عزل وتشخيص الفطر *Alternaria alternata* من بعض حقول الحنطة والتحري عن بعض السموم المنتجة

احمد نوري حميد صباح لطيف علوان أستاذ علاء عيدان حسن أستاذ

كلية الزراعة جامعة الكوفة

المستخلص:

أجريت هذه الدراسة لغرض عزل وتشخيص الفطر *Alternaria alternata* من بعض حقول الحنطة ، والتحري عن بعض السموم التي ينتجها الفطر *A. alternata* ، وأظهرت نتائج المسح الحقلي في بعض حقول محافظة النجف الاشرف ، أن نسبة الإصابة بمرض الندبة السوداء على الحنطة المتسبب عن الفطر *A. alternata* تراوحت بين 13 – 70 % ، توصلت نتائج الدراسة الى تشخيص عزلة عالمية جديدة تابعة للفطر *A. alternate* وتم تسجيلها في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information) , NCBI تحت اسم Najaf وبرقم الادخال KX350052.1 . كما بينت نتائج فحص السموم باستخدام تقنية (HPLC) و (GC–MAS) ان العزلة Najaf تنتج ثلاثة انواع من السموم هي Alteratoxin II (ATX II) و Alternariol (AOH) و Alternariol mono methyl ether (AME).

Isolation and *identification* of the fungus *Alternaria alternata* from some wheat fields and the investigation of some of produced the toxins

Hameed A.N Alwan S.L Hasan A.E

Professor Professor

Faculty of Agriculture ,University of Kufa

Abstract

This study was conducted for the purpose of isolating and ***Identifing*** the fungus *Alternaria alternata* isolation from some wheat fields and investigating some of the toxins produced by the fungus *A. alternata* . The results of some field survey of Najaf province revealed that the incidence of black point disease on the wheat caused by the fungus *A. alternata* ranged between 13 - 70% .The study showed ***identification*** of a new isolate of the fungus *A.alternata* that has been registered in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), under the name: Najaf and under the accession number KX350052.1. The results of the toxicity test using HPLC and GC-MAS showed that the Najaf isolate is able to produce three types of toxins:namely alteratoxin II (ATX II), alternariol (AOH) and alternariol mono methyl ether (AME).

المقدمة:

تعد الحنطة (*Triticum aestivum* L.) نبات حولي من الفصيلة النجيلية، وينتج الحنطة حبوباً مركبة على شكل سنابل، حيث تعتبر هذه الحبوب الغذاء الرئيسي لكثير من شعوب العالم، لا ينافسها في هذا المجال إلا الذرة والأرز، حيث تتقاسم هذه الحبوب غذاء البشر على وجه الأرض، وتزرع الحنطة في أكثر بلاد العالم مرة واحدة في السنة، وفي بعض البلدان تزرع مرتين ، وتزرع الحنطة في كثير من دول العالم بالاعتماد على ماء المطر في السقي، وفي بلدان أخرى تزرع بالاعتماد على الري بالواسطة، كما وتعد الحنطة المصدر الأساسي للطاقة التي يحتاجها الإنسان، وذلك لاحتوائها على نسبة عالية من الكاربوهدرات ، فضلاً عن احتوائها كميات من البروتينات والدهون والعناصر المعدنية والفيتامينات (2).

إن احد أسباب انخفاض إنتاجية محصول الحنطة في العراق يعود إلى انتشار العديد من الآفات الزراعية كالأدغال والحشرات والمسببات المرضية فضلاً عن الأساليب غير العلمية المتبعة في زراعة محصول الحنطة ، وقلة استعمال الأسمدة كماً ونوعاً ،كما يصاب محصول الحنطة بالعديد من مسببات الإمراض النباتية في مراحل نمو النبات المختلفة ومن بين أهمها مرض الندبة السوداء المتسبب عن الفطر *Alternaria alternata* على الحبوب (7) .

تشكل السموم الفطرية مشكلة حقيقية للإنسان لكونها توثر في صحته وحياته عند استهلاكه اي مادة غذائية نمت عليها الفطريات وانتجت عليها سمومها، كما توثر في الحيوانات عند تغذيتها على اعلاف مصابة بالفطريات ، فهي تؤثر بتراكيز قليلة فالسموم Alternariol وAltertoxin II و Alternariol monomethyl ether تحدث تلفا للأنسجة اذا توجدت بالتراكيز 10µg ، 0.25µg و 30µg (8) .

فقد هدفت الدراسة الى عزل وتشخيص الفطر *A.alternata* والتحري عن بعض السموم التي يفرزها في الحبوب المصابة.

المواد وطرائق العمل:

المسح الحقلي لنباتات الحنطة المصابة بمرض الندبة السوداء

تم المسح الحقلي لعشرة حقول مزروعة بالحنطة في محافظة النجف ، بمساحة حوالي 20 دونم للحقول العشرة، خلال ربيع 2015، حيث تم اخذ 30 عينة لكل دونم ، وبطريقة تقاطع الأقطار الوهمية، وبصورة عشوائية وتم حساب النسبة المئوية للإصابة في كل حقل حسب المعادلة التالية:

$$\text{للنباتات المصابة} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{عدد النباتات الكلي}} \times 100$$

عزل وتشخيص الفطر الممرض *A. alternata*

جلبت العينات إلى المختبر وتم غسل السنابل المصابة ، ثم فصلت الحبوب المصابة عن السليمة وتم تعقيمها سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز 2% لمدة دقيقتين ، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم مرتين ، وجففت بورق ترشيح معقم ثم زرعت في أطباق بتري تحوي على P.D.A. بواقع 3 قطع في كل طبق وبثلاث مكررات ، حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 م لمدة 48 ،ساعة ثم تم تنقية الفطر الممرض *Alternaria alternata* على أوساط جديدة بعد فحصهما وتشخيصهما، اعتمادا على الصفات المزرعية والمظهرية وبمساعدة أ.د.صباح لطيف علوان و أ.د.مجيد متعب ديوان وبأتباع المفتاح التصنيفي (5) .

وتم حساب النسبة المئوية لوجود الفطر في الأطباق حسب المعادلة التالية :-

$$\% \text{ لوجود الفطر} = \frac{\text{عدد القطع في الأطباق التي ظهر فيها الفطر}}{\text{العدد الكلي للقطع المستعملة في كل عينة}} \times 100$$

تحضير وسط البطاطا سكروز السائل Potato Dextrose Broth (P.S.B.)

حضر الوسط بأخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة والمقطعة إلى قطع صغيرة وغليها بالماء المقطر بحجم 500 3 سم لمدة 20 –30 دقيقة في دورق، زجاجي وبعد انتهاء مدّة الغليان رشح الخليط في دورق زجاجي بقطعة من القماش الشاش للحصول على الراشح، أذيب 10 غم من سكر السكروز في 500 مل أخرى، ثم أضيف إليها راشح البطاطا وأكمل الحجم إلى واحد لتر ،خلط بصورة جيدة لكي يتجانس ، ثم وزع الوسط في دوارق زجاجية بحسب الحاجة وأغلقت فوهاتها بسدادات من القطن وعقمت بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لتبرد قليلا ، ثم أضيف إليها 100 ملغم / 1لتر من المضاد الحيوي Chloramphinicol، ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال ، استعمل هذا الوسط لتحضير راشح الفطر قيد الدراسة

التشخيص الجزيئي للفطر الممرض *A. alternata* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

استخلص الحامض النووي (DNA) باستخدام العدة (Cat. No: FAPGK100) المجهزة من قبل شركة فافورجين (Favorgen) تايوان– الصين، و بأتباع الخطوات الموصوفة من قبل الشركة المصنعة ، كما تم تقدير تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA وفق الطريقة الموصوفة من قبل (10) قبل استخدامه في تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بعدها تم حفظ الحامض النووي DNA في المجمدة بدرجة حرارة – 20 م° لحين الاستعمال .

استخدام تقنيه تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

اجري اختبار تفاعل البلمرة التسلسلي باستخدام العدة (PCR PreMix, Cat. No. K–2012) المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية المنشأ. نفذ تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم 20 مايكروليتر و الحاوية على

واحد مايكروليتر من كل البادئ الأمامي (ITS1(5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و الخلفي ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGCI-3') (10 pomol) وواحد مايكروليتر من الحامض النووي (30µ /ml). بعد وضع جميع المكونات المطلوبة للتفاعل في الأنبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة و أكمال الحجم بالماء (Nuclease free water) إلى 20 مايكروليتر، تم مضاعفة الحامض النووي للفطر المعزول باستخدام ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل المبينة في جدول .

جدول يبين خطوات و ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) المستخدمة لمضاعفة الحامض النووي للفطر المعزول.

خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل	درجة الحرارة (م°)	الوقت	عدد الدورات
Initial Denaturation	94	5 دقائق	1
Final Denaturation	94	30 ثانيه	35
Annealing	55	50 ثانيه	
Initial Extension	72	1دقيقة	
Final Extension	72	5 دقيقة	
Hold	4		

الترحيل الكهربائي باستخدام الاكاروز الهلامي (Agarose gel electrophoresis)

حضرت طبقة هلام الاكاروز (agarose gel)بعد اخذ وزن 1غم من الاكاروز و أذابته في 100مل من المحلول الدارئ (TBE) Tris boric acid EDTA buffer × 1 و لحين تحول الخليط إلى محلول رائق. أضيف 5 مايكروليتر من صبغة الـ Ethidium bromide بعد انخفاض درجة المحلول الى 45-40 م° ، جهز القالب الخاص بصب الاكاروز و الحاوي على المشط في إحدى نهاياته لعمل حفر داخل طبقة الجل، ثم صب الاكاروز المذاب و الحاوي على صبغة الـ Ethidium bromide و ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة. عند اكتمال تصلب طبقة الاكاروز، رفع المشط بحذر وأعيد القالب إلى مكانه في جهاز الترحيل، ثم أضيف محلول TBE×1 إلى حوض الترحيل (Electrophoresis tank) مغطيا طبقة الاكاروز بارتفاع 1 سم تقريباً. أضيف 10مايكروليتر من الـ DNAالمضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل إلى كل حفرة من حفر طبقة هلام الاكاروز. كما تم إضافة خمسة مايكروليتر من معلم الحامض النووي DNA1 Kbp DNA ladder) (marker إلى الحفرة الموجودة في الجانب الأيسر من العينات المضافة لغرض تحديد أحجام الحامض النووي المضاعف وصلت أقطاب الجهاز بالتيار الكهربائي و شغل مجهز الطاقة Power supply على 100 فولت

و بعد اكمال عملية ترحيل العينات فحصت طبقة هلام الجل الحاوية على حزم الحامض النووي تحت الأشعة فوق البنفسجية(UV trans illumination) و أخذت صور لها.

تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) للعزلات الفطرية المعزولة .

تم مضاعفة حزم الحامض النووي DNA المستخلص من الفطريات المعزولة و بشكل منفرد و ارسال نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR مع البوادئ الامامية و الخلفية التي استخدمت لمضاعفة حزم الحامض النووي الى شركة Microgene الكورية لغرض تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية للحوامض النووية المضاعفة من العزلات الفطرية. لتشخيص الفطر المعزول، ادخل تسلسل الحامض النووي لكل عزلة في قاعدة البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية(National Center for Biotechnology Information , NCBI) باستخدام برنامج الـ BLAST (Basic Local Zheng) Alignment Search .(11)

الكشف عن السموم في رواشح عزلات الفطر *A. alternata* باستخدام تقنية HPLC وتقنية GC–MAS

الكشف عن السم Alteratoxin II (ATX II)

اخذ 100 مل من الراشح الفطري للعينات المحضرة بالطريقة 3– 4 حيث وضع في دورق زجاجي سعه 500 مل ثم اضيف عليه 50 مل من محلول المنظم (بفر) خلات الصوديوم $C_2H_3NaO_2$ ذو تركيز 15% مولاري pH=5 مع التحريك المستمر لمدة 15دقيقة ثم وضع الخليط في قمع الفصل واضيف عليه 150مل من خلات الاثيل $C_4H_8O_2$ (الطور العضوي) واجريت عملية الاستخلاص بالرج لمدة 10دقائق وكررت ثلاث مرات مع مراعات تفريغ الغازات الناتجة كلما ادعت الحاجة الى ذلك ثم سحب الطور العضوي من قمع الفصل ومرر من خلال طبقتين من ورق الترشيح توجد بينهما مادة سلفات المغنيسيوم ($MgSO_4$) لغرض سحب الرطوبة من المحلول ثم وضع المحلول في جهاز المبخر الدوار نوع Gender الماني المنشأ وعلى درجة حرارة 45 مْ وبسرعة دوران 60 دورة/دقيقة لحين الجفاف ثم اذيبت الطبقة المترسبة بإضافة 5مل من الميثانول CH_3OH الخام ورشح المحلول باستخدام ملي بور قياس 0.22 ، ثم أخذ 5 مايكرو مل من المحلول المرشح وحقن في غرفة الحقن لجهاز HPLC, (High–Performance Liquid Chromatography نوع Shimadzu موديل AV–LC10 ذات الضخ المزدوج المكون من مضختين، حيث تم الكشف بالعمود C18–ODS (25cm x 4.6mm x 5um) وكان الطور المتحرك مكون من المواد والنسب بالترتيب MeOH 10 ml و CH_3CN 50ml و DW 40 ml باستعمال كاشف الأشعة فوق البنفسجية (UV (Ultraviolet detector وبطول موجي 280nm ثم اخذت النتائج من خلال جهاز الكمبيوتر المتصل بالجهاز (9). وتم حساب تركيز السموم في عينات راشح الفطر *A.alternata* بواسطة المعادلة الاتية .

$$\text{تركيز النموذج} = \frac{\text{مساحة العينة}}{\text{المساحة القياسية}} \times \text{عامل التخفيف X تركيز المحلول القياسي} \quad (1)$$

الكشف عن السم Alternariol (AOH) و السم(AME) Alternariol monomethyl ether.

اخذت العينات كاملة (الراشح مع الغزل الفطري) كل على حدة واضيف لكل عينة 200مل من الميثانول الخام CH_3OH وخلطت جيدا بوسطة الخلاط الكهربائي ورشح الخليط باستخدام ورق ترشيح من انتاج شركة Sonex وجمع الراشح في دوارق زجاجية كل على حدة ، ثم اخذ من كل دورق 20مل ووضعت في انابيب اختبار سعة 50 مل واضيف اليها 5مل ما الخليط (1% حامض الخليك CH_3COOH + ميثانول CH_3OH) ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3500 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة ، ثم اخذت الطبقة السطحية دون اخذ المادة المترسبة في الانابيب ووضعت في جهاز المبخر الدوار نوع GENDER الماني المنشأ وعلى درجة حرارة 45 مْ وبسرعة دوران 50 دورة/دقيقة لحين الجفاف ، تم اذابة المادة المترسبة بإضافة 5 مل من الخليط ميثانول– ماء بنسبة 1–3 ثم رشح المحلول باستخدام ورق ترشيح قياس 0.22 ، ثم أخذ 5 مايكرو مل من المحلول المرشح وحقن في غرفة الحقن لجهاز HPLC, (High–Performance Liquid Chromatography) نوع Shimadzu موديل AV–LC10 ذات الضخ المزدوج المكون من مضختين، حيث تم الكشف بالعمود C18–ODS (25cm x 4.6mm x 5um) مع مراعاة تعديل درجة الحموضة الى PH =3 بواسطة حامض الفسفوريك H_3PO_4 وكان الطور المتحرك مكون من المواد والنسب بالترتيب MeOH 30 ml و H_2O 68ml و OPA 2 ml باستعمال كاشف الفلورسينس Floeacence detector وبطول موجي 330 nm ثم اخذت النتائج من خلال جهاز الكمبيوتر المتصل بالجهاز، في حين استخدم للكشف عن وجود سم (AME) جهاز GC–MAS (Gas Chromatography Mass (Spectrometry نوع Shimadzu الطور المتحرك هو غاز النتروجين النقي وتم ضبط درجة حرارة عمود الفصل داخل الفرن على 50مْ والكاشف المستخدم هو كاشف شعلة التأين FID ((Flame ionization detector بدرجة حرارة 200مْ (3). وتم حساب تركيز السموم في عينات راشح الفطر *A.alternata* بواسطة المعادلة الاتية .

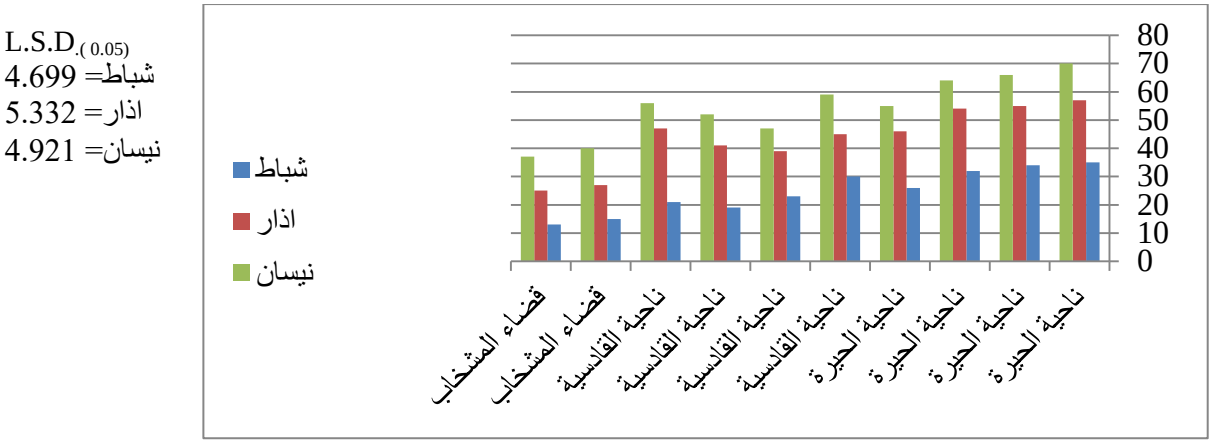
$$\text{تركيز النموذج} = \frac{\text{مساحة العينة}}{\text{المساحة القياسية}} \times \text{عامل التخفيف X تركيز المحلول القياسي} \quad (1)$$

النتائج والمناقشة

المسح الحقلي

الشكل (1) يوضح النسبة المئوية لإصابة في الحقول التي تمت فيها عملية المسح ، ان أعلى نسبة للإصابة في حقل ناحية الحيرة خلال شهر نيسان التي بلغت 70% ،أما اقل نسبة للإصابة فظهرت في حقل قضاء المشخاب خلال شهر شباط التي بلغت 13% على التوالي ، ويعود ذلك إلى إن الفطر *A. alternata* يكون

جراثيم كونيدية تنتشر بكثرة وان الفطر يتحمل الاختلاف في الرطوبة ودرجة الحرارة حيث يمكنه العيش في مدى حراري من 10الى 30 م° كما ان الرطوبة العالية يكون احد الاسباب المهيأة لحدوث الاصابة وان نسبة الاصابة ترتبط ارتباط مباشر بالعوامل البيئية اثناء فترة نضوج الحبوب (4) .



شكل1: المسح الحقلي لنسبة اصابة نباتات الحنطة بمرض الندبة السوداء المتسبب عن الفطر الممرض *Alternaria alternata* في بعض مناطق محافظة النجف .

عزل وتشخيص الفطر *A. alternate*

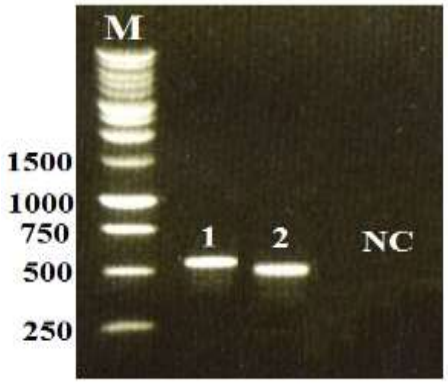
بينت نتائج العزل من بذور نباتات الحنطة التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بالفطر الممرض *A. alternata* إذ تمثلت الإصابة بظهور تلون زيتوني على اغلفة الحبوب المصابة في منطقة الجنين وجزء قليل من السفا المتصل بغلاف الحبوب وعند تطور الاصابة يصيب الفطر حامل الحبوب على السنبلة مما يؤدي الى اتلاف الجزء الموجود اعلى منطقة الاصابة ، اما بالنسبة للإصابة على الحبوب فيظهر تلون بلون الزيتوني الغامق على نهايات الحبوب في منطقة انبات الجنين وقد يمتد التلون على طول قناة الحبة فيسمى باللفحة الداكنة وكذلك يؤدي الى تجعد البذور المصابة ونهايات الحبوب ايضا ، إذ بلغت اعلي نسبة مئوية لظهور الفطر *A. alternata* في حقل ناحية المناذرة إذ بلغت 90.253 % ، أما اقل نسبة مئوية لظهور الفطر *A. alternata* كانت في حقل ناحية القادسية إذ بلغت 58.516 % يعود التذبذب في نسب الإصابة بالفطر إلى اختلاف الظروف البيئية من درجة حرارة ورطوبة ففي الحقول التي تسقي مرتين او ثلاث بالإضافة الى الامطار خلال فترة نمو المحصول تكثر فيها إصابة النباتات بالفطر *A. alternata* وهذا يتفق مع (4).

جدول 1: النسبة المئوية لتواجد الفطر *A. alternata* في حبوب نبات الحنطة على الوسط الزرعي P.S.A. في درجة حرارة 2±25 مْ

ت	اسم الحقل	النسبة المئوية لوجود الفطر *A. alternata*
1	ناحية الحيرة	76.423
2	ناحية الحيرة	68.143
3	ناحية الحيرة	90.253
4	ناحية الحيرة	85.537
5	ناحية القادسية	87.540
6	ناحية القادسية	84.440
7	ناحية القادسية	58.516
8	ناحية القادسية	69.626
9	قضاء المشخاب	62.330
10	قضاء المشخاب	71.220
	L.S.D. 0.05	5.741

التشخيص الجزيئي للفطر الممرض *A. alternata* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

اظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي (DNA) من عزلات الفطر *A.alternata* و تعريضه الى تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) امكانية مضاعفة حزم الحامض النووي الـ (DNA products) DNA و بالحجم المتوقع (500~ قاعدة نيتروجينية) و باستخدام البوادئ الامامية و الخلفية ITS1 و ITS4 (9) .



صورة 1 : حزم الحامض النووي (DNA) المضاعفة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من الفطر *A. alternata* (1) العزلة Najaf. M = 1Kp DNA ladder marker (NC) معاملة مقارنة Negative control

كما بينت نتائج تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية (Nucleotide sequence) لحزم الحامض النووي المضاعفة شكل (1) و باستخدام برنامج BLAST، لمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الاحيائية (NCBI) National Center for Biotechnology Information امريكا والعائدة للعزلات الفطرية نفسها المشخصة في هذه الدراسة، بأن الفطريات المعزولة عائدة للفطر *A. alternata* .

A. alternata **(Najaf)**

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
10         20         30         40         50
ggtaaaagcc ttaatgaatt attcacccct gttttttggg aaatttattt
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
60         70         80         90        100
ttccctggtt ggtttccccc cccattgggc caaacataac cctttggtaa
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
110        120        130        140        150
ttccaatcag cgtcagtaac aaattaataa ttacaacttt caacaacgga
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
160        170        180        190        200
tctcttggtt ctggcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataagtagt
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
210        220        230        240        250
gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa tctttgaacg cacattgcgc
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
260        270        280        290        300
cctttggtat tccaaagggc atgcctgttc gagcgtcatt tgtaccctca
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
310        320        330        340        350
agctttgctt ggtgttgggc gtcttgtctc tagctttgct ggagactcgc
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
360        370        380        390        400
```

شكل 2: التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي (PCR–amplified product) المضاعفة من الفطر *A. alternata* المعزول من بعض حقول محافظة النجف و المشخصة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر *A. alternata* المعزول من حقول محافظة النجف مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الاحيائية (NCBI) ان اعلى نسبه تشابه وراثي كانت مع عزلة للفطر *A. alternata* المعزولة من الصين (Accession number: KX858845.1) و البالغة 95%، في حين كانت اكثرها تباعدا عن العزلات الاخرى العائدة لنفس الفطر *Alternaria alternata* والمعزولة من ايطاليا التي اعطت نسبة تشابه بلغت 91% .

جدول 2: مقارنة بين نسب التشابه النيوكلوتيدي لعزلة الفطر Najaf *A. alternata* والعزلات الاخرى لنفس الفطر المسجلة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الاحيائية (NCBI) .

Fungi	Isolate name	Origin	The most similar sequences in Gen Bank database	
			Gen Bank Accession Number	Sequences similarity (%)
A. alternate	Najaf *	Iraq	KX350052.1	100
A. alternate	aa002	China	KX858845.1	95
A. alternate	SDAU	China	KT238886.1	95
A. alternate	S18 5-13	Argentina	KT274695.1	95
A. alternate	J-1-9 18S	China	KT223345.1	95
A. alternate	SDAU	China	KT218508.1	95
A. alternate	FF2	South Africa	KR912287.1	95
A. alternate	PAK29	Pakistan	KT154015.1	95
A. alternate	CS02	Greece	KP780093.1	95
A. alternate	S4-T-2-8	China	KP216894.1	95
A. alternate	Alter1	Greece	KM220776.1	95
A. alternate	XJ201401	China	KM229697.1	95
A. alternate	SE251FA	Portugal	KM519671.1	95
A. alternate	YJ1 18S	China	KM073919.1	95
A. alternate	S18	Korea	KJ957793.1	95
A. alternate	HMY 2-1	Turkey	KJ739880.1	95
A. alternate	HMS 1-1	Turkey	KJ739879.1	95
A. alternate	BAY 1-1	Turkey	KJ739877.1	95
A. alternate	TAS 2-1	Turkey	KJ739876.1	95
A. alternate	BAS 1-1	Turkey	KJ739875.1	95

A. alternate	ACY 1-2	Turkey	KJ739874.1	95
A. alternate	SDM 2-1	Turkey	KJ739873.1	95
A. alternate	GMY 2-1	Turkey	KJ739872.1	95
A. alternate	BAC 1-1	Turkey	KJ739870.1	95
A. alternate	HMA1B	Mexico	KJ677245.1	95
A. alternate	HM1F	Mexico	KJ677228.1	95
A. alternate	HM1D	Mexico	KJ677226.1	95
A. alternate	HM1B	Mexico	KJ677224.1	95
A. alternate	18S	India	KJ605840.1	95
A. alternate	TD1 18S	India	KJ609133.1	95
A. alternate	mirt5 18S	Italy	KJ590129.1	95
A. alternate	PB-17	India	JQ625591.1	95
A. alternate	4hao 18S	China	JF835811.1	95
A. alternate	4h 18S	China	JF835809.1	95
A. alternate	ZZS4404	China	JF973293.1	95
A. alternate	ZP-14	China	HQ845044.1	95
A. alternate	EN31	India	HQ343446.1	95
A. alternate	UASWS0562	Switzerland	HQ166336.1	95
A. alternate	18S	Italy	HQ176411.1	91
A. alternate	SCMW	India	HM150734.1	95

***عزلة الفطر *A. alternata* المشخصة في هذه الدراسة.**

الكشف عن السموم في رواشح عزلات الفطر *A. alternata* باستخدام تقنية HPLC وتقنية GC-MAS

.

بينت نتائج تحليل HPLC و GC-MAS الموضحة في جدول (3) و المخططات ادناه بأن للفطر *A. alternata* له القدرة على افراز ثلاث أنواع من السموم وهي Alteratoxin II (ATX II) و Alternariol (AOH) و Alternariol monomethyl ether (AME) ، حيث كان أعلى تركيز للسم ATX II والبالغ 1.403 µg /ml واقل تركيز سجل للسم AOH اذ بلغ 0.129 ml/µg .

جدول (3) تقدير سموم Alteratoxin II (ATX II) و Alternariol (AOH) و Alternariol monomethyl ether (AME) التي ينتجها الفطر *Alternaria alternata* باستخدام تقنية HPLC وتقنية GC–MAS .

المركب	زمن الاحتجاز	المساحة القياسية	مساحة العينة	التركيز (µg /ml)
ATX II	9.330	23430	65750	1.4031
AOH	4.385	68140	17933	0.1315
AME	1.923	25529	64460	1.2624

المصادر:

1. **Akiyma, H. and D.Y. Chen.1999 .** " simple HPLC determination of aflotoxin B1.B2.G1.G2 in nut and corn , J. of food Hygienic scocity of Japan . 37(4):195-201.
2. **Al-Melegy, Mohamed Abdel-Sattar and Zakia Mahmoud Hassan. 1992.** Wheat Diseases, Riyadh. 215 pages.
3. **Fente C. A., J. Jaimez, B. I. Vázquez, C. M. Franco and A. Cepeda . 1998.** Determination of alternariol in tomato paste using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection . Paper 8/04587 .
4. **Fernandez, M.R. and R.L. Conner.2011 .** Black point and smudge in Wheat. Prairie Soils and Crops Journal **,** Insects and Diseases , Volume 4.pages 158-164 .
5. **John, I. Pitt and Ailsa D. Hocking. 2009.** Fungi and food spoilage. Pages 60-63 Primary Keys and Miscellaneous Fungi , *Alternaria alternate*. Australia , Library of Congress Control Number: 2009920217.
6. **Pfeiffer, E., Hildebrand, A.A., Becker, C., Schnattinger, C., Baumann, S., Rapp, A., Goesmann, H., Syldatk, C., Metzler, M. 2010.** Identification of an aliphatic epoxide and the corresponding dihydrodiol as novel congeners of zearalenone in cultures of Fusarium graminearum. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 12055–12062.
7. **Solanki .V.A, N. Augustine and A.A. Patel . 2006.** Impact of black point on wheat trade and its management. Wheat Research Station, S.D. Agricultural University, Vijapur 382 870.
8. **Stefanie C.Fleck , Britta Burkhardt1, Erika Pfeiffer and Manfred Metzler . 2012 .** Altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand

breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. Toxicology Letters, 214, 27-32.

9. **White, T.J.; T. Bruns, S.; Lee and Taylor J.W.1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
10. **William W. W; Mackey K. and Chomczynski P. 1997.** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity . Bio techniques 22 : 474 – 481.
11. **Zheng, Z. X. and Shetty, K.2000.** Enhancement of Pea (*Pisum Sativum*) Seedling vigor and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichodema* spp. Process Biochemistry. 36 (1 - 2): 79 - 84.