مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 17 العدد 1 سنة 2012
كوثر محمد علي ISSN-1997-2490

عزل وتشخيص أنواع الجنس *Alternaria* spp المعزولة من الأجزاء النباتية وتقدير فعاليتها الانزيمية

كوثر محمد علي حسن
قسم علوم الحياة – كلية علوم البنات – جامعة بابل

الخلاصة:-

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل وتشخيص بعض أنواع الجنس *Alternaria* وتقييم كفاءتها في إنتاج عدد من الأنزيمات وبينت النتائج عزل وتشخيص 14 نوعا تعود للجنس *Alternaria* عزلت من أوراق وثمار وجذور عدد من النباتات المحلية ، وهذه الأنواع هي *A.alternata* و *A.arborescens* و *A.arbusti* و *A.brassicicola* و *A.chlamydospora* و *A.citri* و *A.dennissii* و *A.eryngii* و *A.jabonica* و *A.longipes* و *A.metachromatica* و *A.pluriseptata* و *A.radicina* و *A.tenuissima* . وقد حقق النوع *A.alternata* أعلى نسبة تردد بلغت 46.15 % اما اقل نسبة تردد بلغت 1.92% تمثلت بها الانواع *A.arbusti* و *A.chlamydospora* و *A.longipes* و*A.metachromatica* و *A.radicina* ، وأثنين من هذه الأنواع تسجل لأول مرة في العراق وهما: *A.eryngii*و*A.metachromatica* . كما تم وضع الأنواع المعزولة للجنس *Alternaria* في مجاميع وكل مجموعة تضم 3-5 أنواع المتقاربة في الصفات المظهرية للكونيدات والحامل الكونيدي ، إضافة إلى ذلك تم دراسة فعالية ستة أنزيمات للأنواع المعزولة وقد تبين ان جميع الأنواع كانت فعالة في إنتاجها للأنزيمات الستة ولكن بدرجات مختلفة وقد تفوق النوع *A.alternata* في أنتاجه للأنزيمات على باقي الأنواع قيد الدراسة .

1- المقدمة:-

يعد الجنس *Alternaria* Nees:Fr. احد أجناس الفطريات الخيطية ذات الابواغ الملونة المقسمة والمعروفة بـ Phaeodictyosporic hyphomycetes ، واسع الانتشار في الطبيعة و يعد من اكبر المسببات المرضية للمحاصيل الزراعية سواء في الحقل اواثناء النقل او الخزن فهو يصيب عددا كبيرا من انواع الحبوب والفواكه والخضروات (15) . فغالبا ما تصيب الانواع *A.brassicicola* و*A.brassicae* و *A.raphani* و *A.hercula* و*A.olercea* العائلة الصليبية مثل اللهانة والفجل واللفت والقرنابيط وغيرها (25) ، وقد تم عزل الأنواع *A.petroselini* , *A.dauci*, *A.radicina* و *A.alternata* من اوراق وبذور وترب نباتي الجزر والبقدونس (11) . وتسبب بعض أنواع الجنس *Alternaria*مرض Canker disease في أشجار اليوكالبتوس (8).

وأنجزت عدة دراسات في العراق تمكنت من عزل وتشخيص بعض أنواع هذا الجنس ، فقد عزل (3) سبعة أنواع تعود للجنس *Alternaria* من بعض النباتات الصحراوية في جنوب العراق ،أما من ترب مناطق العراق الصحراوية فقد تم عزل ثمانية أنواع تعود لهذا الجنس(2) ، كما استطاع (4) عزل 10 أنواع من هذا الجنس من ترب وأوراق وسيقان نباتات قصب السكر في محافظة ميسان ، في حين عزلت (5) 11 نوعا تعود للجنس *Alternaria* من مصادر مختلفة كالهواء والتربة والفواكه والخضروات وبعض النباتات ، إضافة إلى خمسة أنواع عزلت من الهواء خارج المباني ومن الداخل في البصرة (6) .

يحوي الجنس *Alternaria* على أكثر من 150 نوع وقد ذكر (36) ان هناك من مئة الى عدة مئات من الأنواع التي تعود الى هذا الجنس .ان أنواع الجنس *Alternaria* معروفة بإنتاجها لعدد كبير من الايضات الثانوية والتي تؤثر من خلالها على الكائنات الحية ومنها النبات بعض هذه الايضات تعد سموم للنبات وبعضها انزيمات تعمل على تحليل المواد الاولية للنبات (30) . وتعتمد انواع الجنس *Alternaria* في امراضيتها للنبات على إنتاجها للإنزيمات الخارج خلوية Extracellular enzymes كالسيلوليز واللاييز والبروتيز وغيرها فالنوع *A.alternata* له القدرة على إنتاج عدد كبير من الأنزيمات تمكنه من إصابة أنواع عديدة من العوائل (19,18,7)، كما ينتج النوع *A.panax* كل من السيلوليز والبكتينيز واللاييز والجيلاتينيز (35) .

وهناك اختلاف في الرأي حول التنميط المظهري Phenotypic typification لأنواع الجنس *Alternaria* والذي يحدد درجة القرابة بين الأنواع لوضعها في مجموعات متميزة فقد وضع الباحث (22) الأنواع *A.alternata* و *A.arborescens* و *A.tenuissima* في مجموعة واحدة بينما وضعها الباحثان (33) والباحث (13) كل نوع في مجموعة مستقلة ، ونظرا لعدم وجود دراسة سابقة في العراق حول وضع انواع الجنس *Alternaria* في مجاميع متقاربة مظهريا وكذلك تباين تردد هذه الأنواع على الأجزاء النباتية وقد يرتبط مع تباين التنوع الأنزيمي لتلك الأنواع لذلك

استهدفت الدراسة الحالية عزل وتشخيص أنواع الفطر *Alternaria* من أوراق وثمار وجذور عدد من النباتات ووضعها في مجاميع متقاربة مظهريا واختبار قابليتها على إنتاج عدد من الإنزيمات .

2- المواد وطرائق العمل:-

2-1- زرع العينات النباتية

جمعت أوراق نباتات البرتقال والتفاح والنارنج والتين والخروع والصفصاف اليوكالبتوس والقطن والورد وبراعم أشجار المشمش من بعض الحقول والبساتين في محافظة بابل كما تم الحصول على ثمار كل من التفاح والطماطة واللهانة والخس والجزر من الأسواق المحلية في المحافظة، غسلت هذه العينات بشكل جيد بالماء الجاري ثم قطعت إلى قطع صغيرة بطول 0.5 سم وعقمت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 5% لمدة 2-3 دقائق بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثم جففت على ورق ترشيح معقم ثم زرعت في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي أكار البطاطا والدكستروز (PDA) بواقع ثلاث مكررات لكل عينة وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 28º م لمدة 5 أيام .

2-2- تنقية مزارع أنواع الفطر *Alternaria* وتشخيصها

فحصت مزارع الفطريات النامية على العينات النباتية بواسطة مجهر مركب من نوع Novel وتم تنقية الفطريات النامية بأخذ لقاحه من حافة المستعمرة الفطرية النامية من النماذج النباتية وزرعها على وسط PDA وحضنت لمدة 5 أيام بعدها تم تشخيصها بتحضير شرائح زجاجية من لقاحه مأخوذة من حافة مستعمرات الفطر *Alternaria* بطريقة البصمة بالشريط الشفاف وفحصت تحت المجهر المركب حيث تم فحص وقياس أشكال وأطوال 20-25 كونيدية و حامل كونيدي وتم تصويرها بالكاميرا المحمولة على المجهر من نوع DCE-2 وشخصت جميع الأنواع اعتمادا على المصادر(38,27,15) كما وضعت هذه الانواع المعزولة في مجاميع اعتمادا على الصفات المظهرية في شكل وطول الحوامل الكونيدية إضافة إلى شكل الكونيدات وأطوالها وعدد الحواجز المستعرضة والطولية أو المماسية وصفات أعناق الكونيدات وأطوالها وطول السلسلة الكونيدية وقد ضمت كل مجموعة أنواع الجنس *Alternaria* القريبة مظهريا من بعضها . ثم حفظت انواع الفطر *Alternaria* في مائل الوسط PDA slant المحضر في أنابيب سعة 15 مل ووضعت هذه المزارع بدرجة حرارة 4ºم لغرض إجراء الدراسات اللاحقة عليها.

2-3- حساب النسبة المئوية للتردد

حسبت النسبة المئوية لتردد كل نوع من أنواع الفطر *Alternaria* حسب المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد مستعمرات النوع الفطري}}{\text{العدد الكلي لمستعمرات الأنواع الفطرية}} \times 100$$

2-4- دراسة الفعالية الإنزيمية للأنواع المعزولة

اختبرت فعالية عدد من الأنواع المعزولة للجنس *Alternaria* على إنتاج أنزيمات خارج خلوية Extracellular enzymes وذلك على أوساط صلبة خاصة للتحري عن قدرتها لإنتاج هذه الأنزيمات حيث تم اخذ لقاحة من مزارع نقية بواسطة ثاقب فليني 5 ملم معقم بالكحول واللهب لكل نوع من الأنواع المعزولة للجنس *Alternaria* ووضع القرص الفطري في مركز الأطباق الحاوية على الأوساط الزرعية الخاصة بالأنزيمات وبواقع مكررين لكل نوع فطري ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 28 º م لمدة 5 أيام، وقد استخدمت المصادر (21,9) في تحضير الأوساط الزرعية لكل انزيم وكما يلي :-

2-4-1- إنزيم السليوليز Cellulase

حضر الوسط من المواد التالية :-

$(NH_4)SO_4$ (1.4) غم و KH_2PO_4 (2) غم و $MgSO_4.7H_2O$ (0.3) غم و $CaCl_2.2H_2O$ (0.3) غم و Carboxy Methyl Cellulose sodium salt (CMC) (10) غم كمادة اساس و Peptone (1) غم و Urea (0.3) غم و Agar (20) غم .أذيبت جميع المحتويات عدا اليوريا باستخدام خلاط مغناطيسي Magnetic stirrer ثم أضيفت اليوريا بعد تعقيم الوسط .

استدل على إنتاج أنزيم السليوليز باستخدام كاشف اليود- حامض الهيدروكلوريك Hcl-Iodine المتكون من 100 مل من HCl تركيز (0.1) مولاري مع 500 مل من (I_2 %1 +KI %2) .أضيف الكاشف إلى الأطباق وترك لمدة 10 دقائق ثم سكب المحلول وترك الطبق لمدة 5-10 دقائق ، ويتم التحري عن ظهور هالة شفافة حول المستعمرة يستدل منها على إفراز الفطر لأنزيم السليوليز ويقاس نشاط العزلات في أنتاج الأنزيم بقياس عرض الهالة بوحدة المليمتر .

2-4-2- إنزيم اللاييز Lipase

حضر الوسط من المواد التالية :-

Peptone (10) غم و NaCl (5) غم و $CaCl_2.2H_2O$ (0.1) غم و Agar (20) غم و Tween20 (10) مل كمادة أساس و D.W. (1000) مل .عقمت مادة Tween20 بصورة منفصلة وبنفس طريقة تعقيم الأوساط الزرعية وبردت ثم أضيفت إلى بقية مكونات الوسط المعقم بمقدار 1 مل لكل 100 مل وسط زرعي يتم التحري عن قدرة الفطر على أنتاج إنزيم اللاييز من خلال تكون راسب ابيض تحت المستعمرة أو بلورات بيضاء تحيط بالمستعمرة .

2-4-3- إنزيم البروتيز Protease

حضر الوسط من المواد التالية :-

الاكار المغذي الصلب Nutrient Agar 950 مل و الجلاتين Gelatin 4 غم كمادة أساس . يعقم محلول الجلاتين 8% منفصلا ثم يضاف للاكار المغذي المعقم بمقدار 5 مل لكل 100 مل وسط زرعي .

يتم التحري عن قدرة الفطر على إنتاج إنزيم البروتيز باستخدام كاشف فرازير Fraziers reagent المتكون من $HgCl_2$ (5) غم و Hcl (20) مل و D.W. (100) مل .يضاف الكاشف للأطباق وتترك لمدة 5 دقائق ثم يسكب ، ويتم التحري عن ظهور هالة شفافة تماما حول المستعمرة الفطرية للعزلة المنتجة لإنزيم البروتيز ويقاس نشاط العزلات في أنتاج الإنزيم بقياس عرض الهالة بوحدة المليمتر .

2-4-4- إنزيم الأميليز Amylase

حضر الوسط من المواد التالية :-

Soluble starch (2) غم كمادة أساس و Peptone (1) غم و Yeast extract (15) غم و Agar (20) غم ، D.W. (1000) مل . أذيبت المكونات قي الماء المقطر ثم عقم الوسط وصب في اطباق بتري .

يتم التحري عن قدرة الفطر على إنتاج إنزيم الأميليز باستخدام محلول ايوديد البوتاسيوم KI المحضر من إذابة 15 غم من KI في لتر من الماء المقطر المعقم . يضاف الكاشف للأطباق وتترك لمدة 5 دقائق ثم يسكب ، ويتم التحري عن تكون هالة صفراء حول المستعمرة الفطرية للعزلة المنتجة لإنزيم الأميليز ويقاس نشاط العزلات في أنتاج الأنزيم بقياس عرض الهالة بوحدة المليمتر .

2-4-5- إنزيم البكتينيز Pectinase

حضر الوسط من المواد التالية :-

محلول الأملاح المعدنية Mineral salt solution (500) مل و Yeast extract (1) غم و Pectin (5) غم كمادة أساس ، Agar (20) غم ، D.W. (1000) مل . يتم التحري عن قدرة الفطر على إنتاج إنزيم البكتينيز باستخدام كاشف عبارة عن محلول مائي يحوي نسبة 1% من مادة Hexadecyl trimethyl ammonium bromide . يضاف الكاشف للأطباق وتترك لمدة 5 دقائق ثم يسكب ، ويتم التحري عن تكون هالة واضحة حول المستعمرة الفطرية للعزلة المنتجة لإنزيم البكتينيز ولون معتم لبقية الوسط .

2-4-6- إنزيم فينول اوكسديز Phenol Oxidase

حضر الوسط من المواد التالية :-

Malt extract (15) غم و Tannic acid (0.8) غم كمادة أساس و Agar (20) غم و.D.W (1000) غم. يذوب الاكار وخلاصة الشعير في 900 مل من الماء المقطر ويعقم على حده أما حامض التانيك فيذاب في 100 مل من ماء مقطر معقم ويمزج مع المحلول الأول . يتم التحري عن قدرة الفطر على إنتاج الأنزيم المحلل لحامض التانيك بتلون ظهر المستعمرة أو محيطها بلون بني غامق ، ان درجة اللون وانتشاره تدل على نشاط الفطر في إنتاج الأنزيم .

3- النتائج والمناقشة:-

3-1- الأنواع المعزولة للجنس *Alternaria* ونسب ترددها

تم في هذه الدراسة عزل وتشخيص 14 نوعا من الفطريات التي تعود للجنس *Alternaria* من أوراق وثمار وجذور بعض النباتات وكما هو موضح في الجدول (1) وتبين إن الفطر *A.alternata* كان أكثر الأنواع انتشارا في جميع العينات المستخدمة في الدراسة إذ حقق أعلى نسبة تردد بلغت 46.15 % وتفسر هذه النتيجة على أساس إن النوع *A.alternata* له مدى عائلي واسع ويسبب أمراضا عديدة مثل مرض اللفحة والتبقع الورقي Leaf spots and blights diseases على عدد من أجزاء النبات المختلفة (8) ، وقد كان أعلى عدد للعزلات ظهر في عينات الطماطة والتي بلغت 10 عزلات وهذا يتفق مع ما ذكره (24) من إن النوع *A.alternata* يصيب بذور الطماطة وثمارها، كما يسبب لسيقانها مرض Canker disease (20) ، وتتفق هذه النتيجة مع ما أشار إليه (39) من إن بعض أنواع الفطر *Alternaria* تصيب أشجار الحمضيات ومنها النوع *A.alternata* مسببا مرض البقع البنية في الحمضيات Brown spots disease ، كما تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه (1) التي عزلت 11 نوع للجنس *Alternaria* من محاصيل الخضروات الشتوية

والصيفية في محافظة الموصل وكان النوع *A.alternata* أكثرها ترددا حيث بلغت نسبة تردده من كلا المحصولين 57.33% .

ويتضح من الجدول (1) تباين تردد بعض الأنواع الفطرية التي رافقت نوع واحد او اثنين من العينات النباتية والتي حققت اقل نسبة تردد بلغت 1.92% تمثلت بها الانواع *A.arbusti* و *A.chlamydospora* و *A.longipes* و *A.metachromatica* و *A.radicina* ، وهذا قد يفسر التخصص الفسيولوجي لبعض أنواع الجنس *Alternaria* على بعض العوائل ويتفق هذا التفسير مع ما أشار إليه (34) إلى إن النوعين *A.brassicae* , *A.brassicicola* غالبا ما تصيب نباتات العائلة الصليبية وخاصة اللهانة مسببه لها مرض التبقع الأسود الالترناري Alternaria black spot ، وتخصص النوع *A.radicina* الذي يصيب جميع أجزاء نبات الجزر كالأوراق والأزهار والبذور والجذور مسببا لها عدة أمراض منها مرض تعفن الجذور Root rot وتنخر البقع السوداء Necrotic black lesions (32) كما تصاب الحمضيات بمرض التبقع البني الالترناري Alternaria brown spot من قبل النوع *A.alternata* وهذا الفطر غالبا مايصيب الأوراق الفتية والثمار بظهور بقع بنية - سوداء اللون أما النوع *A.citri* فيسبب مرض التعفن الأسود للحمضيات Black rot والذي يصيب مركز الثمرة (26) .إضافة إلى ذلك فأن النوعان *A.eryngii* و *A.metachromatica* يسجلان لأول مرة في القطر رغم أن هناك العديد من الدراسات التي أجريت في القطر تناولت عزل وتشخيص أنواع الجنس *Alternaria* إلا أنها لم تتمكن من عزل جميع الأنواع (6,5,4,3,2,1) وهذا يدل على أهمية الدراسات المسحية لهذا الجنس .

كما تم في هذه الدراسة وضع الأنواع المعزولة للجنس *Alternaria* في أربعة مجاميع Groups وكل مجموعة تضم 3-5 أنواع من هذا الفطر اعتمادا على الصفات المظهرية للحوامل الكونيدية والكونيديات والسلسلة الكونيدية لكل نوع في المجموعة الواحدة وهذه المجاميع هي :-

1- مجموعة النوع alternata

المستعمرة زيتونية الى سوداء زيتونية او بنية زيتونية او رمادية وفي بعض الأنواع مقسمة إلى مناطق Zonate ، الحامل الكونيدي بسيط او متفرع ، مستقيم او متموج مقسم ، شاحب الى بني او بني زيتوني ، 50-300 × 3-6 مايكرون مع 1 الى عدة ندب كونيدية ، الكونيدات مفردة او تتجمع في سلاسل قصيرة او طويلة بسيطة او متفرعة تحتوي 2-7 كونيدة متباينة الأشكال من البيضاوية او الاهليليجية الى الصولجانية المقلوبة او الكمثرية المقلوبة ، قهوائية زيتونية الى قهوائية داكنة اللون ، ملساء الى مثألة، تحوي 2-8 حواجز مستعرضة و 1 الى عدة حواجز طولية تتخصر أحيانا عند الحواجز اطوالها 8-60 × 7-11 مايكرون ،العنق غائب او اسطواني قصير جدا ، تضم هذه المجموعة الأنواع التالية *A.alternata* و *A.citri* و *A.dennisii* و *A.pluriseptata* و *A.radicina* وتبين اللوحة (d,c,b,a-1) أشكال الكونيدات والسلاسل الكونيدية لهذه الانواع ، وقد جاءت نتيجة هذا النمط متفقة مع نتيجة الباحثان (33) و (13) في مجموعة النوع alternata لكنها لم تتفق مع الباحث (22) في مجموعة النوع alternata والتي ضمت أنواع من مجاميع متفرقة كالنوع *A.tenuissima* و*A.arborescens* و *A.gaisen* وقد وضع النوع *A.radicina* في مجموعة منفصلة .

2- مجموعة النوع tenuissima

المستعمرة زيتونية الى رمادية شاحبة ، الحوامل الكونيدية مفردة او بشكل مجاميع بسيطة او متفرعة منتصبة او منبطحة مستقيمة او متموجة ذات حواجز قهوائية الى زيتونية شاحبة اللون تحتوي 1 الى عدة ندب ، 80-100 × 3-6 مايكرون ،الكونيدات مفردة او بشكل سلاسل قصيرة قهوائية داكنة او شاحبة اللون ملساء الى مثألة ،25-100 ×8-20 مايكرون ، مغزلية او صولجانية مقلوبة تستدق بشكل عنق طويل وضيق يصل ثلث الى نصف طول الكونيديا تحتوي 3-7 حواجز مستعرضة وعدد من الحواجز الطولية تتخصر احيانا عند الحواجز تتضمن هذه المجموعة كل من *A.tenuissima* و *A.longipes* و*A.metachromatica* كما في اللوحة (g,f,e-1) ، وقد وضع الباحث (22) النوعين *A.tenuissima* و*A.longipes* في مجموعة واحدة ضمن مجموعة النوع alternata اما الباحثان (33) فقد عزلاهما عن النوع *A.alternata*.

3- مجموعة النوع chlamydospora

المستعمرة رمادية غامقة او زيتونية غامقة الى سوداء ، الحامل الكونيدي ارتفاعه 60-150 ×5-7 مايكرون بسيط او متفرع مستقيم او منحني منتفخ في القاعدة مقسم ، الكونيدات مفردة او بشكل سلاسل قصيرة وفي بعض الأنواع سلاسل طويلة ملساء او مثألة قليلا اسطوانية او كمثرية مقلوبة في البداية ومع تقدم العمر في بعض الأنواع تنتفخ وتصبح غير منتظمة الشكل وتكسب مظهر كثير الكتل Lumpy وتصبح داكنة عند النضج غير معنقة او ذات عنق قصير ،إبعادها 30-100 × 20-50 مايكرون مع 2-9 حواجز عرضية و 0-2 حواجز طولية وتكون شديدة التخصر عند الحواجز تنتج ابواغ كلاميدية Chlamydospores بكثرة وبأشكال وأحجام مختلفة في بعض الانواع ، تتضمن هذه المجموعة كل من *A.chlamydospora* و *A.jabonica* و *A.brassicicola* وتبين اللوحة (j,i,h-1) أشكال الكونيدات والابواغ

الكلاميدية لهذه الأنواع ، وقد جاء هذا النمط مشابها لمجموعة النوع brassicicola في الدراسة التي اجراها الباحث (22) والتي ضمت الانواع *A.brassicicola* و*A.jabonica* و*A.mimicula* .

4- مجموعة النوع arborescens

المستعمرة زيتونية باهتة اللون ، الحامل الكونيدي بسيط او متفرع بني زيتوني اللون 130-200 × 3-5 مايكرون ،واحيانا في بعض الأنواع قد يصل ارتفاعه الى 1000 مايكرون ، الكونيدات اهليليجية او بيضوية الشكل غير معنقة ملساء بنية الى قهوائية داكنة اللون 20-50 × 7-17 مايكرون، تحتوي على 1-8 حواجز مستعرضة و 1-2 حواجز طولية او مماسية ، قد تتكون بشكل تجمعات من 50-125 كونيديا او بشكل سلاسل من 3-6 كونيديا تضم هذه المجموعة الانواع *A.arborescens* و *A.arbusti* و *A.eryngii* كما في اللوحة (m,l,k-1) ، اتفقت نتائج هذا النمط مع دراسة كل من (33,13) حيث وضعا النوع *A.arborescens* في مجموعة منفصلة عن مجموعة النوع *A.alternata* اما الباحث (22) فقد وضعهما في مجموعة واحدة وهي مجموعة النوع alternata .

وقد كانت الصفات المظهرية لمستعمرات أنواع الجنس *Alternaria* التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مشابهة للصفات المذكورة في المصادر التصنيفية المعتمد عليها (38,27,15) ، وكان الباحث (38) قد وضع أنواع الجنس *Alternaria* في 14 مجموعة ، وقد جاءت نتائج التنميط المظهري في دراستنا متفقة في بعض الأنماط مع الدراسة التي أجراها كل من (33,13) على عدد من أنواع الجنس *Alternaria* في استحداث مفتاح تصنيفي يضم اربعة مجاميع وهي مجموعة النوع alternata ومجموعة النوع arborescens ومجموعة النوع infectoria ومجموعة النوع tenuissima معتمدا على اشكال الكونيدات والحوامل الكونيدية الاولية والثانوية . كما جاءت متفقة في انماط اخرى مع دراسة الباحث (22) الذي عزل 15 نوعا تعود للجنس *Alternaria* وضعها في اربعة مجاميع وهي مجموعة النوع alternata ومجموعة النوع brassicicola ومجموعة النوع radicina ومجموعة النوع porri اعتمادا على الصفات المظهرية للجسم الخضري لكل نوع .

3-2- الفعالية الانزيمية للانواع المعزولة

درست الفعالية الأنزيمية للأنواع المعزولة العائدة للجنس *Alternaria* وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة كما في الجدول (2) بأن جميع الأنواع قيد الدراسة أعطت كشفا موجبا للإنزيمات المختبرة على الأوساط الصلبة الخاصة بهذه الإنزيمات ولكن بنشاطات متفاوتة باستثناء إنزيمي اللايبيز والفينول اوكسيديز ، ومن خلال اختبار الأنواع المعزولة للجنس *Alternaria* في إفراز إنزيم السيلوليز فقد أعطى النوع *A.alternata* أعلى نشاط إنزيمي والبالغ 8 ملم ظهر كمنطقة شفافة تحيط بالمستعمرة يليه النوعان *A.arborescens* و*A.jabonica* والذي بلغ 7 ملم لكل منهما وهذه النتيجة تتفق مع العديد من المصادر فمن بين 17 عزلة تعود لعدد من الاجناس كان النوع *A.alternata* الأكثر إنتاجا لإنزيم السيلوليز وان هناك عدة عوامل تؤدي الى زيادة انتاج هذا الانزيم منها إضافة الكلوكوز والسليلوز كمصادر للكربون واليوريا كمصدر للنيتروجين وبدرجة حموضة 5-6 والحضن بدرجة 25-35 ºم (28) بينما في دراسة الباحث (17) لـ 73 نوع تعود إلى 36 جنس كان من بينها الأنواع *A.alternata* و *A.citri* و *A.raphani* و *A.tenuissima* الأكثر إنتاجا لانزيم السيلوليز واثبت الباحث إن الفطر يبدأ بإنتاج الانزيم بعد 6-8 أيام من الحضن بدرجة 25ºم باستخدام نخالة الحنطة كمصدر للكربون والبيتون كمصدر للنيتروجين وذكر ان جميع انواع الفطريات تقريبا لها القابلية على تحليل السليلوز في الطبيعة حيث تقوم بتحليل المواد السليلوزية الملكنة الموجودة في النبات من خلال إفراز ها لعدد من الإنزيمات وهي Endoglucanase وExoglucanase وغيرها من الانزيمات التي تحلل السليلوز الى وحدات صغيرة هي سكر الكلوكوز، إما عند الكشف عن انزيم اللايبيز فلم تعطي جميع الانواع المختبرة كشفا موجبا تجاه هذا الانزيم فقد أعطت الأنواع *A.arborescens* و*A.chlamydospora* و *A.citri* و *A.jabonica* و*A.pluriseptata* كشفا سالبا لهذا الانزيم وربما يعود السبب أحيانا الى قصر مدة الحضانة حيث ان بعض الفطريات تحتاج مدة 14 يوم على الأقل لتعطي كشفا موجبا للدهون (9) ، كما تفوق النوع *A.alternata* في إنتاجه لانزيم البروتيز الذي أعطى أعلى نشاط انزيمي بلغ 19 ملم يليه النوع *A.citri* و *A.tenuissima* بنشاط انزيمي 17 و 16 ملم على التوالي وقد أشار الباحثان (29) ان هناك عدد كبير من أنواع الجنس *Alternaria* تنتج انزيم البروتيز وخاصة النوعين *A.alternata* و *A.tenuissima* كما إن إضافة الفركتوز إلى الوسط الزرعي سوف يزيد من أنتاج هذا الانزيم ، إضافة إلى ذلك فأن هذا الإنزيم يلعب دورا فعالا في أمراضية الفطر للنبات (40) وفيما يخص فعالية إنزيم الاميليز فقد اعطى النوع *A.arborescens* فعالية عالية بلغت 10 ملم يليه الأنواع *A.alternata* و *A.dennissii* و *A.eryngii* و*A.tenuissima* والتي بلغت فعاليتها 9 ملم وفي دراسة للباحث (37) اثبت إن النوعين *A.alternata* و *A.tenuissima* لهما قابلية عالية على إنتاج إنزيم ألفا اميليز في ثلاث درجات حموضة وهي 4.5 و5.5 و6.5 ، إما اختبار انزيم البكتنيز فقد اظهر النوعين *A.alternata* و*A.citri* أعلى نشاط انزيمي بلغ 15 ملم لكل منهما ومن المعروف إن انزيم البكتينيز يعمل على تحلل المواد البكتينية المكونة للصفيحة الوسطى في خلايا الأنسجة النباتية مما يؤدي إلى إضعاف جدران الخلايا النباتية وبالتالي يسهل غزوها من قبل الفطر (10) كما كان كشف انزيم الفينول اوكسيديز موجبا لكل الأنواع باستثناء الأنواع *A.arbusti* و*A.jabonica* و*A.longipes* التي أعطت كشفا

سالبا لهذا الانزيم ، ومن خلال هذه النتائج نلاحظ إن اغلب أنواع الفطر *Alternaria* لها القدرة على إنتاج الانزيمات حيث إن أنواع الفطر *Alternaria* لها القابلية على تجميع العناصر الثقيلة مثل الكالسيوم والخارصين والنحاس والحديد وغيرها وتعمل بشدة على تحطيم اللكنين والسليلوز والبكتين والكاربوهيدرات المعقدة مما يجعلها تتكيف لأنواع مختلفة من المواد وإنتاج انزيمات مختلفة تبعا لذلك (14) ،كما ان أنواع الجنس *Alternaria* تنتج حوالي 70 نوعا من الايضات الثانوية تصنف نصفها تقريبا على انها انزيمات والنصف الآخر على إنها سموم ومواد أخرى (31) .

وقد جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة ا مع دراسة (5) في محافظة البصرة لاختبار هذه الانزيمات في 11 نوع للجنس *Alternaria* حيث كانت جميع الانواع المختبرة فعالة في انتاج هذة الانزيمات وبنسب متفاوتة ، واختلفت بعض هذه النتائج مع الدراسة التي أجرتها (2) في اختبار نشاط النوعين *A.alternata* و *A.chlamydospora* لأربع انزيمات والتي أعطت كشفا موجبا لانزيمي الاميليز والسيلوليز بينما اعطت كشفا سالبا لانزيمي البكتنيز والفينول اوكسديز، وهذا يؤكد ان ليست جميع العزلات العائدة للنوع نفسه لها نفس الفعالية في انتاج الانزيمات فقد اجرى الباحث (16) اختبارا لثلاث انزيمات وهي البروتيز والاميليز واللاييز على اكثر من 500 عزلة تعود الى 15 جنس مكون من 41 نوع اثبت من خلالها ان 61% من العزلات تعطي فعالية جيدة للانزيمات و11% تعطي فعالية متوسطة و6% فعاليتها واطئة و20% ليس لها أي فعالية تجاه الانزيمات . كما جرى اختبارا لثلاثين نوعا من الفطريات الكيسية في إنتاج عشرة انواع من الأنزيمات وتبين ان 70% من الأنواع الفطرية أعطت نتائج مختلفة في إنتاجها للأنزيمات عن الدراسات السابقة وفسر ذلك على ان الكشف السالب للانزيمات قد يعني إما إن الإنزيم غير منتج من قبل العزلة او انه أنتج لكنه لم يتحرر من الغزل الفطري الى الوسط الزرعي او قد يكون أنتج وتحرر لكن مكونات الوسط الزرعي قد ثبطت عمله ولهذا فأن الكشف السالب لا يعني قطعا ان العزلة غير قادرة على إنتاج الإنزيم (9). كما إن كمية الانزيم المنتج من قبل انواع الفطر *Alternaria* وشدة فعاليته تزداد بزيادة فترة الحضن حتى 20 يوما كما انها تزداد في العزلات الضارية عن غير الضارية (23,12) إضافة إلى إن اختلاف العزلات الفطرية في فعاليتها الأنزيمية تعتمد على درجة الحرارة والدالة الحامضية ومكونات الوسط الزرعي وغيرها من العوامل التي تؤثر على إفراز العزلة للانزيم (21) .

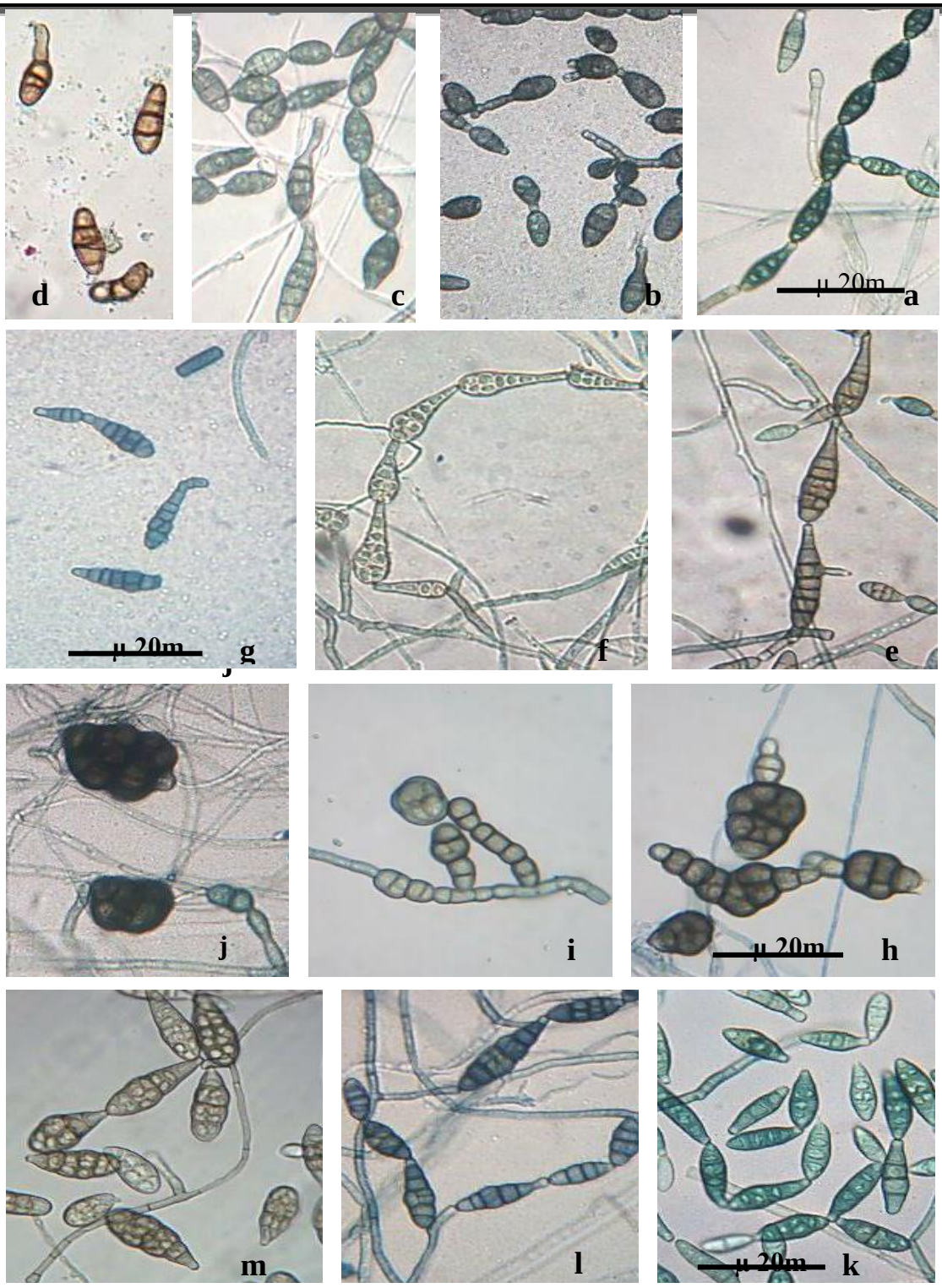
جدول (1) الأنواع المعزولة للجنس *Alternaria* ونسبة ترددها .

ت	الأنواع المعزولة	العينات التي ظهر فيها النوع	العدد الكلي للعزلات	النسبة المئوية للتردد
1	*A.alternata* (Fr.)Keissl	جميع العينات باستثناء التفاح والجزر وأوراق الصفصاف	48	46.15
2	*A.arborescens* Simmon	أوراق النارنج وبراعم المشمش	5	4.8
3	*A.arbusti* Simmon	ثمار التفاح	2	1.92
4	*A.brassicicola* (Schw.)Wiltshire	أوراق اللهانة	7	6.73
5	*A.chlamydospora* Mouchacca	أوراق اليوكالبتوس	2	1.92
6	*A.citri* Ellis & Pierce	ثمار التفاح وأوراق البرتقال والتفاح والنارنج	8	7.69
7	*A.dennisii* Ellis	أوراق النارنج والخروع والقطن والصفصاف	7	6.73
8	*A.eryngii* (Pers.)Hug.& Simmon	أوراق الخروع والصفصاف والقطن وبراعم المشمش	10	9.61
9	*A.jabonica* Yoshii	أوراق الخس	1	0.96
10	*A.longipes* (Ellis & Ev.)Mason	أوراق الصفصاف	2	1.92
11	*A.metachromatica* Simmon	أوراق الخس وثمار التفاح	2	1.92
12	*A.pluriseptata* (Karst.& Har.)Jorstad	أوراق الخس وأوراق الصفصاف	4	3.84
13	*A.radicina* Meier, Drech.& Eddy	جذور الجزر	2	1.92
14	*A.tenuissima* (Kunze ex Pers.)Wilt.	أوراق الخس وأوراق الصفصاف	4	3.84

جدول (2) الفعالية الأنزيمية لأنواع الجنس *Alternaria* على الأوساط الصلبة الخاصة بالإنزيمات .

Phenol Oxidase		Pectinase		Amylase		Protease		Lipase		Cellulase		الأنواع المعزولة
AZ	CD	AZ	CD	AZ	CD	AZ	CD	AZ	CD	AZ	CD	
+	60	15	30	9	44	19	35	+	37	8	55	*A.alternata*
+	54	11	33	10	35	15	39	-	40	7	63	*A.arborescens*
-	44	10	24	7	31	13	37	+	36	5	43	*A.arbusti*
+	38	12	29	8	30	13	41	+	35	4	37	*A.brassicicola*
+	47	5	27	5	32	11	36	-	29	3	32	*A.chlamydospora*
+	56	15	30	6	45	17	30	-	38	4	57	*A.citri*
+	58	9	32	9	40	12	35	+	35	4	48	*A.dennisii*
+	53	7	31	9	31	15	43	+	38	6	54	*A.erynqii*
-	40	7	16	3	29	15	20	-	40	7	36	*A.jabonica*
-	46	9	25	3	22	13	29	+	36	3	52	*A.longipes*
+	30	10	17	5	25	10	20	+	27	8	33	*A.metachromatica*
+	46	6	34	4	36	14	37	-	33	6	60	*A.pluriseptata*
+	37	5	28	7	28	14	38	+	37	4	45	*A.radicina*
+	55	12	32	9	42	16	40	+	42	5	59	*A.tenuissima*

CD = Colony Diameter (mm) , AZ = Activity Zone (mm)



اللوحة (1) أشكال الحوامل الكونيدية والكونيدات في انواع الجنس *Alternaria* :-

-a *A.alternata* ، -b *A.citri* ، -c *A.pluriseptata* ، -d *A.radicina* ، -e *A.tenuissima* ، -f
-g *A.metachromatica* ، -h *A.longipes* ، -i *A.chlamydospora* ابواغ كلاميدية للفطر
-j *A.chlamydospora* كونيدات وابواغ كلاميدية للفطر ، -k *A.jabonica* ، -l *A.arborescens* ، -m *A.eryngii* .

المصادر:-

1- الطائي ، ورقاء سعيد قاسم ورياض خليل البرهاوي (2009) . دراسة تشخيصية لانواع جنس *Alternaria* المسبب لمرض تبقع الاوراق لمجموعة من محاصيل الخضر في مدينة الموصل . مجلة وقاية النبات العربية، المؤتمر العلمي العاشر لعلوم وقاية النبات . مجلد 27 .

2- حمد ، نداء شهاب (1998) . مجتمع الفطريات الدقيقة في ترب مناطق العراق الصحراوية .اطروحة دكتوراه كلية العلوم . جامعة بابل .

3- دراج ، حسين فليح (1989) . دراسة حول الفطريات المصاحبة لبعض النباتات الصحراوية في جنوب العراق . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة البصرة .

4- صالح ، يحيى عاشور (2004). دراسة مجتمع الفطريات لحقول قصب السكر في ميسان / العراق. اطروحة دكتوراه . كلية العلوم، جامعة البصرة.

5- عبد الله ،زينب خلف (2005) .دراسة لبعض أنواع الجنس *Alternaria* وقابليتها المثبطة لبعض الفطريات .رسالة ماجستير .كلية التربية .جامعة البصرة .

6- عدلان ،منيرة منصور (2009) . عزل وتشخيص الفطريات المحمولة في الهواء الخارجي والداخلي في البصرة ودراسة قدرتها لإفراز الأنزيمات والسموم . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة البصرة .

7- Aba Alkhail, A.A. (2005). Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. Pak. J. Biol. Sci. 8(3):413-417.

8- Abd-Allah, S. & Salih, O. (2008). First report for *Alternaria* sp. Infection of *Eucalyptus globulus* in Al-Taif province at kingdom of Saudi Arabia . Saudi J. of Bio. Sci. 15(2): 231-236.

9- Abdel-Raheem, A. & Shearer, C.A.(2002). Extacellular enzyme production by fresh water ascomycetes. Fungal Diversity, 11:1-19 .

10- Agrios, G.N.(1988). Plant pathology. 3rd ed. U.K.edition published by Acadimic Press(London).

11- Aleksandra, R.B.; Nataša, D.D.; Ivana, M.D. & Branka, B.K.(2007). Antigenic characteristics as taxonomic criterion of differentiation of *Alternaria* spp., pathogenic

12- Anand, T.; Bhaskaran, R.; Raguchander, T.; Karthikeyan, G.; Rajesh, M. & Senthilraja, G. (2008). Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata* causing fruit rot of Chillies. J.Plan. Protec. Res. 48(4): 437-451.

13- Andrew, M.; Peever, T.L. & Pryor, B.M. (2009). An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. Mycologia 101(1):95-109.

14- Cole, R.J. & Schweikert, M.A. (2003). Handbook of secondary fungal metabolites. Vol. 1 & 2, Academic press, Amsterdam.

15- Ellis, M.B.(1976). More dematiaceous hyphomycetes.Common wealth Agricultural Bureau, Kew,England .

16- El-kady, I.A.; Mazen, M.B. & Saber, S.M.(1984). Some enzymatic activities of fungi isolated from cotton seeds and cotton seed products. Qatar, Univ. Sci. Bull. 4:85-93.

17- El-Said, A.H.M. (2001). Phyllosphere and phylloplane fungi of banana cultivated in Upper Egypt and their cellulolytic ability . Mycobiology 29(4);210-217.

18- Fanta, N.; Ortega, X. & Perez, L. (2003). The development of *Alternaria alternata* is prevented by chitinase and B-1,3-glucanases from *Citrus limon* seedling . Biol. Res. 36:411-420.

19- Fawzi, E.M.; Khalil, A.A. & Afifi, A.F. (2009). Antifungal effect of some plant extracts on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. Afr. J. Biotechnol. 8(11): 2590-2597.

20- Grogan, R.G.; Kimble, K.A.& Misaghi, I. (1975). A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternate* f.sp. *lycopersici*. Phytopathology 65:880-886.

21- Hanking, L. & Anagnostakis, S.L.(1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, 67(3):597-607.

22- Hong, S.G.; Derong, L. & Barry, M.P. (2005). Restriction mapping of the IGS region in *Alternaria* spp. Reveals variable and conserved domains.Mycol. Res. 109(1): 87-95.
23- Hubballi, M.; Sornakili, A.; Nakkeeran, S.; Anand, T. & Reguchander,T. (2011). Virulence of *Alternaria alternata* infecting noni associated with production of cell wall degrading enzymes. J.Plan. Protec. Res 51(1):87-92.
24- Ismael, J.H.S.(2010). Isolation and identification of some fungi from certain Solanaceous seeds in Sulaimania and Germian regions and their exudate effects on germination rate. Agric. Biol. J. N. Am., 1(4):615-619 .
25- Kucharek, T.(1994). Alternaria diseases of crucifers. University of Florida. pp:34.
26- Masunaka, A.; Tanaka, A.; Tsuge, T.; Peever, T.L.; Timmer, L.W.; Yamamoto, M.; Yamamoto, H. &Akimitus, K. (2000). Distribution and characterization of *AKT* homologus in thetangerine pathotype of *Alternaria alternata.* Phytopathology 90(7): 762-768.
27- Moubasher, A.H.(1993).Soil fungi in Qatar and other Arab countries. The Scientific and Applied Research Centre Uni. Qatar, 566pp.
28- Nsar, S.A.; Abozaid, A.A. & Al-salemi, F.A. (2011). Cellulase production by two fungal strains isolated from Taif in Saudi Arabia. J.Agric. Sci. 19(1);171-178.
29- Patil, M. & Shastri, N.V.(1985). Purification and properties of protease produced by *Alternaria alternata* (Fr.)Keissl.,regulation of oroduction by fructose. J. Biosci. 9(1&2):1-11.
30- Pattana, M. P. & Strange, R.N.(1999). Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola* , the causal agent of dark leaf spot disease of *Brassica* species grown in Thailand . Plantpathology 48:749-755 .
31- Pose,G.N.; Ludemann,V.; Fernandez,D. Segura,J,A. &Pinto,V.F. (2010). *Alternaria* species associated with 'moldy heart' on peaches in Argentina .Tropical Plant Pathology 35(3): 174-177 .
32- Pryor, B.M. & Gilbertson, R.L. (2002). Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina, A.carotiincultae,* and *A.petroselini* based upon morphological, biochemical, and molecular characteristics. Mycologia 94(1):49-61.
33- Pryor, B.M. & Michailides, T.J. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with Alternaria late blight of pistachio. Phytopathology 92:406-416.
34- Rop, N.K.; Kiprop, E.K. & Ochuodho, J.O. (2009). *Alternaria* species causing black spot disease of *Brassicas* in Kenya. Afri. C.Sci. Con. Pro. 9:635-640.
35- Quayyum, H.A.; Dobinson, K.F. & Traquair, J.A. (2005). Conidial morphology, virulence, molecular characterization, and host-parasite interactions of selected *Alternaria panax* isolates on American ginseng. Can. J. Bot. 83:1133-1143.
36- Rotem, J.(1994). The genus *Alternaria*, biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press, St Paul, Minnesota, pp:1-325 .
37- Shafique, S.; Bajwa, R. & Shafique, Sh. (2010). Alpha-amylase production by toxigenicfungi. N. Pro. Res. 24(15): 1449-1456 .
38- Simmons, E.G. (1992). *Alternaria* taxonomy : current status, view point, challenge. P: 1-35 in :*Alternaria* biology, plant disease and metabolites. Chelkowsk, J. and Visconti, A. eds. Elsevier Sci.pub., Amsterdam.
39- Timmer, L.W.; Peever, T.L.; Solel, Z.& Akimitsk, K.(2003). Alternaria disease of citrus-novel pathsystem. Phytopathol. Mediterr. , 42:3-16 .
40- Valueva, T.A. & Mosolov, V.V.(2004). Role of inhibitor of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganism. Bio. Chem. 69:1305-1309.

Isolation and identification of *Alternaria* species isolated from plant parts and evaluated their enzymatic activities

Kawther Mohammed Ali Hassan
Biology department –College of science for women –Babylon university

Abstract:-

This study, aim to typification of *Alternaria* species and evaluated their enzymatic production, and the result showed : isolation and identification 14 species of Alternaria from plant parts included leaves, fruits and roots . These species are *A.alternata*, *A.arborescens*, *A.arbusti* , *A.brassicicola*, *A.chlamydospora*, *A.citri* , *A.dennisii*, *A.eryngii*, *A.jabonica*, *A.longipes* , *A.metachromatica*, *A.pluriseptata*, *A.radicina* and *A.tenuissima*.also the result showed high frequency of *A.alternata* is 46.15% while the lower frequency value 1.92% for *A.arbusti*, *A.chlamydospora*, *A.longipes* , *A.metachromatica* and *A.radicina* . This study divided of *Alternaria* species in four groups depend on morphology of conidia and conidiophores for the first time in Iraq, as well these fungi produced six enzymes but they variable in their activities on substrates media, the *A.alternata* has highest enzymatic producer compared with the other species .