عزل وتشخيص الفطريات المنتجة للسموم الفطرية والمرافقة لثمار التفاح المستورد والمحلي واختبار كفاءة عدد من برامج المكافحة المتكاملة للسيطرة عليها

ذوالفقار عبد الستار جبار* أ.د.سامي عبد الرضا الجميلي م. د.رجاء غازي الجنابي*

كلية الزراعة/جامعة كربلاء* كلية العلوم الطبية التطبيقية/ جامعة كربلاء

المستخلص

اجريت هذه الدراسة عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لثمار التفاح المستوردة والمحلية و اختبار فعالية عدد من برامج المكافحة المتكاملة في السيطرة عليها.

أظهرت نتائج العزل وجود أجناس الفطرية التالية *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و *Rhizopus* و، وكان الفطر *Aspergillus niger* هو الأكثر ظهورا في ثمار التفاح اذ بلغت نسبتها 81.9 % في ثمار المستوردة و51.1% في الثمار المحلية.

وبين الكشف الكيميائي باستخدام تقنية الواح الكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatgraphy ان أحدى عشر عزلة من الفطر *A. niger* من بين اربعة عشر عزلة (88%) منتجة لسم أفلاتوكسين**B1**، كما اظهرت نتائج التحليل الكيميائي ان ستة عشر عزلة من مجموع عشرين عزلة (80%)كانت قادرة على افراز سم الاوكراتوكسين A .

كما اظهرت نتائج العزل وجود عزلتين من البكتريا لها القدرة على التضاد مع الفطر *A.niger* وأعطت عزلة البكتريا Bp4 *Bacillus polymyxa* المعزولة من ثمار التفاح اعلى نسبة تثبيط للفطر اذ بلغت 88% وأظهرت النتائج ايضا ان برنامج المكافحة المتكاملة والمكون من العزلة **Bp4** مع مادة بيكاربونات الصوديوم والمعاملة الحرارية هو الافضل من حيث القدرة على مكافحة التعفن الناتج عن الفطر *A. niger* ،اذ بلغت النسبة المئوية للإصابة بالفطر *A. niger* 8.33%وبفارق معنوي عن نسبتها في معاملة السيطرة (ثمار معاملة بلقاح الفطر *A. niger* فقط)والبالغة 41.66%في حين بلغت نسبة الإصابة للثمار المجرحة والمطبق عليها نفس البرنامج 58% في الوقت الذي بلغت نسبة الإصابة في معاملة المقارنة 91.66.

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

*** مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول Tho.ahmed@yahoo.com**

Isolate and diagnose fungi producing Mycotoxins accompaniment for apples imported and local and test the efficiency of a number of integrated control programs to control it

Abstract

This study was conducted to isolate and diagnose fungi associated with apples imported and domestic, and test the effectiveness of a number of integrated pest management programs in control. Results showed a solitary existence fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* following and *Fusarium* and *Rhizopus*, and was *Aspergillus niger* fungus is most visible in the apples it reached 81.9% increase in imported fruits and 51.1% in local fruits. And the detected the chemical using a technique plates Alkromatokravaa thin layer (TLC) Thin Layer Chromatgraphy that eleven isolates of the fungus *A .niger* of between fourteen isolation (88%) producing toxin aflatoxin B1, as shown by the results of chemical analysis that sixteen isolation of the fungus *A. niger* total of 20 isolates (80%) were able to secrete toxin ochratoxin A.The results showed solitary existence two isolate of bacteria have the ability to contrast fungus *A.niger* and given the isolation of bacteria Bp4 *Bacillus polymyxa* isolated from apples highest percentage inhibition of the fungus as it stood at 88% and the results showed also that the integrated control program which consists of isolation Bp4 material with sodium bicarbonate and treatment heat is the best in terms of the capacity to combat the rot caused by the fungus *A.niger*, as the percentage of infection of the fungus *A.niger* 8.33% and a difference of significantly for increase in the control treatment (fruits treatment vaccine *A. niger* fungus only), amounting to 41.66% while the percentage of infection of injury fruits and applied the same program by 58% at a time when the percentage of infection in the treatment of comparison 91.66.

المقدمة

يشكل تلوث الأغذية الناتج عن السموم الفطرية احد المعضلات التي تواجه شعوب العالم كونها تتسبب في إحداث الكثير من الأمراض للإنسان والحيوانات الداجنة (14)،وبحسب إحصائية منظمة الغذاء والزراعة العالمية (FAO) لسنة 2003 ان أكثر من 25% من الغذاء العالمي ملوث بتلك السموم بكميات تتراوح بين 20– 25 مايكرو غرام / كغم غذاء والكثير من شعوب العالم الثالث تتعرض لعمليات تسمم حادة ناجمة عن تناولهم الأغذية الملوثة بتراكيز عالية من السموم الفطرية (30).تتعرض الثمار والخضار للتلوث بالسموم الفطرية في الحقل وأثناء النقل والخزن نتيجة إصابتها بالفطريات *Aspergillus* و*Alternaria* و *Penicillium*و*Rhizopus* وغيرها (16)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 بالسموم الفطرية إلا أن اغلب هذه المحاولات بقيت في نطاق محدود ولم تعطِي حلول ناجعة لحل هذه المشكلة (20).قد 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 (IC) Integrated controlوالتي تعني استخدام أكثر من وسيلة واحدة في مكافحة المسبب المرضي كاستخدام الطرق الفيزيائية والحيوية معاً(17). 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 الفطريات المرافقة لثمار لتفاح وتحديد قدرتها على أنتاج بعض أنواع السموم الفطرية.

2– اختبار فاعلية بعض برامج المكافحة المتكاملة في حماية ثمار التفاح من الاصابة الفطرية.

مواد وطرائق البحث

عزل وتشخيص الفطريات المرافقة

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 0.5–1سم وعقمت القطع سطحيا بمحلول هايبو كلورات الصوديوم بتركيز0.5% لمدة دقيقتين ومن ثم غسلت بالماء المقطر المعقم. زرعت القطع في إطباق بتري معقمة حاوية على الوسط البطاطا دكستروز اكر(P.D.A) Potato Dextrose Agar المضاف الية المضاد الحيوي تتراسايكلين بتركيز 40 ملغرام / 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 (13) وParameter (28) وEllis (18) وPitt(27) و Booth(11) }

بعدها تم حساب نسبة ظهور كل فطر من عينات التفاح حسب المعادلة التالية .

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

اختبار قدرة عزلات الفطر *A. niger* على أنتاج سموم الافلاتوكسين B1 و الاوكراتوكسين A

تم الكشف عن قدرة عزلة الفطر *A.niger* على انتاج سم الافلاتوكسين **B1** و الاوكراتوكسين A وفقا لما جاء به Magan وOlsen (24).

عزل البكتريا

من العينات التي جلبت في عزل الفطريات اخذت أجزاء من عدد من الثمار وبطول 1–2سم ومن اماكن مختلفة من كل ثمرة وزرعت على وسط الاكار المغذي الصلب Nutrient agar وبواقع خمس قطع لكل طبق وبأربع مكررات (أطباق) لكل عينة من عينات الثمار بعدها حضنت الاطباق تحت درجة حرارة 35م° لمدة 24 ساعة (1). بعد انتهاء مدة الحضن تم معاينة الخصائص المظهرية لمستعمرات البكتريا من حيث حجم ولون وقوام المستعمرات البكتيرية المعزولة(13).

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

نميت عزلات البكتريا في 100مل من وسط المرق المغذي وذلك بأخذ مسحة بواسطة ابرة التلقيح ذو العقدة من كل عزلة جرى حفظها ولقح 100مل من وسط المرق المغذي لكل عزلة بكتيرية. حضنت المزارع بدرجة حرارة 35 م° لمدة 24 ساعة بعدها تم تهيئة وسط P.D.A بحجم 100مل موزع على اربعة دوارق زجاجية حجم 250 مل وعقم بالموصدة . اضيف لكل دورق 1مل من لقاح إحدى عزلات البكتريا مزج اللقاح جيدا بعدها صبت مكونات كل دورق في ستة أطباق معقمة وتركت حتى تصلب الوسط بعدها لقحت ثلاثة أطباق بأقراص من وسط الـ P.D.A المنمى عليها الفطر *A. niger* 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 بعدها حسبت أقطار النمو الفطري بأخذ معدل قطرين متعامدين يمران بمركز الطبق لمستعمرات الفطر في جميع الاطباق باستخدام مسطرة (21). حسبت النسبة المئوية للتثبيط باستخدام معادلة Abott(1923) والواردة في كتاب المبيدات (5).

$$\text{نسبة التثبيط (\%)} = \frac{\text{معدل القطر في معاملة المقارنة} - \text{معدل القطر في المعاملة}}{\text{معدل القطر في معاملة المقارنة}} \times 100$$

تشخيص عزلة البكتريا Bp4

شخصت العزلة Bp4 لإظهارها أفضل تثبيط لنمو الفطر *A.niger* اعتمادا على دراسة بعض الصفات المظهرية و المزرعية (13) فضلا عن الاختبارات الكيموحيوية والتي ذكرها كل من Collee واخرون(16) و Macfaddin(23).

تاثير مادة بيكاربونات الصوديوم في نمو عزله البكتريا Bp4

لمعرفة تأثير مادة بيكاربونات الصوديوم($NaHCO_3$) في نمو البكتريا Bp4 والمعزولة من ثمار التفاح تم تحضير لقاح عزلة البكتريا Bp4 كما ذكرت في تقييم العزلة في تثبيط الفطر *A. niger* على وسط P.D.A ثم 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% 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 بخمسة مستعمرات من عزلة البكتريا 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 إعداد المستعمرات ومن ثم حساب إعداد الخلايا البكترية في كل تركيز بتطبيق معادلة Clark (15).

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

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

تم تنمية عزلة الفطر *A.niger* على وسط P.D.A المعقم والمضاف الية المضاد الحيوي تتراسايكلين ولمدة اسبوع بعدها تم اجراء عملية حصاد للابواغ الفطرية وذلك باضافة 10مل من الماء المقطر المعقم لكل طبق بعدها اخذ العالق البوغي وتم حساب إعداد الابواغ للفطر *A.niger* باستخدام طريقة العد بالأطباق فضلا عن استخدام شريحة العد (Haemocytometer) في عد الابواغ ايضا . بعدها ضبط تركيز الابواغ للفطر بحيث كان1 ×10^{6}بوغ/مل بعدها تم تعريض تلك الابواغ لدرجات حرارة (45 و50 و55 و60)م°ولفترات زمنية 1،5، 10/دقيقة لكل درجة حرارة .بعدها 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 (15).

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

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

جدول(1) وصف المعاملات المنفذة لحماية ثمار التفاح في من الإصابة *A.niger*.

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

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

بعدها وضعت الثمارفي اكياس من النايلون ووضعت في درجة حرارة المختبر لمدة أسبوع بعدها حسبت المعاير التالية :

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

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

(34)Tongdee

2- حساب شدة الإصابة

تم حساب شدة الإصابة وفق الدليل المرضي الذي جاء به Al-Rawashdeh و Muwaffaq(8)مع تحوير النسبة المئوية إلى اقطار تقاس ب(ملم) حسب صالح (6)

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

ويتطبيق معادلة Mckinney (26) تم حساب النسبة المئوية لشدة الإصابة

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

3- حساب نسبة التلف الجرثومي

تم حساب نسبة التلف الجرثومي بحسب المعادلة التالية.

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

يوسف (7)

التحليل الأحصائي

طبقت تجربة عامليه بالتصميم تام التعشية (CRD) لدراسة تاثير درجة الحرارة والعامل الحيوي وبيكاربونات الصوديوم في مدى تثبيط الفطر *A. niger* 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.niger* واستعمل البرنامج الأحصائي SAS (2001) في تحليل البيانات .

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لثمار التفاح

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. niger* اعلى نسبة تردد في عينات ثمار التفاح المستورد والمحلي بلغ 81.9% و51.1% (جدول2) هذة النتائج تتفق مع ما توصل الية الجميلي و الموسوي (1) من سيادة الجنس *Aspergillus* في ثمار التفاح المستورد ويعود سبب سيادة الفطر *Aspergillus* spp. في الثمار لانتشاره الواسع في البيئة والناتج عن قدرتة على تكوين إعداد كثيرة من الوحدات التكاثرية المقاومة لظروف البيئية الغير ملائمة اذ تشكل هذه الوحدات التكاثرية (ابواغ لاجنسية) طريقة مهمة لانتشار الفطر في الهواء كون اقطارها اقل من 15 نانوميتر (10) . كذلك قدرتها على النمو في مديات واسعة من الحرارة تتراوح مابين 5– 45م° او اعلى من ذلك (25) كذلك فان لهذه الفطريات القابلية على النمو في مستويات رطوبية منخفضة حيث تسود الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus* spp. عند محتوى رطوبي يتراوح 15– 18% وتلعب الحشرات دورا مهما في احداث الاصابات الفطرية من خلال الجروح التي تحدثها (9) 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 .وجاء الفطر *Penicillium* spp. بالمرتبة الثانية بعد الجنس *Aspergillus* spp. وبنسبة ظهور44% و40.3% على التوالي في التفاح المستورد والمحلي وهو من المسببات الرئيسية لتعفن ثمار التفاح بعد الجني في العديد من معظم دول العالم ويعد من المتطفلات التي تحدث الإصابة من خلال الجروح او من خلال العديسات خاصة عند النضج والتقدم بالعمر او من خلال النسيج المتقرح (35 و 31) .كما ان ابواغ الفطر تبقى حية لمدة طويلة وتبقى من موسم لأخر في الصناديق الملوثة ،كما ينتج الفطر كميات وافرة من الابواغ ، التلوث بهذه الابواغ قد ياتي من مصادر اخرى مثل تربة البستان عند الجني او من الثمار المتعفنة او من الهواء(30) .

جدول(2) النسبة المئوية لتردد الفطريات المرافقة لثمار التفاح المستوردة والمحلية.

الفطريات المعزولة	مصادر الثمار	نسبة التردد (%)
Aspergillus niger	مستورد	81.9
	محلي	51.1
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

اختبار قدرة عزلات الفطر *A. niger*على أنتاج سموم الافلاتوكسين B1 و الاوكراتوكسين

اظهرت نتائج التحليل الكيميائي باستخدام تقنية TLC ان 15عزلة من الفطر *A. niger* من بين 20عزلة (75%) منتجة لسم أفلاتوكسين B_1. وهذة النتائج تتقارب مع نتائج سابقة اشارت إلى ان غالبية عزلات الفطر*A. niger*التي جرى الكشف عنها لها القابلية على انتاج سم افلاتوكسين B_1 (3،2). كما أظهرت النتائج ان 16 عزلة للفطر*A. niger* من مجموع 20 عزلة (80%)كانت لها القدرة على افراز سم الاوكراتوكسين A وقد يعود تباين العزلات في انتاج الاكراتوكسين A الى اختلاف تلك العزلات وراثيا.

جدول(3) قدرة عزلات الفطر *A. niger* على انتاج سم الافلاتوكسين B1 و الاوكراتوكسينA.

ت	عزلة للفطر *A. niger*	القدرة على انتاج الافلاتوكسين B_1	عزلة للفطر *A. niger*	القدرة على انتاج الاوكراتوكسينA
1-	An1	+	An1	+
2-	An2	+	An2	+
3-	An3	+	An3	+
4-	An4	+	An4	+
5-	An5	–	An5	–
6-	An6	–	An6	–
7-	An7	+	An7	+
8-	An8	+	An8	+
9-	An9	+	An9	+
10-	An10	+	An10	+
11-	An11	+	An11	+
12-	An12	+	An12	+
13-	An13	+	An13	+
14-	An14	–	An14	–
15-	An15			–
16-	An16			+
17-	An17			+
18-	An18			+
19-	An19			+
20-	An20			+

+ قدرة العزلة على انتاج السم.

– عدم قدرة العزلة على انتاج السم

تاثير مادة بيكاربونات الصوديوم في نمو عزله 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 (33) في قدرة بيكاربونات الصوديوم في تنشيط

الاحياء المجهرية في المكافحة الإحيائية واختلفت هذه النتائج إذ وجده Karabulut واخرون (22) 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. niger*.

اعطت درجة الحرارة 60 م°اقل نسبة انبات لابواغ الفطر *A. niger* حيث كان عدد الابواغ 3.5×10^7، 2.8×10^7 ، 2×10^7 بوغ/مل على التوالي للمدد 1،5،10 دقيقة بينما كان عدد الابواغ النابتة لاطباق المقارنة 1.92×10^8 بوغ/مل وجاءت بعدها درجة الحرارة 55م° اذ كانت أعداد الابواغ في المدد الزمنية 1،5،10دقيقة 4.3×10^7، 4×10^7، 3.8×10^7بوغ/مل على التوالي.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 (8)

جدول(4) تأثير درجات الحرارة على انبات ابواغ الفطر *A.niger*.

درجات الحرارة(م˚)	المدة الزمنية(دقيقة)	إعداد الابواغ(بوغ/مل)	معدل لوغاريتم
45	1	1.07×10^8	8.02
	5	6.3×10^7	7.79
	10	6×10^7	7.77
50	1	7.5×10^7	7.87
	5	5.5×10^7	7.74
	10	4.3×10^7	7.63
55	1	4.3×10^7	7.63
	5	4×10^7	7.60
	10	3.8×10^7	7.57
60	1	3.5×10^7	7.54
	5	2.8×10^7	7.44
	10	2×10^7	7.30
المقارنة	–	1.92×10^8	8.28

L.S.D(0.05) للتداخل بين درجة الحرارة والزمن =1.5122

*كل رقم في جدول يمثل معدل لثلاثة مكررات.

تقيم فعالية برامج المكافحة المتكاملة في السيطرة على اصابة ثمار التفاح بالفطر *A. niger* .

اظهر برنامج المكافحة المتكاملة والمكون من معاملة الثمار ببيكاربونات الصوديوم وبكتريا *B.polymyxa* والحرارة فعالية عالية في خفض النسبة المئوية لإصابة الثمار بالفطر *A. niger* اذ بلغت 8.33%وبفارق معنوي عن نسبتها في معاملة مقارنة (ثمار معاملة بلقاح الفطر *A. niger* فقط) والبالغة 41.66% في حين بلغت نسبة الإصابة للثمار المجرحة والمطبق عليها نفس البرنامج اعلاه 58% في الوقت الذي بلغت نسبة الإصابة في معاملة مقارنة (91.66) اما بقية البرامج المطبقة على ثمار التفاح السليمة فتراوحت نسبة الإصابة في الثمار بين 21.66% و50% في حين ارتفعت هذه النسب في الثمار المجرحة إلى مدى تراوحت بين 50%و83.33%(جدول4). اكدت نتائج حساب شدة الإصابة في الثمار السليمة ان برنامج المكافحة المتكاملة والمكون من معاملة حرارية +عامل حيوي (*B. polymyxa*)+بيكاربونات الصوديوم هو الأكفأ في خفض النسبة المئوية لشدة الإصابة اذ بلغ المعدل العام 0.3% تلاه البرنامج المؤلف من معاملة حرارية +بيكاربونات الصوديوم وبنسبة شدة إصابة بلغ 2.06% ويلاحظ ان شدة الإصابة ارتفعت إلى 2.96% في الثمار المجرحة المطبق عليها نفس البرنامج اعلاه (ث س+م ح+Bs+An+Bp4)ولكن شدة الإصابة هذه اختلفت معنويا عن جميع البرامج المطبقة الاخرى فضلا عن معاملة السيطرة التي ارتفعت شدة الإصابة في الثمار المجرحة إلى 17.4%(جدول 5) ودعمت نتائج حساب التلف بفعل الفطر *A. niger* كفاءة البرنامج الأول في حال الثمار السليمة (ث س+م ح+Bs+An+Bp4) اذ بلغت نسبة التلف 5.6%مقارنة بنسبة التلف في معاملة السيطرة والتي ارتفعت إلى 32.4% . يلاحظ ان تطبيق هذا البرنامج على الثمار المجرحة لم يكن بالفعالية التي ظهرت عليها في حال تطبيقه على الثمار السليمة اذ بلغت نسبة التلف في الثمار 38.6% مقارنة بنسبة التلف في ثمار معاملة السيطرة والبالغة 55%(جدول 6). يمكن تعليل كفاءة البرنامج المكون من بكتريا *B.polymyxa* وبيكارونات الصوديوم والمعاملة الحرارية في خفض النسبة المئوية للاصابة ونسبة التلف في الثمار المعاملة إلى قدرة البكتريا على تثبيط نمو الفطر *A. niger* حيث تمتلك بكتريا *B.polymyxa* عدة آليات تمكنها من السيطرة على الممرضات والتي تتضمن المنافسة على الحديد والمغذيات وافراز المضادات الحياتية المتعددة المتمثلة polymyxins (30). اذ تفرز مضادات حيوية لها القدرة على تحليل هايفات الفطريات وتثبيط نمو الفطريات قد يعود الى افراز المواد الايضية في الوسط الغذائي والتي تتضمن مضادات حيوية وأنزيمات محللة للجدار الخلوي واليات عمل هذة 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(17). كما ان المعاملة ببيكاربونات الصوديوم تولد وسط قاعدي تفضلة البكتريا ولايفضلة الفطر وما يؤيد هذه النتيجة اختبار الفعالية التضادية بين البكتريا والفطر في اطباق بتري وكذلك معاملة الفطر ببيكاربونات الصوديوم والماء الساخن والتي اظهرت قدرة هذة العوامل على منع نمو الفطر في الاطباق. هذه النتائج تتفق مع ما جاء به Zhou واخرون (35)في تاثير المعاملة بدرجات الحرارة المختلفة على ابواغ الفطر

A. niger و ما وجده Scherm واخرون (31) في قدرة بيكاربونات الصوديوم في تحفيز نمو بعض انواع البكتريا حيث حفزت نمو عزلة بكتريا *Pseudomonas syringae*.

جدول(5) تأثير عدد من برامج المكافحة المتكاملة في معدلات النسبة المئوية للإصابة وشدة الإصابة ونسبة التلف الجرثومي بالفطر *A. niger* في ثمار التفاح .

برامج المكافحة	نسبة الاصابة	شدة الاصابة	نسبة التلف الجرثومي
ث س+م ح +An+Bp4+ BS+	8.33	0.30	5.60
ث س+م ح +An+Bp4+	21.66	3.73	7.78
ث س+م ح +An+ BS+	41.55	2.06	22.44
ث س+ +An+Bp4+ BS+	33.33	2.60	11.33
ث س+م ح +An+	50	4.36	13.44
ث س +An+Bp4+	63	4.23	19.33
ث س +An+BS+	50	2.36	21.53
ث س+م ح +AP+ Bn+	50	6.23	36.33
ث س+ +An+	41.66	4.56	32.40
ث س	0	0	0
ث م+م ح +An+Bp4+ BS+	58	2.96	38.66
ث م+م ح +An+Bp4+	50	6.56	41.66
ث م+م ح +An+ BS+	66.66	5.06	43.66
ث م+ +An+Bp4+ BS+	75	7.46	46.33
ث م+م ح +An+	83.33	6.03	50.66
ث م +An+Bp4+	66.66	6.23	48.54
ث م +An+ BS+	75	10.36	75.33
ث م+م ح +An+ BS+	58.33	8.40	50.66
ث م+ +An+	91.66	17.40	50
ث م	50	7.96	55
L.S.D(0.05)	9.7369	3.3298	13.656

*كل رقم في جدول يمثل معدل لثلاثة مكررات.

المصادر

1- 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.

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

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

4- الجميلي، سامي عبد الرضا علي (1996) المقاومة المتكاملة ضد الاصابة بالفطر *Aspergillus Flavus* والتلوث بالسم افلاتوكسين B1 في حاصل فستق الحقل (*Arachis hypogea* L.) . اطروحة دكتوراه ، قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة . جامعة بغداد.

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

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

7- 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.

8-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.

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

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

11-Booth,C.(1977) Fusarium Laboratory Guide to the identification of the major species common Wealth Mycological Institute,Kew,Surrey,England.58pp.

12-Boyette, M. D.; Schwtheis, J. R. ; Estes, E. A.; Hurst, W. C. and Summer, P. E. (1994) Post harvest cooling and handling of green beans and field peas. AG. 413 pp.

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

14- Cast (2003) Mycotoxins : Risks in plant ,animal and human systems .Task force Report, Ames low,USA,No.139.PP:45-60.

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

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

17-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.

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

19-Ellis, J.; Lawrence, G.and Ayliffe, M. (1997). Advances in the molecular genetic analysis of the flax-flax rust interaction. Annul. Rev. *Phytopathology*. 35: 271–291.

20-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.

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

22-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 .

23-Macfaddin. J.F.(2000) Biochemical test for identification of medical bacteria 3 ed . Lippincott. Williams and Wilkins , Baltimore .USA, 964 pp.

24-Magan,N.and Olsen, M.(2002) Mycotoxin in Food. wood head publishing limited. Cambridge England, 700pp.

25-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.

26-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.

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

28-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.

29-Porter,J.K.(1995).Analysis of endo phyte toxins: Fescue and other grasses toxic to livestock.*G.Animal*.Sci.73:871-880.

30-Phalguni, A.M.; Jayant, M. and Natarajan, K.A. (1996) Modification and biobeneficiation of some oxide Biobeneficiation of bauxite using

Bacillus polymyxa: minerals using *B acillus p olymyxa*. Miner Calcium and iron removal. Intl. J. Mineral Process, Process Metallurgy, 14: 32-39.

31-Scherm,B.;Ortu,G.; Muzzu, A.;Budroni,M.;Arras,G. and Migheli, Q.(2003). Biocontrol activity of antagonistic teasts against *Penicillium expansum* on apple .*J.Plant pathology*.85:205-213.

32-Smilanick, J. L. ; Margosan, D. A. ; Mlikota, F. ; Usall, J. and Michael, I. F.(1999) . Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence commercial postharvest practices on their efficacy . *Plant disease*. 83:139-145 .

33-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.

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

35-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.