavus* على حبوب الرز طبيعياً في الحقل او في المخزن وتحـت الظـروف المـلائمة لإنتـاج الأفلاتوكسين فأن بإمكانها أن تفرز كميات متباينة وعالية من سموم الأفلاتوكسين في الطبيعة لا سيما وأن الجرعة اللازمة لحدوث التسمم والسرطان هي 50µg/ day ، والنسبة المسموح بها من الأفلاتوكسين عالمياً في الأغذية والأعلاف هي 20ppb حسب تقارير منظمـة الـ FAO (Adejumo etal.,2014) مما يشكل خطورة على الأشخاص الذين يستهلكون الرز والحبوب الملوثة، بهذه السموم أو يتعرضون إلى الغبار الحاوي على كميات عالية من سبورات الفطر في مخازن الحبوب أو السايلوات مما يسبب إصابة العاملين بأمراض رئوية حادة.

المصـادر

الراوي، خاشع محمود، خلف الله، عبد العزيز محمد (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/ جامعة الموصل – كلية الزراعة والغابات، 1-488.

الهيتي، اياد عبد الواحد (1977). الفطريات التي تهاجم حاصل الذرة الصفراء في المخازن، تشخيصها، تأثيرها، مقاومتها. رسالة ماجستير قسم وقاية البنات – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

سعد، عبد الحسين ناجي، العاني، عماد الدين عباس، الضنكي، زياد طارق محمد، مناتي، جاسم قاسم، الهيتي، حاتم عيسى (2007). تأثير معاملات مختلفة لتقليل آثار التسمم بالأفلاتوكسين في الأداء الإنتاجي لفروج اللحم. مجلة علوم الدواجن العراقية 2(2): 16-1.

Adejumo T.O. and. D.O. Adjoro. (2014). Incidence of Aflatoxin, Fumonicins, Trichothecenes and Ochratoxins in Nigerian foods and possible intervention strategies. Food Science and quality Management. 31: 127 – 146.

Carol Y.R., C.F. Richard, B.W. linda, F.L. Daniel, A.B. Harriet. (1997). A study of Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* growing on wall board. Journal of the American Biological safety Association. 2 (4): 36-42.

Chang .P.K. and. S.S.T.Hua. (2007). Malasses supplementation promotes conidiation but Suppresses, aflatoxin production by small seclerotial *A.flavus*, Letters in applied microbiology. 44:131-137.

Christos D.G. P. Niklolaos, p. Ioannis and Z.George. (2006). Seclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induce by oxidative stress. Integrative and comparative biology. 46(6): 691-712.

Jarvis B., W.B. Chapman, A.p. Williams, D.M. Norton, and G.M. Toule. (1982). Methods for the detection and identification of

selected mycotoxins, in isolation and identification method for food poisoning organisms.SAB Technical Series. (17): 67-92.

Moreau C. (1974).Moisissures toxiques dans L' alimentation. E.D. Masson Et Cie. Paris 2eme edition. PP. 471.

Onions A.H.S, D. Allsopp and H.O.W. Eggins. (1981). Smith's introduction to industrial mycology. 7th. ed. Arnold, London. PP.398.

Shotwell O.L., R.B. William and D. Thomas. (1981). Thin layer chromatographic Determination of Aflatoxin in corn Dust. J. Assoc. off. Anal. Chem. 64 (5): 60-63.

Trung T .S. , C.Tabuc , S.Bailly , A. Querin,P.Guerre and J.D.Bailly. (2008). Fungal mycoflora contamination of maize from Vietnam with aflatoxin B1 and Fumonisin B1. World mycotoxin journal. Feb.1 (1): 87 – 94.

Wicklow D.T. O.L. Shotwell. (1983). Intrafungal distribution of Aflatoxins among conidia and Sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus Parasiticus.* Can. J. Microbiol. 29: 1-5