دراسة النشاط الإنزيمي لبعض أنواع الجنس *Alternaria* وتأثير بعض العوامل البيئية على نموها القطري

زينب خلف عبد الله[1]، عبدالحافظ الدبون[2]، باسل عبدالزهرة عباس[3] وتوفيق محمد محسن[1]

1 قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة البصرة، العراق؛ 2 مركز علوم البحار، قسم الأحياء البحرية، جامعة البصرة، العراق؛ 3 قسم الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة البصرة، العراق

الخلاصة. تم دراسة النشاط الانزيمى لتسعة انواع من الفطر *Alternaria* (*A. alternata* و*A. citri* و *A. chlamydospora* و *A. longipes* و *A. petroselini* و *A. Raphani* و *A. pluriseptata* و *A. triticina* و *A. tenuissima*) اذ اعطى معظمها نشاطا انزيميا للانزيمات :السليوليز واللاييز والبروتيز و الاميليز و البكتنيز والفينول اوكسيديز. كما تم دراسة تاثير بعض العوامل البيئية فى النمو الشعاعى للانواع المعزولة، فبخصوص تاثير درجة الحرارة نمت جميع الانواع تحت المدى الحرارى (15–35) درجة مئوية وكانت درجة الحرارة المثلى 25 – 30 °م وتوقف النمو بدرجة حرارة 10 و40°م كما اظهرت انواع الجنس *Alternaria* المدروسة تحملا لكلوريد الصوديوم حتى التركيز 10% وتوقف النمو لجميع الانواع عند التركيز 12.5%0 كما نمت جميع العزلات ضمن مدى دالة حامضية تراوحت بين 3– 9 و كانت المثلى 6– 7.

الكلمات المفتاحية: *Alternaria*، النشاط الانزيمى، العوامل البيئة.

المقدمة

يعود الجنس *Alternaria* الى الفطريات الناقصة Fungi imperfecti وذلك بسبب عدم إنتاجه لأطوار جنسية، ومن الصفات المهمة التي تستخدم لتشخيص هذا الجنس هو تكوينه كونيدات متعددة الخلايا ذات تقسيمات طولية وعرضية بشكل مفرد او على هيئة سلاسل. كونيدات هذا الفطر تحوى صبغة الميلانين التي تكسبها لون بني مائل إلى السواد، وتكمن أهمية هده الصبغة فى إعطاء تحمل للكونيدات الفطرية التي تمثل درع واقي ضد البيئات القاسية والظروف غير الملائمة (18 و26). إن الـ *Alternaria* من أهم الفطريات المحمولة بالهواء والتي تتواجد بنسبة كبيرة في مختلف الأماكن في العالم (cosmopolitan). إن معظم أنواع هدا الجنس التي تزيد على 70 نوعا تعيش كمترممات نباتية وتتميز بإنتاج العديد من السموم الفطرية المتخصصة Host Specific Toxins التي تكون مسؤولة عن أمراض متعددة للنباتات (24). إن هذه السموم عبارة عن مركبات كيميائية أيضية ثانوية ذات وزن جزيئي واطئ لا يحتاجها الفطر في النمو والتكاثر (6). ان الامراض التى يسببها الفطر *Alternaria* تعتمد على انتاج انزيمات خارج خلوية (extracelluar enzymes) تعمل على تحليل معقد البكتين فى جدار الخلية النباتية خلال عملية الإصابة إذ وجد Isshikie واخرون (17) ان امراضية الفطر *A. citri* تعتمد على فعالية انزيم Endopoly–galactosidase في عملية الاصابة.

المواد وطرائق العمل

العزلات الفطرية: تم عزل وتصنيف بعض انواع الفطر *Alternaria* من عينات مختلفة من النباتات الملحية والفواكه والخضروات وحبوب الحنطة والهواء والتربة من مناطق مختلفة من محافظة

البصرة خلال الفترة من تشرين الاول 2004– شباط/ 2005 (3).

دراسة النشاط الإنزيمي Enzymatic activity:

تم اختبار مدى قابلية أنواع الفطر *Alternaria* (*A. alternata* و*A. citri* و*A. chlamydospora* و *A. longipes* و*A. petroselini* و*A. pluriseptata* و *A. Raphani* و*A. triticina* و*A. tenuissima*) على إنتاج إنزيمات خارج خلوية Extracellular enzymes بإتباع طرق العمل الموصوفة لكل انزيم: وهى السيليوليز cellulose (35) واللايبيز Lipase (27) والبروتيز Protease (32) والاميليز Amylase (14) والبكتنيز Pectinase (15) والفينول اوكسيديز Phenol oxidase (14) وذلك على أوساط زرعيه صلبة خاصة بكل انزيم والموصوفة من قبل الباحثين.

تأثير بعض العوامل البيئية فى نمو الفطر:

Effect of some environmental factors on fungal growth

تأثير درجات الحرارة فى نمو عزلات الفطر *Alternaria*:

لغرض دراسة تأثير درجات الحرارة فى نمو عزلات الفطر تم نقل قرص من مزرعة نقية للفطر بواسطة ثاقب الفلين معقم(cork borer) قطره 5 ملم إلى مركز أطباق بترى معقمة قطرها 9 سم حاوية على وسط PDA وحضنت الأطباق تحت درجات حرارة 10 و15 و20 و25 و30 و35 و40°م وبعد مرور أسبوع من الحضن تم قياس قطر النمو الشعاعي Radial Growth للفطر بوحدات السنتمتر باخذ معدل قطرين متعامدين يمران بمركز المستعمرة.

تأثير التراكيز الملحية فى نمو عزلات انواع الفطر *Alternaria*:

تم تحضير أوساط زرعيه (PDA) تحوي تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم (2.5 و5 و7.5 و10و12.5) %. تركت معاملة المقارنة بدون إضافة الملح إلى الوسط الزرعى PDA ولقحت الأوساط من مزارع الفطر النقية وبالأسلوب السابق حيث عمل مكرران لكل نوع وحضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25 ± 1 °م وبعد مرور أسبوع تم قياس قطر النمو ألشعاعي للفطر كما مر سابقا.

تأثير الأس الهيدروجيني pH فى نمو عزلات الفطر *Alternaria*:

تم تحضير أوساط زرعية (PDA) ذات pH مختلفة (3 و4 و5 و 6 و7 و8 و9) اذ عدلت الاسس الهيدروجينية باضافة بضع قطرات من حامض الهيدروكلوريك (1N) للحصول على الوسط الحامضى وبضع قطرات من محلول هايدروكسيد الصوديوم (1N) للحصول على الوسط القاعدى قبل التعقيم، لقحت الأوساط من مزارع الفطر النقية وبالأسلوب نفسه بحيث عمل مكرران لكل نوع، حضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25 ± 1°م وبعد مرور أسبوع تم قياس قطر النمو الشعاعي للفطر.

التحليل الاحصائي

استخدم تحليل التباين ANOVA وباستخدام برنامج SPSS (V.12) (2) وتم مقارنة نتائج التحليل الاحصائي بالاعتماد على الراوي وخلف الله (1).

النتائج

النشاط الأنزيمي:

تم اختبار الأنواع المعزولة والعائدة للفطر *Alternaria* لمعرفة الفعالية الأنزيمية فيها وهي أنتاج أنزيمات السيليوليز Cellulase واللايبيز Lipase والبروتيز Protease والأميليز Amylase والبكتينيز Pectinase والفينول

اوكسيديز Phenol oxidase وبصورة عامة أظهرت جميع الأنواع المعزولة خلال الدراسة كشفاً موجباً للأنزيمات المختبرة على أوساط زرعية صلبة ولوحظ تفاوت في حجم هذا النشاط واختلاف في أقطار المستعمرات واستنادا على التحليل الاحصائي عند مستوى احتمالية (0.05) (ملحق 1 وجدول 1).

فيما يخص أنزيم السيليوليز فقد أعطت جميع الأنواع المختبرة نمواً جيداً على وسط الاختبار الصلب الحاوي على السيليلوز الذائب Carboxy (Methyl Cellulose) وأظهرت جميعها اختبار موجب بتكوينها للمنطقة الشفافة حول المستعمرة الفطرية على الوسط الزرعي CMC الصلب. لقد أعطت الأنواع *A. alternata* No.1 و *A. tenuissima* و *A.petroselini* و *A.triticina* أعلى نشاط انزيمي حيث بلغ 7 ملم أما أقل نشاط أنزيمي فكان 4 ملم سجله النوعان *A. citri* و *A. pluriseptata*. أما بالنسبة لأنزيم اللايبيز فقد أظهرت جميع الأنواع المختبرة قدرة على أنتاج الأنزيم لكن بدرجات متفاوتة فقد أعطت الأنواع *A. alternata* No.1 و *A. Alternata* No.2 و *A. triticina* و *A. petroselini* فعالية عالية لهذا الأنزيم وكانت (10 و 10 و10 و9) ملم على التوالي أما أقل نشاط أنزيمي فكان 2 ملم سجله النوعان *A. chlaydospora* و *A. raphani*. وفيما يخص فعالية أنزيم البروتيز فقد أظهرت جميع الأنواع فعالية عالية لهذا الأنزيم حيث تتراوح مقدار النشاط الأنزيمي من20-25 ملم عدا النوعان *A. pluriseptata* و *A. triticina* حيث أظهرت أقل نشاط إنزيمي قدره 15 ملم.

أما أختبار انتاج الأنواع المعزولة لأنزيم الأميليز فقد أظهر النوع *A. tenuissima* نشاطاً إنزيمياً عاليا قدره 25 ملم، أما أقل نشاط إنزيمي فكان 5 ملم سجله النوعان *A. pluriseptata* و *A. longipes*.

بالنسبة لقدرة الأنواع المعزولة في إنتاج إنزيم البكتينيز Pectinase فقد أظهرت جميع الأنواع قدرة على انتاج انزيمي البكتينيز (Pectatelyase و polygalacturonase) اذ أعطى النوع *A. tritcina* قابلية عالية على افراز انزيم Pectatelyase بلغت 15 ملم يليه النوع *A. citri* حيث سجل نشاطاً انزيمياً قدره 10 ملم أما أقل نشاط انزيمي فكان 3 ملم وسجله النوع *A. raphani* وفيما يخص فعالية انزيم Polygalacturonase فقد أظهر النوع *A. citri* فعالية عالية لهذا الأنزيم حيث سجل نشاطاً قدره 12 ملم عند pH 5 بينما سجل النوع *A. raphani* اقل نشاط انزيمي بفعالية قدرها 3 ملم. أما اختبار انتاج الأنواع المعزولة لأنزيم الفينول اوكسديز فلم تظهر الأنواع *A. raphani* و *A. pluriseptata* و *A. longipes* فعالية انزيمية (عدم ظهور منطقة بنية اللون)، أما الأنواع الأخرى فقد أعطت أختباراً موجباً لإنزيم الفينول اوكسديز، وقد أظهر كل من *A. chlamydospora* و *A. tenuissima* و *A.pluiseptata* فعالية عالية لهذا الإنزيم وكانت 14 و12 و12 ملم على التوالي أما أقل نشاط انزيمي فقد أظهره كلاً من *A. triticina* و *A. citri* وكان 1 و2 ملم على التوالي (جدول 1).

جدول (1). النشاط الانزيمي لبعض انواع الفطر *Alternaia*.

الانواع المعزولة	انزيم السيليوليز		انزيم اللاييز		انزيم البروتيز		انزيم الاميليز		انزيم البكتينيز		انزيم الفينول اوكسيديز	
	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي mm
Alternaria alternata No.1	**49**	**6**	**30**	**10**	**35**	**25**	**55**	**10**	**55**	**5**	**43**	**7**
A. alternata No.2	**38**	**7**	**29**	**10**	**39**	**20**	**50**	**8**	**42**	**5**	**45**	**6**
A. tenuissima	**39**	**7**	**32**	**7**	**35**	**25**	**20**	**25**	**56**	**4**	**50**	**12**
A. chlamydospora	**30**	**5**	**20**	**2**	**35**	**25**	**50**	**10**	**40**	**5**	**35**	**14**
A. citri	**32**	**4**	**31**	**3**	**35**	**20**	**57**	**12**	**35**	**12**	**22**	**2**
A. petroselini	**36**	**7**	**28**	**9**	**30**	**25**	**50**	**10**	**45**	**10**	**48**	**12**
A. raphani	**34**	**5**	**29**	**2**	**35**	**25**	**40**	**10**	**52**	**3**	**40**	-
A. pluriseptata	**46**	**4**	**30**	**7**	**36**	**15**	**60**	**5**	**32**	**4**	**43**	-
A. longipes	**36**	**6**	**31**	**4**	**32**	**22**	**55**	**5**	**50**	**7**	**35**	-
A. triticina	**37**	**7**	**29**	**10**	**35**	**15**	**50**	**10**	**40**	**11**	**50**	**1**

تأثير بعض العوامل البيئية فى النمو القطرى لأنواع الفطر *Alternaria*:

تم دراسة تأثير بعض العوامل البيئية وهي درجة الحرارة والملوحة والرقم الهيدروجيني فى نمو انواع الفطر *Alternaria* من خلال قياس معدل النمو القطري (radial growth) لمستعمرات الفطر.

تأثير درجة الحرارة فى النمو القطري للمستعمرة :

لوحظ ان الفطر يستطيع النمو ضمن مدى حراري من 15 – 35°م وان درجة الحرارة المفضلة لنمو جميع الأنواع هي 25 و 30°م وعند رفع درجة الحرارة إلى 40 درجة مئوية توقف الفطر عن النمو وكذلك عند خفض درجة الحرارة تحت 15 درجة مئوية. اظهر النوع *A.triticina* أعلى نمو قطري مقارنة ببقية الأنواع والتى كان اقلها نموا النوع *A. chlamydospora* (جدول 2).

تأثير ملح كلوريد الصوديوم فى النمو القطري لانواع الفطر *Alternaria*:

إن زيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم قلل من معدل النمو الشعاعي للأنواع المختبرة إذ أعطت جميع الأنواع المختبرة نمو جيدا عند التركيز 2.5% وعند رفع التركيز إلى 5% لوحظ ان قطر المستعمرة نقص واستمر هدا النقصان عند التراكيز (7.5 , 10) % لحين توقف النمو عند التركيز 12.5%، وأظهرت الدراسة ان النوع *A.chlamydospora* كان أكثر الأنواع مقاومة للزيادة في تركيز الملح وان النوع *A. raphani* الاقل تحملا(جدول 3).

تأثير الأس الهيدروجيني فى النمو القطري لانواع الفطر *Alternaria* :

لوحظ إن أنواع الفطر *Alternaria* تستطيع النمو عند جميع الأرقام الهيدروجينية المختبرة (3–9) لكن بدرجات متباينة، وان الرقم الهيدروجيني الأمثل هو 6 –7 ان اظهر النوع *A. triticina* اعلى نموا قطريا بلغ 8.5 ملم عند الاسين الهيدروجينيين 6 و7 بينما اعطى النوع *A. raphani* أقل نمو قطرى بلغ 2 ملم عند الاس الهيدروجينى 3 (جدول 4).

جدول (2). تأثير درجة الحرارة على النمو الشعاع للفطر *Alternaria*.

النوع الفطري	معدل النمو الفطري (سم) / درجة الحرارة (°م)						
	10	15	20	25	30	35	40
Alternaria alternata no.1	00	2.6	6.2	7	7	3.2	00
A. alternata no.2	00	2.5	6	7	7.5	3.3	00
A. chlamydospra	00	2.2	5.6	6	6	1	00
A. citri	00	3	5	8	8	2.5	00
A. longipes	00	2.3	4.3	7	8	2.5	00
A. Petroselini	00	3.5	6	8	8	2.5	00
A. Pluriseptata	00	3	5	6	7	2	00
A. raphani	00	3.5	4.4	6	7	1.6	00
A. tenuissima	00	2.3	5	6.2	6.6	3	00
A. tritricina	00	2.6	3	9	9	1.5	00

جدول (3). تأثير ملح كلوريد الصوديوم فى النمو الشعاعي للفطر *Alternaria*.

النوع الفطري	معدل النمو الفطري (سم)/ تركيز ملح NaCl				
	2.5%	5%	7.5%	10%	12.5%
Alternaria alternata no.1	6.5	4	3.5	3	0
A. alternata no.2	7	4.3	3.5	3	0
A. chlamydospora	7.5	5.8	5	4	0
A .citri	6	3	2	1.5	0
A .longipes	6	4.5	4	3.2	0
A .petroselini	6	4.5	3.2	2.7	0
A .pluriseptata	7.5	3.8	3.5	2.8	0
A. raphani	6	2.5	1.5	1	0
A. tenuissima	6.5	3.6	3	2.7	0
A. tritricina	7	4.3	3.3	3	0

جدول (4). تأثير الأس الهيدروجيني على النمو الشعاعي للفطر *Alternara*.

الاس الهيدروجيني / النوع الفطري	3	4	5	6	7	8	9
Alternaria alternata no.1	3	7.3	8	8	8	6.8	5
A. alternata no.2	3.5	7	8	8	8	5.2	4.4
A. chlamydospora	2.2	5.5	5	6	6.5	6	5
A. citri	3.5	7	7.5	8	8	5.8	4.2
A. longipes	4.2	8	8	8	8	5.5	4
A. petroselini	4	8	8	8	8	5.5	4.6
A. pluriseptata	3	6.5	6.6	7	7	5	4
A. raphani	2	7	7	7	7	5.5	4.7
A. tenuissima	2.2	7.3	7.3	8	8	5	4.5
A. triticina	3.5	7	8	8.5	8.5	6	4.6

المناقشة

يعد الجنس *Alternaria* من الأجناس الواسعة الانتشار في الطبيعة، اذ تكون بعض أنواعه مترممة في التربة أو على أنسجة النباتات الميتة، وأن غالبية أنواع هذا الجنس تكون ممرضات نباتية وتسبب مشاكل اقتصادية للكثير من المحاصيل في مختلف بقاع العالم.

يضم هذا الجنس عدة أنواع تصل إلى 70 نوعا ولقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن *A. alternata* كان أكثر الأنواع انتشاراً حيث تم عزله من جميع المصادر وخصوصاً النباتات الملحية ويعتبر من الأنواع السائدة وقد يعود سبب انتشار هذا النوع إلى قدرته على إفراز العديد من الأنزيمات كما أظهرت ذلك نتائج الدراسة الحالية وأيضا قابليته على تحمل الملوحة والظروف القاسية وهذا يتفق مع ما ذكره Gessner (14) و Pugh (25) و Booth (8) واخرون. وذكر Thomma (33) إن *A. alternata* من الأنواع المنتشرة والتي تضم عدة سلالات مختلفة من الناحية الوراثية ويتم تصنيف هذا النوع في بعض الأحيان حسب النبات الذي يصيبه.

إن دراسة العوامل البيئية المؤثرة فى الكائن المجهري تظهر تغيرات معقدة في تنظيم وتركيب الخلية نتيجة للتعرض إلى عوامل بيئية مجهدة مثل ارتفاع أو انخفاض درجات الحرارة والتغير في الأس الهيدروجيني أو ارتفاع تركيز الأملاح وبالرغم من هذا التغير فيمكن للكائن المجهري المحافظة على الفعاليات الفسلجية في داخل الخلية وبذلك يستطيع المقاومة والنمو إلى مدى معين عند التعرض إلى التغيرات في العوامل البيئية (7).

وبخصوص تأثير درجة الحرارة تستطيع الفطريات النمو تحت درجات حرارة واسعة وتعتبر درجة الحرارة من العوامل البيئية المهمة لأنها تحدد النمو المثالي للفطر. لقد أظهرت النتائج أن فطر الـ *Alternaria* يستطيع النمو ضمن مدى حراري من 15 – 35 درجة مئوية وان درجة الحرارة المثالية لمعظم الأنواع كانت25 و30°م حيث أعطت أكثر نمو لهذا الفطر عند ارتفاع درجة الحرارة إلى 40°م.

وفي دراسات مماثلة على فطريات أخرى وجد Alam (4) واخرون ان درجة الحرارة من25 إلى 30°م هي درجة مثالية لنمو الخيوط الفطرية

للفطـر *Botryodiplodia theobromaepat* حيث بلـغ قطر المستعمرة 78 إلى 90 ملم على وسط PDA، ولـوحظ انـه لا يوجـد نمـو فـي درجـة حرارة 10 و45°م وإنما يكون النمو والتبوغ من 15إلى 40°م وأعلى عدد للأبواغ سجل في درجة الحرارة 30 °م وقد أظهرت الدراسات ان بزيادة قطر المستعمرة يزداد عدد الأبواغ وهذا يتفق مع نتائج الدراسـة الحاليـة إلا أن بعـض الأنـواع مثـل *A. chlamydospora* و *A. raphani,* تكون أعداد قليلة من الأبواغ على الرغم من ان قطر المستعمرة يكون جيد النمو(3).

فـي الدراسـة التـي أجراهـا Hussain (14) واخرون وجدوا ان الفطر *Sclerotium rolfsii* Sacc. ينمو بدرجـة حرارة من 10 إلى 30 °م اما الدرجة المثالية للنمو فهي 25°م حيث اعطى الفطر نمو مثالي إذ بلـغ قطر المستعمرة 9 سم بينمـا فـي درجـة الحرارة 20°م بلـغ قطر المستعمرة 6 سم بعد مرور أسبوع من الحضن، بينما لم ينمو الفطر في درجة حرارة 5 و35 °م0 لقد أوضـح Mello (20) واخرون ان درجة الحرارة الملائمة لنمو وتبوغ الفطر *Colletotrichum gloeosporioides* هـي 20 إلـى 25°م بينما درجـة الحرارة فوق 30°م لها تأثير مثبط على نمو الفطر.

أما عن تأثير ملح كلوريد الصوديوم NaCl فى نمو أنواع الفطر *Alternaria* فقد بينت النتائج إن زيـادة تركيـز الملـح يـؤدى الـى تقليـل معـدل النمـو الشعاعي وقد أعطت جميع الأنواع نموا جيدا عند تركيز 2.5% حيث لا تؤثر هذه النسب من الملح علـى معـدل النمـو. عنـد اسـتمرار ارتفـاع تركيـــز الملح يبدأ النقصـان فـي معدل النمـو حتـى يتوقف عنـد تركيـز 12.5%0 لقد ذكـــر Malik (19) واخـرون ان الأمــلاح عنـد إضـافتها إلـى الوسـط الزرعـي تعمـل علـى اسـتهلاك المـاء الـذي تحتاجـه خلايـا الكـائن المجهري للنمـو وفـي التراكيـز العاليـة من الأملاح يصبح الوسط الغذائي للكائن غنيا جدا بجزيئات الملح مما يجعل تلامس جزيئات الماء مع خلية الكائن عملية صعبة أو مستحيلة وبذلك يتوقف النمـو عنـد التراكيـز الملحيـة العاليـة. لقـد أظهـرت النتـائج أن *A. chlamydospora* كانـت أكثـر الأنـواع مقاومــة للزيــادة فــي تركيــز ملــح كلوريــد الصوديوم NaCl وعند جميع التراكيز قد يعود ذلك إلى أن النوع *A. chamydospora* بيئتها الأصلية تربــة صــحراوية ملحيــة والعزلــة المســتخدمة فــي التجارب عزلت من تربة صحراوية ولذا أظهرت هذا التحمل الواسع للأملاح ولوحظ ان بقية الأنواع يقل فيها معدل النمو القطري بزيادة تركيز الأملاح.

عموما تظهر الفطريات استجابات مختلفة للتغير في العوامل البيئية ففي دراسة أجراها Attaby (5) وجد ان هناك نقصان في كمية الأحماض الأمينية للفطر *Penicillium chrysogenum* ترافق الزيادة فى تركيز ملح كلوريد الصوديوم NaCl عدا بعض الأحماض الأمينية حيث لوحظ ازدياد في كميتها، وكذلك لوحظ زيادة في كمية البروتين وكمية الكليسيرول عند ازدياد التركيز الملحي إلى 15%.

في دراسة أجراها Muhsin (20) وجد ان الفطر *A. alternata* يعطي أعلى مستوى للنمو عند تركيز 2 غم/ لتر من ملح كلوريد الصوديوم و 6 غم/ لتر من ملح كلوريد البوتاسيوم أما نترات الصوديوم فاحتاج منها إلى 2 غم / لتر وقد تم عزل *A. alternata* المستخدمة في الدراسة الحالية من نباتات ملحية Halophytes تمتاز باحتوائها على مستويات عالية من الأيونات الملحية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والكلورايد وهذا يتفق مع الدراسة التي أجراها Muhsin and Booth (23) حيث وجدا أن الفطر *Alternaria* يرتبط ارتباطا كبيراً بالنباتات الملحية حيث تم عزل عدة أنواع لهذا الجنس من النباتات الملحية في أهوار كندا0 كما

ان الفطريات لها القدرة على النمو في مدى واسع من الأس الهيدروجيني (6) وتظهر الدالة الحامضية تأثيرها فى الخلية عن طريق مسخ الأنزيمات كما تعمل على تقليل حامضية السايتوبلازم في الخلية عن طريق زيادة نفاذية البروتونات (7).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أنواع فطر *A. alternata* تستطيع النمو في جميع الأرقام الهيدروجينية المختبرة وهي من 3-9 ويدل ذلك على المدى الواسع من الأس الهيدروجيني الذي يستطيع هذا الفطر النمو فيه، كما ان النمو كان جيدا عند الأرقام 4 و5 و6 و7 أما الأس الهيدروجيني المثالي فكان 6 و7 حيث سجل فيه اعلى نمو شعاعي ولجميع العزلات. أما عند ارتفاع الأس الهيدروجيني إلى 8 و9 قل عدد الأبواغ وكذلك عند انخفاض الأس الهيدروجيني إلى 3 حيث تصبح البيئة غير ملائمة للنمو مثل عمل الأنزيمات ونفاذية الغشاء البلازمي وهذا يتفق مع دراسة Wheeler (34) واحرون اذ ذكروا ان الفطريات لها القدرة على العيش فى مدى واسع من الاس الهيدروجينى اذ تظهر الدالة الحامضية تاثيرها على الخلية عن طريق مسخ الانزيمات كما تعمل على تقليل حامضية السايتوبلازم فى الخلية عن طريق زيادة نفاذية البروتونات (7).

المصادر

1- الراوي، خاشع محمود وخلف الله ، محمدعبد العزيز (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ،جامعة الموصل. 487 صفحة.

2- الهيتي، صلاح الدين حسين (2001). الاساليب الاحصائية في العلوم الادارية (تطبيقات باستخدام SPSS). دار وائل للطباعة والنشر، عمان. 557 صفحة.

3- الدبون، عبدالحافظ؛ عباس، باسل عبد الزهرة وعبد الله، زينب خلف (2010). عزل وتشخيص بعض انواع الجنس *Alternaria* من مصادر مختلفة ودراسة بعض العوامل البيئية المؤثرة على تبوغه. مجلة ابحاث البصرة (العلميات). 36 (6): 50-59.

4.Alam, M.S.; Begum, M.; Sarkar, M.A. and Devi, M.R. (2001). Effect of temperature, Light and media on growth, sporulation, formation of pigments and pycnidia of *Botryodiplodia theobromae* pat. Pakistan J. Biol. Sci., 4: 1224-1227.

5.Attaby, H.S.H. (2001). Influence of salinity stress on the growth, biochemical changes and response to gamma irradiation of *penicillium chrysogenum*, Pakistan J. Biol. Sci., 6: 1426-1430.

6.Ballio, A. (1991). Non-host selective fungal phytotoxins biochemical aspects of their action. Experientia, 47: 783-790. (Abstract).

7.Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperature, weak acid preservative, Low pH, and osmotic stress: review. Comprehensive Review in food Sci. and food Safety, 3: 1-20

8.Booth, T.; Gorrie, S and Muhsin, T.M. (1988). Lift strategies among fungal assemblages on *Salicornia europaea* agg. Micologia, 80: 176-191.

9.Carzaniga, R.; Fiocco, D.; Bowyer, P. and Oconnel, R. (2002). Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage

(1997). The Melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin deficient mutant of *magnaporthe grisea.* Mol. Plant Microb. Interact., 10: 446-453.

19.Malik, K.A. Kauser, and Azam, F. (1980). Effect of sodium chloride on the cellulolytic ability of some *Aspergillus.* Mycologia, 72: 322-328.

20.Mello, A.F.S.; Machado, C.Z. and Bedendo, I.P. (2004). Development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from green pepper in different culture media, temperature, and light regimes. Sci. Agric.(Piracicaba. 61:542-544.

21.Mia, M.A.T.; Mathur, S.B. and Neergaard, P. (1985). *Gerlachia oryzae* in rice seed. Trans. Br. Mycol. Soc., 48: 337-338.

22.Muhsin, T.M. (1990). Effect of salt on the growth of fungi associated with halophytes *in vitro*. Basrah J. Agric. Sci., 3: 151-159.

23.Muhsin,T.M. and Booth,T.(1987). Fungi associated with halophytes in an inland salt marsh, Manitoba, Canada. Can. J. Bot. 65:1137-1151.

24.Nishimura, S. and Kohmoto, K.(1983). Host specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. Ann. Rev. Phytopa-thology.21: 87-116.

25.Pugh, G.T.F. (1980) Strategies in fungal ecology. Trans. Br. Mycol. Sco., 75: 1-14.

26.Rehnstrom, A.L. and Free, S.J. (1996). The isolation and display antibodies. Mol. Plant-Microbe. Interact., 15: 215-224.

10.Copes, W.E. and Hendrix, F.F. (2004). Effect of temperature on sporulation of *Botrysphaeria dothidea*, *B. obtuse* and *B. rhodina.* P. plant Dis., 88: 292-296.

11.Ellis, M.B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Common. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England. 608p.

12.Ellis, M.B. (1976). More Dematiaceous Hyhomycete. mon. Com- Mycol. Inst. Kew, Surrey, England. 507p.

13.Ellis, D.H. (1994). Clinical Mycology. The human Opportunistic mycosis. Pfizer, New York. 166p.

14.Gessner, R.V. (1980). Degradative enzyme production by salt marsh fungi. Botanica Marina, 23: 133-139.

15.Hanking, L. and Anagnostakis, S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, 67:397-501.

16.Hussain, A; Iqbal,M.; Ayub,N. and Haqqani, A.M. (2003). Physiological study of *Sclerotium rolfsii* Sacc. Pakistan J. plant pathol., 2: 102-106.

17.Isshiki, A.; Akimitsu, K.; Yamamoto, M. and Yamatomo, H. (2001). Endopoly-galacturase is essential for citrus blach rot caused *Alternaria citri* but not brown spot caused by *A.alternata*. Molec. Plant Mirob. Interact.14: 749-751.

18.Kawamure, C.; Moriwaki, J.; Kimura, N.; Fujita, Y.; Fuji, S.; Hirano. T.; Koizumi, S. and Tsuge, T.

characterization of melanin deficient mutants of *Monilinia fructicola.* Physiol. Mol. Plant Pathol., 49: 321-330.

27.Sierra, G. (1957). A simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observation on influence of the contact between cells and fatty substrates. Ned. J. Hyg. 23: 15-22.

28.Simmons, E.G. (1952). Culture studies in the genera *Plesopora, Clathospora,* and *Leptosphaeria.* mycologia, 44: 330-365.

29.Simmons, E.G. (1967). Typification of *Alternaria stemphylium,* and *Ulocladium.* Mycologia, 59: 67-92.

30.Simmons, E.G. (1981). *Alternaria,* themes and variations (1-6). Mycotaxon, 13: 16-34.

31.Simmons, E.G. (1986). *Alternaria,* themes and variations (14-16). Mycotaxon, 25:(195-202), (287-308).

32.Society of American Bacteriologists. (1951). Manual of methods for pure culture study of bacteria. McGrow-Hill, London.

33.Thomma, B.P. (2003). *Alternaria* spp: From general saprophyte to specific parasite. Molec. Plant pathol., 4: 225-226.

34.Wheeler, K.A.; Hurdman, B.F. and Pitt, J.I. (1991). Influence species of *Aspergillus, Penicillium* and *Fusarium.* Int. J. Food Microbiol., 12: 141-150.

35.Yeoh,H.H.; Khew, E. and Lim, G. (1985). A simple method for screening cellulolytic fungi. Mycologia, 77: 161-163.

ملحق1. نتائج التحليل الاحصائي للنشاط الانزيمي لبعض انواع الفطر *Alternaria*.

الانواع المعزولة	انزيم السيليوليز		انزيم اللاييز		انزيم البروتيز		انزيم الاميليز		انزيم البكتينيز		انزيم الفينول اوكسيديز	
	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي (mm)	قطر المستعمرة (mm)	النشاط الانزيمي mm
Alternaria alternata No.1	47, a 49	5, ab 7	28, a 32	9, a 11	30, d 30	24,a 26	53,b 57	8, b 12	55,a 55	5, d 5	42, cd 44	7, c 7
A. alternata No.2	36,b c 38	7 , a 7	29,a 29	9,a 11	38,a 40	19,b 21	49,c 51	8, c 8	40,c 44	4,d 6	45, bc 45	5,c 7
A. tenuissima	37, b 41	6, a 8	30,a 34	6,b 8	35,bc 35	24,a 26	19,e 21	25,a 25	54,a 58	3,dc 5	48a 52	11 b 13
A. chlamydospora	30,e 30	4, bc 6	18,b 22	2,c 2	33,bc 37	22,a 27	48,c 52	10,b 10	40,cd 40	5,d 5	34,e 36	14, b 14
A. citri	31, de 33	4, c 4	31,a 31	3,c 3	33,bc 37	20,b 20	57,ab 57	11, b 13	33,de 37	12,a 12	20,f 24	2,d 2
A. petroselini	36, bc 36	7, a 7	26,a 30	8,a b 10	30,d 30	24,a 26	48,c 52	10, b 10	44,bc 46	10, b10	47,a b 49	12, b 12
A. raphani	33, cd 35	5, bc 5	28,a 30	2,c 2	35,bc 35	23,a 27	37,d 43	9,b 11	50,a 54	3 ,e 3	38,d 42	−e −
A. pluriseptata	44,a 48	4, c 4	30,a 30	6,b 8	35,ab 37	15,c 15	60,a 60	4, d 6	30,e 34	4, de 4	41, ab 44	−e −
A. longipes	36, bc 36	6, ab 6	30,a 32	4,c 4	31,cd 33	22,a b 22	54,b 56	5, d 5	49,ab 51	7, c 7	35,e 35	−e
A. triticina	36, bc 38	6, a 8	29,a 29	10, a 10	33,bc 37	14,c 16	50,c 50	9, b 10	38,cd 42	10, ab 12	50,a 50	1 ,dc 1

تحليل تباين: الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية

A study on the Enzymatic Activity of some *Alternaria* Species and the Effect of some Environmental Factors in their Radial Growth.

Zainab Kh. Abdullah[1], Abdul-Hafiz Al-Duboon[2], Basil A. Abbas[3] and Tawfik M. Muhsin[1]

1College of Education, University of Basrah, Iraq; 2 Marine Science Center, University of Basrah, Iraq; 3 College of Veterinary Medicine, University of Basrah, Iraq

Abstract, The enzymatic activity of nine *Alternaria* species (*Alternaria alternata, A. chlamydospora, A. citri, A. dennisi, A. longipes, A. petroselini, A.plurispetata, A. raphani, and A. triticina*) was tested and most of the isolates showed positive status for detection of the tested enzymes(cellulase, lipase, protease amylase, pectinase, and phenol oxidase).The influence of some environmental factors on the radial growth of the isolated species have been studied. Considering temperature effect, the tested isolates grew within temperature range of 15-35°C with optimum rage of 25-30°C. The growth was inhibited at 10 and 40°C. For the NaCl influence, *Alternaria* isolates tolerated different concentrations of the salt even at 10% and the growth stopped at a concentration of 12.5% for all the tested isolates. The fungus species grew in different tested pH ranges(3-9) with the optimum of 6-7.

Keywords: *Alternaria*, enzymatic activity, environmental factors.

Corresponding author: Abdul-Hafiz Al-Duboon
e-mail: ah_alduboon @yahoo. com