



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة

توصيف عزلات الفطر *Alternaria alternata* المنتجة
للسم Alternariol في ثمار الطماطة ودراسة تأثيراته
السمية الوراثية

أطروحة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل
درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/ فطريات

من قبل

فاضل سامي زغير

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

سعد محمد ندا

الأستاذ الدكتورة

بان طه محمد

ايار 2015 م

رجب 1436 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ
الرَّحِيمِ

{ وَمَا أُوتِيتُمْ مِّنْ
الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا }

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمِ

سورة الإسراء
الآية (٨٥)

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بان هذه الأطروحة والموسومة بـ (توصيف عزلات الفطر *Alternaria alternata* المنتجة للسم Alternariol في ثمار الطماطة ودراسة تأثيراته السمية الوراثية) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية من قبلي وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم : د.محمد حسين عبد الله المهداوي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

الكلية والجامعة: قسم اللغة العربية / كلية التربية للعلوم الإنسانية / جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2015

توصية الأستاذ المشرف

نشهد بان إعداد هذه الأطروحة الموسومة (توصيف عزلات الفطر *Alternaria alternata* المنتجة للسم Alternariol في ثمار الطماطة ودراسة تأثيراته السمية الوراثية) قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفه في علوم الحياة / فطريات.

التوقيع:

الاسم : بان طه محمد

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعه كربلاء

التاريخ : / / 2015

التوقيع:

الاسم : سعد محمد ندا

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: مركز التقنيات الاحيائية/جامعه النهرين

التاريخ : / / 2015

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذين المشرفين ، أحيل هذه الأطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع:

الاسم : رافد عباس العيسى

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2015



إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد أطلعنا على الأطروحة الموسومة (توصيف عزلات الفطر *Alternaria alternata* المنتجة للسم *Alternariol* في ثمار الطماطة ودراسة تأثيراته السمية الوراثية) المقدمة من قبل الطالب فاضل سامي زغير كجزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم حياة/ فطريات، وبعد إجراء المناقشة العلنية وجد إنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الأطروحة بتقدير امتياز..

رئيس اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. جواد كاظم عبود الجنابي

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: كلية العلوم

عضو اللجنة

٢٠١٥/ /

التوقيع:

الاسم: د. علي عبد الحسين الجنابي

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: كلية العلوم الطبية/ جامعة كربلاء

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. زهير حميد عبود

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: كلية العلوم / جامعة كربلاء

عضو ومشرفا

التوقيع:

الاسم: د. سعد محمد ندا

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: مركز التقنيات الإحيائية / جامعة النهريين

التاريخ: ٢٠١٥/ /

عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع:

الاسم: د. نجم عبد الحسين نجم

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: ٢٠١٥/ /

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. عبد الامير ناصر غلوب الركابي

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. هادي مهدي عبود

المرتبة العلمية: رئيس باحثين

عضو ومشرفا

التوقيع:

الاسم: د. بان طه محمد

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: ٢٠١٥/ /

الإهداء

إلى أصحاب الحلم
الكبير في وصولي إلى
هذه اللحظة

من فارقني وكله أمل بان
أحقق حلمه يوما ما
..... روح والدي

من تمننت ودعت وقد استجاب
الله لها أمي

من حلمت وضحت وتحملت معي
مرارة الجهد والعناء
..... زوجتي
الحبيبة

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خير خلق الله محمداً الأمين وعلى آله وصحبه الطيبين الطاهرين .

وأنا أكتب السطور الأخيرة من هذه الاطروحة لايسعني إلا أن أقدم كلمة شكر مشفوعةً بالامتنان والإحساس الغامر بالفضل الكبير إلى أساتذتي الأفاضل الأستاذ الدكتور بان طه محمد والأستاذ المساعد الدكتور سعد محمد ندا لاقتراحهما موضوع الدراسة ومتابعتهما الدائمة وجهدهما المبذول طيلة فترة البحث وصولاً به إلى مستوى الرصانة العلمية فلهما مني خالص الشكر والاحترام.

كما أود أن أتقدم بجزيل الشكر والعرفان إلى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة الكلية التربية للعلوم الصرفة لإتاحتها الفرصة لي لإكمال دراسة الدكتوراه، ومركز بحوث التقنيات الإحيائية / جامعة النهريين إدارةً ومنتسبين الذي حيث تم انجاز الجانب العملي في هذا المركز.

ويعجز اللسان أن يقدم أجمل كلمة شكر و عرفاناً بالجميل إلى الدكتور حازم إسماعيل الأحمد (مركز بحوث التقنيات الإحيائية / جامعة النهريين) الذي لم يبخل بجهد أو مساعدة في تجربة الحيوانات المختبرية، وخالص الشكر والامتنان إلى الدكتورة نجوى شهاب احمد (مركز بحوث التقنيات الإحيائية / جامعة النهريين) لجهودها المبذولة ومساعدتها في الجانب الجزيئي من البحث.

كما أتقدم بجزيل الشكر والاحترام إلى الدكتور عباس رزاق عبد (المعهد التقني - بابل / جامعة الفرات الأوسط التقنية) والسيدة زينب هاتف (مركز الـ DNA / جامعة بغداد) .

وفي الختام لزمناً عليّ أن اشكر أعز الناس عائلتي بجميع أفرادها لتحملهم معي عباً الدراسة ولدعواتهم الصادقة وتضحياتهم الكبيرة لأجلي، كذلك لا بد من ذكر زملائي طلبة الدراسات العليا حمزة، ممتاز، خنساء، ناجحة، عبد الكريم بكلمة شكر وامتنان سائلاً المولى عز وجل توفيقهم جميعاً .

الخلاصة

تم توصيف عزلات الفطر *Alternaria alternata* التي لها القدرة على انتاج سم الالترناريول (AOH) Alternariol مظهرياً باعتماد الصفات المظهرية والمجهريّة، وجزئياً باستخدام تقنية البلمرة وتقنية تتابع الدنا DNA Sequencing، وتحديد نسبة تردد وظهور هذا الفطر خلال عملية العزل الاولي من ثمار نبات الطماطة المصابة. وتم تحديد الجين المسؤول عن انتاج سم الالترناريول AOH باستخدام بادئ متخصص .

وتضمنت الدراسة استخلاص سم AOH والكشف عنه باستخدام كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromotography (TLC) وجهاز سائل الكروموتوغرافيا عالي الكفاءة (High performance liquid chromatography (HPLC). ودراسة تاثير الظروف البيئية المختلفة (درجة الحرارة، دالة الحموضة، نوع الوسط الزراعي، الضوء والظلام) في نمو الفطر *A. alternata* وانتاج السم AOH.

وتم حساب الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية لسم AOH وتأثيراته الوراثية الخلوية في خلايا نقي عظم ذكور الفئران والتي شملت حساب معامل الانقسام الخلوي والانحرافات الكروموسومية ومعامل تكون الانوية الصغيرة.

اوضحت النتائج انتشار الفطر *A. alternata* بشكل واسع في محافظة كربلاء اذ تم الحصول على 23 عزلة انطبقت عليها الصفات المظهرية للفطر *A. alternata* وبنسبة تردد بلغت 38% وبنسبة ظهور 21.5%. وبينت نتائج التشخيص الجزئي نجاح زوج البادئ AAR3, AAF2 في تشخيص الفطر *A. alternata* جزئياً باستخدام تقنية البلمرة بوزن جزئي 340bp اما نتائج تقنية DNA Sequencing فقد اكدت نتائج التشخيص المظهري ونجاح زوج البادئ في التشخيص الجزئي، وباستخدام موقع الـ NCBI BLAST تبين ان جميع العزلات كانت تعود للفطر *A. alternata* وان هناك مجموعتين مختلفتين وقد تطابقت عزلة المجموعة الاولى من ناحية البعد الوراثي بنسبة 100% مع العزلات الصينية وبنسبة 99% مع العزلات السعودية اما عزلة المجموعة الثانية فقد تطابقت بنسبة 100% مع عزلات تركية واخرى مكسيكية. وقسمت نتائج تحليل برنامج Mega 6 هذه العزلات على مجموعتين

ضمت المجموعة الاولى العزلات (8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 22, 24, 1, 3, 5, 6, 7) فيما ضمت المجموعة الثانية العزلات (4, 12, 18, 19, 21, 23).

ونجح الزوج البادئي لجين *pksJ* في الكشف عن الجين المسؤول عن انتاج سم الالترناريول على وزن جزيئي 514bp .

واضحت النتائج ان معامل سريان سم AOH بلغ 0.43 باستخدام مذيب الميثانول والطور المتحرك *tuleun : athylacetate : formic acid* وبنسبة 1 : 3 : 6 وقد تطابق السم المستخلص في الدراسة مع السم القياسي حسب قراءة جهاز سائل الكروماتوغرافي عالي الكفاءة HPLC.

واثرت الظروف البيئية المختلفة على نمو الفطر *A. alternata* وانتاجه السم AOH فقد حققت درجة الحرارة 25 م° افضل حالة نمو للفطر بلغ فيها قطر المستعمرة 8.2 سم لمدة حضان بلغت 7 ايام متفوقة معنوياً على بقية الدرجات الحرارية الاخرى 20, 30, 35 فيما انخفض معدل النمو بارتفاع وانخفاض درجة الحرارة وصولاً الى 2.1 سم عند درجة 35 م°. وحققت الدرجة 30 م° اعلى كمية انتاج للسم بلغت 141.1 مايكروغرام/مل فيما بلغ اقل كمية انتاج 74.5 مايكروغرام/مل عند 35 م°.

وتفوق الرقم الهيدروجيني 6 معنوياً على بقية معاملاته 5, 7, 8 اذ حقق افضل حالة نمو للفطر *A. alternata* بلغت 8.5 سم وانخفض معدل النمو لقيم pH الاخرى وصل الى اقل معدل نمو بلغ 4.3 عند pH يساوي 8 كذلك تأثرت كمية انتاج السم بعامل الحموضة وحقق الرقم الهيدروجيني 6 اعلى كمية بلغت 116.1 مايكروغرام/مل وبفارق معنوي عن بقية المعاملات وصولاً الى اقل كمية انتاج 57.8 عند pH يساوي 8. كما واثرت نوع الوسط الزراعي على نمو الفطر وانتاجه سم AOH حيث حقق وسط PSA افضل حالة نمو بلغت 8.2 سم واعلى كمية انتاج بلغت 112.8 مايكروغرام/مل وبفارق معنوي عن معاملة عن بقية الاوساط الاخرى.

وحققت معاملة الظلام تفوقاً معنوياً على معاملة الضوء لمعدل النمو اذا بلغ قطر المستعمرة 8.2 سم للظلام و 6.5 سم للضوء وحققت ظروف الظلام اعلى كمية انتاج لسم

AOH بلغت 182.8 مايكروغرام/مل وبفارق معنوي كبير عن معاملة الضوء التي بلغ فيها معدل الانتاج 74.5 مايكروغرام/مل.

واظهرت النتائج ان الجرعة 368 مليغرام/ كغم لسـم AOH كانت الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية للفئران واثـر هذا السم في مختلف المعايير الوراثةـية الخلوية لخلايا نقي عظم ذكور الفئران ، اذ انخفض معامل الانقسام الخلوي وبفارق معنوي مع زيادة تركيز الجرعة مقارنةً بمعاملة السيطرة البالغ قيمته فيها 14.2% حيث انخفضت هذه القيمة لتصل الى 2.1% عند الجرعة 80 مليغرام/كغم. وسبب السم ظهور انواع مختلفة من الانحرافات الكروموسومية ازدادت معدلاتها وبفارق معنوي مع زيادة تركيز الجرعة اذ حققت الجرعة 80 مليغرام/كغم اعلى نسبة انحرافات بلغت 3.55% مقارنة بمعاملة السيطرة 0.10%. وازداد معامل تكون الانوية الصغيرة وبفارق معنوي ايضاً لجميع المعاملات اذ بلغ مع الجرعة 80 مليغرام/كغم 16.2 مقارنة بمعاملة السيطرة البالغة 3.7.

المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
I	الخلاصة باللغة العربية	
IV	قائمة المحتويات	
IV	قائمة الجداول	
XI	قائمة الأشكال	
1	الفصل الاول المقدمة	1
4	الفصل الثاني استعراض المراجع	2
4	الفطر <i>A.alternata</i>	1-2
6	تشخيص الفطر <i>Alternaria alternata</i>	2-2
6	التشخيص المظهري للفطر <i>Alternaria alternata</i>	1-2-2
7	التشخيص الجزيئي للفطر <i>Alternaria alternata</i>	2-2-2
9	اهمية منطقة ITS في التشخيص الجزيئي	3-2-2
11	السموم الفطرية Mycotoxin	3-2
12	سم الالترناريول AOH	1-3-2
14	التاثيرات السمية لسم الالترناريول AOH	2-3-2
16	تاثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاجه سم الالترناريول AOH	4-2
17	تاثير درجة الحرارة في نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج سم الالترناريول AOH	1-4-2
18	تاثير دالة الحموضة PH في نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج سم الالترناريول AOH	2-4-2
19	تاثير نوع الوسط الغذائي في نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج سم الالترناريول AOH	3-4-2
20	تاثير الضوء والظلام في نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج سم الالترناريول AOH	4-4-2
21	المعايير الوراثية الخلوية Cytogenetic Parameters	5-2
21	معامل الانقسام الخلوي Mitotic Index	1-5-2
22	الانحرافات الكروموسومية Chromosomal Aberration	2-5-2
23	اختبار النوى الصغرى Micronucleus assay	3-5-2
25	الفصل الثالث المواد وطرائق العمل	3

المحتويات

25	Materials المواد	1-3
25	Equipments and Instruments الأجهزة والمعدات	1-1-3
27	Chemicals المواد الكيميائية	2-1-3
29	Kits العُدَد	3-1-3
30	المحاليل والاساط الزرعية	4-1-3
32	Primers البادئات	5-1-3
33	Methods طرائق العمل	2-3
33	Samples collection جمع العينات	1-2-3
34	عزل الفطر من الثمار المصابة	2-2-3
34	تنقية وحفظ عزلات الفطر <i>A.alternata</i>	3-2-3
35	حساب النسبة المئوية للتردد والظهور	4-2-3
35	تشخيص الفطر <i>A.alternata</i>	3-3
35	التشخيص المظهري للفطر <i>A.alternata</i>	1-3-3
36	طريقة التشخيص باستخدام فحص PCR	2-3-3
36	Fungus DNA extraction استخلاص الحمض النووي من الفطر	1-2-3-3
38	DNA profile فحص الحمض النووي المستخلص	2-2-3-3
39	PCR master mix تحضير مزيج	3-2-3-3
40	PCR Thermocycler Conditions حالات الدورات الحرارية لفحص البلمرة	4-2-3-3
41	تحليل نتائج فحص الـ PCR	5-2-3-3
41	DNA sequencer method طريقة تسلسل الحمض النووي	6-2-3-3
42	سم الالترناريول	4-3
42	سم الالترناريول القياسي	1-4-3
43	الكشف عن انتاج سم الالترناريول AOH باستعمال تقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة TLC	2-4-3
44	استخلاص وتنقيه سم الالترناريول AoH	3-4-3

45	الكشف عن سم الالترناريول AOH باستخدام جهاز HPLC	4-4-3
45	المنحنى القياسي لسم الالترناريول AOH	5-4-3
46	تأثير الظروف البيئية في نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	6-4-3
46	تأثير درجة الحرارة في معدل نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	1-6-4-3
47	تأثير دالة الحموضة pH في معدل نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	2-6-4-3
47	تأثير نوع الوسط الغذائي في معدل نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	3-6-4-3
48	تأثير الضوء والظلام في معدل نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	4-6-4-3
48	دراسة التأثيرات السمية الوراثية لسم AOH في ذكور الفئران البيضاء	5-3
48	حساب الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية LD ₅₀ لسم AOH	1-5-3
48	Mitotic index assay اختبار معامل الانقسام الخلوي	2-5-3
49	تحضير الكروموسومات من الخلايا الجسمية لنقي العظم	1-2-5-3
49	استخراج خلايا نقي العظم Bone marrow cell recover	2-2-5-3
50	حصاد الخلايا Cell harvest	3-2-5-3
51	التقطير وتصبيغ الشرائح الزجاجية Dropping and slide staining	4-2-5-3
52	حساب معدل انحراف الكروموسومات Calculation chromosomal aberration	3-5-3
53	فحص الانوية الصغيرة Micronucleus Assay	4-5-3
53	التحليل الإحصائي	6-3
54	الفصل الرابع النتائج والمناقشة	4
54	عزل وتشخيص الفطر <i>A.alternata</i>	1-4
54	عزل الفطر <i>A.alternata</i> من الثمار المصابة	1-1-4
55	النسبة المئوية للتردد والظهور للفطر <i>A.alternata</i>	2-1-4
56	تشخيص الفطر <i>A.alternata</i>	3-1-4
56	التشخيص المظهري للفطر <i>A.alternata</i>	1-3-1-4

المحتويات

61	التشخيص الجزيئي للفطر <i>A.alternata</i>	2-3-1-4
61	التشخيص الجزيئي للفطر باستخدام بادئ متخصص <i>A.alternata</i>	1-2-3-1-4
62	التشخيص الجزيئي باستخدام جهاز التحليل الوراثي	2-2-2-1-4
73	لكشف عن جين <i>pksJ</i> gene المسؤول عن انتاج السم Alternariol	2-4
74	استخلاص وتنقيه سم الالترناريول AOH	3-4
74	الرقيقة TLC الكشف عن انتاج سم الالترناريول AOH باستخدام كروموتوغرافيا الطبقة	1-3-4
75	حساب معامل السريان لسم الالترناريول AOH	2-3-4
77	الكشف عن سم الالترناريول AOH باستخدام جهاز HPLC	3-3-4
79	تأثير بعض الظروف البيئية في نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	4-4
79	تأثير درجة الحرارة في معدل نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	1-4-4
81	تأثير دالة الحموضة pH في معدل نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	2-4-4
82	تأثير نوع الوسط الغذائي في معدل نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	3-4-4
84	تأثير عاملي الضوء والظلام في معدل نمو الفطر <i>A.alternata</i> وانتاج السم AOH	4-4-4
86	حساب الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية LD ₅₀ لسم AOH	5-4
87	تأثير سم AOH في المعايير الوراثية لذكور الفئران البيضاء	6-4
87	معامل الانقسام الخلوي Mitotic index	1-6-4
90	الانحرافات الكروموسومية chromosomal Aberration	2-6-4
93	معامل تكوين الانوية الصغيرة	3-6-4
95	الاستنتاجات والتوصيات	
95	الاستنتاجات	
96	التوصيات	
97	المصادر	
97	المصادر العربية	
98	المصادر الاجنبية	

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
13	الصيغة التركيبية لسم AOH مأخوذة من (Silvana et al. 2000)	1
46	المنحى القياسي لحساب تركيز سم الالترناريول AOH	2
59	الصفات المظهرية للفطر <i>A.alternata</i>	3
60	الصفات المظهرية للفطر <i>A.tenuissima</i>	4
62	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنتاج البلمرة PCR بوزن 340bp للكشف عن تضخم جين 18S Ribosomal DNA تحت الاشعة فوق البنفسجية وباستخدام صبغة الاثديوم بروميد	5
63	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنتاج البلمرة PCR بوزن 600bp للكشف عن تضخم منطقة ITS1 , ITS4 تحت الاشعة فوق البنفسجية وباستخدام صبغة بروميد الاثديوم لثمان عينات عشوائية (1,2,8,12,16,19,21,24)	6
68	تطابق العزلات المحلية للفطر <i>A.alternata</i> مع العزلات العالمية حسب موقع NCBI Blast العالمي	7
71	تطابق تسلسل جين لمنطقة ITS4 ITS1 لعزلات الفطر <i>A.alternata</i> المعزولة من مدينة كربلاء	8
72	الشجرة التطورية لعزلات الفطر <i>A.alternata</i> حسب برنامج Mega 6	9
74	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز PCR بوزن 514bp للكشف عن تضخم <i>pksJ</i> تحت الاشعة فوق البنفسجية وباستخدام صبغة الاثديوم بروميد	10
76	لوحة TLC (هلام السيليكا 10x10 cm G60) تحت ضوء الأشعة فوق	11

	البنفسجية (336 نانومتر) يوضح بقع سم الالترناريول والبقعة القياسية باستخدام الطور المتحرك (التولوين، خلات الإيثيل، حامض الفورميك 1:3:6) للعضلات 1-24	
78	الكشف عن سم AOH المستخلص بجهاز HPLC ومقارنته مع السم القياسي	12
87	المنحنى القياسي لقيمة الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية LD ₅₀	13
89	خلايا منقسمة لنقي عظم ذكور الفئران نتيجة التعرض لسم AOH (المجهر المركب الاعتيادي 40x)	14
92	الانحرافات الكروموسومية لخلايا نقي العظم لذكور الفئران المجرعة بتركيز من مختلفة من سم AOH (100X)	15
94	الانوية الصغيرة لخلايا نقي العظم لذكور الفئران عند معاملتها بسم الالترناريول	16

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	التسلسل
25	الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ	1
27	المواد الكيميائية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.	2
29	العُدد التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ	3
33	البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي ونتاج فحص الـ PCR	4
39	عدة الـ PCR PerMIX وحسب حجم كل مادة	5
40	اعداد واوقات الدورات الحرارية لجين 18S rDNA gene	6
41	اعداد واوقات الدورات الحرارية لجين <i>PKSJ gene</i>	7
54	عدد وأرقام العزلات وفق مناطق العزل لمحافظة كربلاء	8
55	نسبة التردد والظهور للفطر <i>A.alternata</i>	9
69	تطابق عزلات الفطر <i>Alternaria alternate</i> مع العزلات العالمية	10
80	تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر <i>A.alternata</i> بعمر 7 ايام ونتاجه سم AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA	11
82	تأثير دالة الحموضة في نمو الفطر <i>A.alternata</i> بعمر 7 ايام ونتاجه سم AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA	12
84	تأثير نوع الوسط في نمو الفطر <i>A.alternata</i> بعمر 7 ايام ونتاجه سم AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA	13
85	تأثير عاملي الضوء والظلام في نمو <i>A.alternata</i> بعمر 7 ايام ونتاجه سم	14

	AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA الفطر	
86	النسبة المئوية لموت الفئران لمجموعة جرع من سم الالترناريول بعد ساعة 24 من الحقن	15
88	تأثير تراكيز مختلفة من سم الالترناريول في معامل الانقسام الخلوي لخلايا نقي العظم لذكور الفئران	16
91	تأثير تراكيز مختلفة من سم الالترناريول في النسبة المئوية لتردد كل نوع من الانحرافات الكروموسومية واعدادها في خلايا نقي عظم ذكور الفئران	17
92	تأثير تراكيز مختلفة من سم الالترناريول في معامل تكوين الانوية الصغيرة لخلايا نقي العظم لذكور الفئران	18

المقدمة

يعد الفطر *Alternaria* واحداً من الفطريات المتواجدة في التربة والواسعة الانتشار اذ له القدرة على العيش في مختلف النظم البيئية والمناطق الجغرافية فهو يصيب العديد من العوائل النباتية مسبباً بذلك امراضاً واضراراً لكثير منها سواءً قبل الحصاد والجني او بعده (Logrieco et al 2009)، والى جانب الخسائر الاقتصادية المباشرة الناجمة عن تطفل هذا الفطر على العديد محاصيل الخضر والفواكه والحبوب فان له القدرة على انتاج العديد من السموم ومنها Alternariol AOH , Alternariol monomethyl ether AME , Alvertoxin وغيرها (Kwasna, 1992) وتعد الانواع *A.alternata*, *A.solani* , *A.dauci* , *A.tenuissima* مصدراً لهذه السموم (Montemurro and Visconti. 1992). وقد تتعدى مخاطر هذا الفطر الى ابعد من ذلك بحيث يكون ممرضاً انتهازياً للحيوان والانسان مرافقاً لحالات ضعف المناعة (Schell et al., 2003).

لقد اعتمدت الخصائص المظهرية في تشخيص الجنس *Alternaria*، إذ شملت هذه الخصائص لون المستعمرة وحوافها وقوامها (Kaul and Saxena, 1989; De Hoog and Vitale, 2007). كذلك شكل الابواغ وابعادها وعدد الحواجز الطولية والمستعرضة فضلاً عن طريقة اتصال الابواغ بالحامل البوعي conidiophores الذي يكون انفرادياً أو على شكل سلسلة (Larone, 2002; Schell et al., 2003) كذلك فان الاختلافات في متطلبات النمو تعد مهمة جدا في تحديد الأنواع المختلفة والتابعة لجنس *Alternaria* لكن من ناحية أخرى لا يعول كثيراً على الصفات المظهرية منها صفات الابواغ وغيرها كأساس لتمييز الأنواع المختلفة ضمن الجنس *Alternaria spp.* فقد يخضع شكل الابواغ وحجمها لعوامل متعددة منها عمر الابواغ وحموضة الوسط ودرجة الحرارة وتركيب الوسط الغذائي والرطوبة والضوء (Lucas, 1975).

وعلى الرغم مما قدمته الدلائل المظهرية من دور كبير في تشخيص أنواع الفطريات الا ان هذه الدلائل تشوبها العديد من الصعوبات منها عدم الدقة وتشابه الصفات المظهرية وانعدام التمايز بينها وتغاير تلك الصفات (Fujita and Hashimoto, 2000). ونتيجة لما أظهرته

التقنيات الحديثة في العقد الأخير من دور كبير في التشخيص الجزيئي، فقد أصبح الاعتماد على الطرائق الجزيئية في تشخيص الأنواع واحداً من بين أهم طرائق التشخيص وانجحها والأوسع انتشاراً في مجال تشخيص الكائنات الحية ومنها الفطريات (Belloch *et al.*, 2002)، حيث تعتمد هذه الطرائق على مناطق معينة لجينات محددة ذات قيمة تصنيفية من حيث ترددها العالي وقلّة التباير بها عادةً كجين الـ 18S Ribosomal DNA gene ومناطق الـ ITS و IGS وغيرها ضمن الـ Ribosomal DNA (Green *et al.*, 2004).

يعد وجود الفطر *Alternaria* على ثمار الطماطة مشكلة رئيسة كون ثمار هذا المحصول تعد وسطاً غذائياً ملائماً جداً لنمو الفطر والاحتفاظ بحيويته لفترة طويلة وانتاج السم وبالتالي فان استهلاك الثمار الحاوية على السم AOH يشكل مخاطراً كبيرة على صحة الإنسان (Scott and Stoltz, 1980) اذ اكد Liu وآخرون (1991) ان حدوث سرطان المرئ مرتبط بوجود مستويات عالية لسم AOH في محاصيل الحبوب. وان حالات سرطان ظهرت على الحيوانات المختبرية عند معاملةها بسم الالترناريول (AOH) (Scott, 2004).

يتواجد السم (AOH) Alternariol في العديد من المواد الغذائية التي من الممكن ان تصاب محاصيلها بالفطر *Alternaria spp.* فهو يصيب محصول الطماطة بشكل رئيس وثمار التفاح والزيتون وبنور زهرة دوار الشمس ومحاصيل الحبوب كالحنطة والشعير والشوفان والرز والذرة الصفراء وبعض المكسرات كالجوز ونباتات اخرى كالبطيخ والشمام وغيرها (Scott, 1980).

واستطاع Zhao وآخرون (2009) من التوصل الى ان واحدة من التأثيرات السمية الخلوية لهذا السم هو استحثاث توقف انقسام الخلية عند طور G2/M. وان التأثير الرئيس لسم AOH يكمن في توليد جذور الأوكسجين الحرة (Reactive Oxygen Species (ROS) في سايتوكروم خلايا كبد الفئران، كما يمتلك هذا السم تأثير سام للخلية من خلال تسببه في موتها المبرمج Apoptosis وشيخوختها Senescence وتكوين الانوية الصغيرة Micronuclei formation (Schreck *et al* 2012).

ونظراً لكون فطر *Alternaria alternata* من الفطريات الواسعة الانتشار ولقابليته على إنتاج السموم المسرطنة ولندرة الدراسات التشخيصية الجزيئية لعزلاته وتأثيرات سمومه الوراثية الخلوية على المستوى المحلي فقد هدفت الدراسة الى :-

1- توصيف عزلات الفطر *A. alternata* المنتجة لسم Alternariol على ثمار الطماطة في بعض مناطق محافظة كربلاء مظهرياً.

2- التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *A. alternata* من خلال :-

أ- استخدام بادئ متخصص لتأكيد تشخيص عزلات الفطر *A. alternata* باستخدام تقنية البلمرة polymerase chain reaction PCR.

ب- تحديد تسلسل الدنا DNA Sequencing لعزلات الفطر وعلى مستوى التسلسل النيوكليوتيدي لمنطقة ITS1 و ITS4 ومقارنتها بالعزلات العالمية.

3- تصميم بادئ متخصص لتحديد الجين المسؤول عن إنتاج السم Alternariol في عزلات الفطر *A. alternata*.

4- دراسة تأثير بعض الظروف البيئية (درجة الحرارة ، pH ، نوع الوسط الزراعي ، الضوء والظلام) في نمو الفطر *A. alternata* وإنتاجه لسم Alternariol (AOH).

5- تحديد الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية LD₅₀ لسم AOH.

6- دراسة التأثيرات السمية الوراثية للسم Alternariol في ذكور الفئران المختبرية من خلال :-

أ- حساب معامل الانقسام الخلوي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران عند تعرضها لتراكيز مختلفة من سم AOH.

ب- الكشف عن الانحرافات الكروموسومية وتحديد نسبة تردد كل انحراف.

ج- حساب نسبة تكون الانوية الصغيرة لخلايا نقي عظم ذكور الفئران عند تعرضها لتراكيز مختلفة من سم AOH.

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1: المواد Materials

3-1-1: الأجهزة والمعدات Equipments and Instruments

جدول (1) الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الجهاز	ت
Gallen Kaamp (England)	مؤسدة Autoclave	1
Olympus (Japan)	مجهر ضوئي مركب Compound light microscope	2
Fisons(Japan)	جهاز تقطير Distiller	3
Gallen Kaamp(England)	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	4
Memmert (Germany)	حمام مائي Water bath	5
Shimadzu ic (China)	High performance liquid chromatography(HPLC)	6
Co.LTD/ Shndon,scientific England	جهاز ترحيل كهربائي Electrophoresis Gel	7
CYAN China	مازج Vortex	8
Bioneer/ korea	جهاز الدوران الحراري PCR Thermocycler	9
Bioneer/ korea	Exispin vortex centrifuge	10

ECX-15.M/ European	وحدة الأشعة فوق البنفسجية UV- Transilluminator	11
Hanna-Portugal	مقياس الالاس الهيدروجيني pH- Meter	12
Sony (Japan)	كاميرا رقمية Digital camera	13
Eppendorf/ Germany	جهاز نبد مركزي مبرد Cooling Centrifuge	14
Jeitech (Korea)	الكابينة المعقمة Laminar flow cabinet	15
GALLENKAMK/England	حاضنة Incubator	16
Milton Roy company (U.S.A.)	جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer	17
Sories (China)	ساعة توقيت Stop watch	18
MEMMERT/Germany	فرن كهربائي Oven	19
National/ Japan	خلاط Blander	20
L.G/ Korea	Microwave	21
CYAN/ China	Micropipette 0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L	22

3-1-2: المواد الكيميائية Chemicals

جدول (2) المواد الكيميائية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعه وبلد المنشأ.

الشركة المصنعة	المواد الكيميائية المستخدمة	ت
Biobasic/ Canada	Agarose	1
Biobasic/ Canada	Ethidium bromide	2
Biobasic/ Canada	TBE buffer	3
Biobasic/ Canada	Isopropanol	4
Bioneer/ Korea	Free nuclease water	5
Biobasic/ Canada	Loading dye	6
Bioneer/ Korea	Ladder 100bp	7
Fluka, AG, Buchs/ Switzerland	Ethyl acetate ايثيل اسيتيت	8
BDH – chem. Ltdbool/England	toluoin تلوين	9
BDH – chem. Ltdbool/England	Formic acid حامض الفورميك	10
BDH – chem. Ltdbool/England	Ethanol ايثانول	11
Fluka, AG, Buchs/ Switzerland	Methanol ميثانول	12
Sigma / Germany	Standard Alternariol AOH	13
Himedia/ India	Yeast extract وسط خلاصة الخميرة agar	14
Himedial/ India	Sabouraud dextrose وسط السابرويد agar	15
Himedia/ India	Agar-Agar اكار اكار	16
سوريا/ابن حيان	Colchicine كولجسين	17

الشركة المصنعة	المواد الكيميائية المستخدمة	ت
تجاري	هيدروكسيد الصوديوم NaOH	18
Hemedia/ India	كلوريد البوتاسيوم KCl	19
معمل أدوية سامراء	كلورامفينيكول Chloramphenicol	20
تجاري	سكروز Sucrose	21
Fluka Germany	Phosphate buffer saline (PBS)	22
Institute of sera and vaccines Iraq	صبغة اللاكتوفينول Lactophenol cotton blue stain	23
BDH – chem. Ltdbool/England	كحول Alcohol	24
BDH – chem. Ltdbool/England	اكاروز Agarose	25
Sigma/USA	مصل العجل البقري Foetal Calf serum	26
Sigma/USA	صبغة كمزا Giemsa Stain	27
Fluka, AG, Buchs/ Switzerland	كبريتات الحديد المائية FeSO ₄ .7H ₂ O	28
BDH – chem. Ltdbool/England	كبريتات المغنيسيوم المائية MgSO ₄ .7H ₂	29
Hemedia/ India	نترات الصوديوم NaNO ₃	30
Hemedia/ India	فوسفات البوتاسيوم K ₂ HPO ₄	31

Kits 3-1-3: العدد

جدول (3) العدد التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

الشركة وبلد المنشأ	مكونات	اسم العدة	ت
Biobasic Canada	EZ-10 Column 50	عدة استخلاص الحمض النووي الفطري EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit	1
	2.0 ml Collection Tube 50		
	Universal Digestion Buffer 12 ml		
	Universal Buffer PF 6 ml		
	Universal Buffer BD 12 ml		
	(concentrate) 18 Universal PW Solution ml		
	(concentrate) Universal Wash Solution 7.5 ml		
	TE Buffer 10 ml		
	Proteinase K (10mg/ml) 1.2 ml		
Bioneer (Korea)	Taq DNA polymerase	1 U	عدة فحص Accupower® PCR PerMIX
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 mM	
	Tris-HCl (pH 9.0)	10 mM	
	KCl	1.5mM	
	MgCl ₂	30mM	
	Stabilizer and tracking dye		

3-1-4: المحاليل والايوساط الزراعية

الكولجيسين Colchicine

حُضِرَ المحلول باذابة حبة من الكولجيسين (0.5 ملغم) في 0.5 مل من محلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي المعقم واستعمل المحلول انياً (Allen et al., 1977).

محلول كلوريد البوتاسيوم منخفض الشد Hypotonic solution KCl (0.075M)

حُضِرَ المحلول باذابة 5.75 غم من كلوريد البوتاسيوم في 1000 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ في الثلاجة بحرارة 4 م° (Allen et al., 1977).

محلول التثبيت Fixative solution

حُضِرَ المحلول بمزج ثلاثة حجوم من الكحول المثيلي المطلق مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي وتم تحضيره انياً وُبُرِدَ في الثلاجة قبل استعماله (Allen et al., 1977).

محلول دارئ الفوسفات Phosphate Buffer Saline(PBS)

حُضِرَ المحلول باذابة حبة واحدة من الدارئ في 200 مل من الماء المقطر المعقم.

المحلول الخزين لملون كمزا Stock solution of Giemsa stain

حُضِرَ الملون باذابة 1غم من مسحوق كمزا في 33 مل من الكلسيرين ووضع في حمام مائي بحرارة 60 م° لمدة ساعتين مع الرج المستمر ثم ترك المحلول لمدة نصف ساعة في درجة حرارة الغرفة بعدها اضيف اليه 66 مل من الكحول المثيلي المطلق مع استمرار التحريك. رُشَّحَ المحلول الملون باستخدام ورق ترشيح (Whatman filter paper No.3) ووضع في قنينة معقمة ومعتمة وحفظ بحرارة 37 م°، وعند الاستخدام مزج 1 مل من المحلول الخزين مع 1.25

مل من الكحول الميثيلي المطلق و 0.5 مل من محلول بيكاربونات الصوديوم و 40 مل من الماء المقطر (Allen et al., 1977).

الوسط الزراعي (Potato Sucrose Agar (PSA)

حضر هذا الوسط من مستخلص البطاطا المتكون من 200 غم بطاطا وذلك بعد غسلها وتقطيعها قطعاً صغيرة. وضعت في دورق زجاجي وأضيف إليها لتر ماء مقطر، غليت لمدة 20 دقيقة على نار هادئة بعدها رشح المزيج بواسطة قطع من الشاش النظيف وأخذ الراشح بعد تبريده وأضيف إليه 20 غم Agar 10 غم سكروز تدريجياً مع التحريك وأكمل الحجم إلى اللتر بإضافة الماء المقطر.

عقم المزيج بواسطة المؤصدة (Autoclave) تحت درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد ثم أضيف إليه المضاد الحيوي امبسلين بواقع 400 ملغ/ لتر.

وسط الزابك (Czapeck's Dox Agar)

حضر بإذابة 30 غم من الدكستروز و 2 غم من نترات الصوديوم (Na_2NO_3) و 1 غم من فوسفات الدايبوتاسيوم (K_2HPO_4) و 0.5 غم من سلفات المغنيسيوم (MgSO_4) و 0.5 غم من كلوريد البوتاسيوم (KCl) و 0.01 غم من سلفات الحديدوز (FeSO_4) 15 غم من الأكار.

عقم المزيج بواسطة المؤصدة (Autoclave) تحت درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد ثم أضيف إليه المضاد الحيوي امبسلين بواقع 400 ملغ/ لتر.

وسط الاكار المائي Water Agar

حضر بإذابة 15غم من الاكار في 1000 مل من الماء المقطر المعقم في دورق عقم المزيج بواسطة المؤصدة (Autoclave) تحت درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد ثم أضيف إليه المضاد الحياتي امبسلين بواقع 400 ملغ/ لتر.

وسط السابرويد Sabouraud Dextrose agar

حضر الوسط الجاهز من انتاج شركة HIMEDIA – India بإذابة 62 غم من مسحوق الوسط في 1000 مل من الماء عقم المزيج بواسطة المؤصدة (Autoclave) تحت درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد .

وسط خلاصة الخميرة Yest extract agar

حضر الوسط الجاهز من انتاج شركة HIMEDIA – India بإذابة 40 غم من مسحوق الوسط في 1000 مل من الماء عقم المزيج بواسطة المؤصدة (Autoclave) تحت درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد.

3-1-5: البادئات Primers

تم استخدام ثلاثة انواع من البادئات ، الاول (AAR3,AAF2) الخاص بتحديد جين (18S rDNA gene) لتشخيص فطر *A.alternata* والثاني (PKSJ) والخاص بتحديد الجين المسؤول عن انتاج سم (AOH)، والثالث (ITS4, ITS1) الخاص بتحديد تتابع الحامض النووي لمنطقة الـ ITS حيث تم تصميم البادئ الاول والثالث من قبل (Konstantinova et al. 2002). اما البادئ الثاني فقد تم تصميمه في هذا الدراسة من خلال

استخدام التسلسل الكامل لجين JX103645.1 *pksJ* Gene bank sequence من موقع بنك الجينات Genbank-NCBI وباستخدام برنامج Primer3plus لتصميم البادئات والخاصة في فحص الـ PCR وتم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية.

جدول (4) البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي ونتائج فحص الـ PCR

Primer	gene		Sequence	PCR product size
AAF2, AAR3	18S rDNA	F	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'	340bp
		R	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	
PKSJ	<i>pksJ</i>	F	5'CTGCGGGAATGCTTTCGATG3'	514bp
		R	5'TGCCAATCTCGAAGGCCAAT3'	
ITS1, ITS4	ITS	F	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'	500- 600bp
		R	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	

2-3: طرائق العمل Methods

1-2-3: جمع العينات Samples collection

تم تخصيص اربع مناطق تابعة لمحافظة كربلاء المقدسة لغرض جمع عينات مصابة

بالفطر *A. alternata* خلال الفترة 1 / 3 - 1 / 9 / 2013

١- المنطقة الاولى شملت المزارع الصحراوية الواقعة على طريق الرزازة - كربلاء.

٢- المنطقة الثانية شملت المزارع الصحراوية الواقعة على طريق النجف كربلاء .

٣- المنطقة الثالثة شملت منطقة الحسينية والعطيشي .

٤- المنطقة الرابعة ناحية الخيرات في قضاء الهندية .

3-2-2: عزل الفطر من الثمار المصابة

جمعت ثمار نبات الطماطة من مزارع محافظة كربلاء تبدو عليها علامات الاصابة بمرض التعفن وحسب المناطق المشار اليها في الفقرة (3-2-1)، حيث غسلت هذه العينات بشكل جيد بالماء الجاري واخذ منها قطع صغيرة بطول 0.5 سم مناطق الاصابة وعقمت بمحلول هايپوكلورات الصوديوم 5% لمدة (2-3) دقائق بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثم جففت على ورق ترشيح معقم وزرعت في أطباق بتري حاوية على الوسط PSA بثلاث مكررات لكل عينة وحضنت جميع الأطباق بدرجة 25 م° لمدة 5 ايام

3-2-3 : تنقية وحفظ عزلات الفطر *A.alternata*

فحصت مزارع الفطريات النامية بعد العزل الاولي بواسطة مجهر مركب لتحديد الانواع الفطرية النامية بعدها تم تنقية العزلات العائدة للفطر *A.alternata* باعادة الزرع مرة اخرى للحصول على مزارع نقية وحفظت هذه العزلات في انابيب اختبار زجاجية حاوية على الوسط Slant PSA المائل في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستخدام في التجارب اللاحقة.

3-2-4: حساب النسبة المئوية للتردد والظهور

حسبت النسبة المئوية لتردد والظهور للفطر *A.alternata* حسب المعادلات ادناه والواردة في
(Muhsin, 1985) :-

عدد مستعمرات النوع الفطري

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

العدد الكلي لمستعمرات الأنواع الفطرية

عدد العينات التي ظهر فيها الفطر

$$\text{النسبة المئوية للظهور} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{العدد الكلي للعينات}} \times 100$$

العدد الكلي للعينات

3-3 : تشخيص الفطر *A.alternata*

1-3-3: التشخيص المظهري للفطر *A.alternata*

شخص الفطر *A.alternata* وفقا للصفات المظهرية الواردة في (Ellis, 1971)
Barnett and Hunter, 1973; Streets, 1975; Moubasher,1993; Pitt and
slid culture (Hocking, 1997) وباستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية
technique والموصوفة من قبل الباحثين (Koneman *et al.* ,1997; Booth,1971;
(Benson, 2002).

حيث حضرت اطباق حاوية على شريحة زجاجية معقمة وصب فيها الوسط الزراعي
(water agar) اكار الماء ولقحت هذه الاطباق بقرص 1 سم من مستعمرة الفطر النقية وزرع
قريبا من حافة الطبق لضمان عدم تكاثف الغزول الفطرية على الشريحة الزجاجية حضنت هذه
الاطباق لمدة 5 ايام عند درجة حرارة 25 + 2 م ولوحت نمو المستعمرات بطيئا وضعيفا وتكوينها
ابواغ بصورة واضحة بعد التحضين. بعدها رفعت الشريحة الزجاجية مع الوسط النامي عليه
الفطر وصبغت بصبغه اللاكتوفينول ازرق القطن ثم وضع عليها غطاء الشريحة الزجاجية
cover slid مع الضغط الخفيف وعرضت للحرارة بوضعها على صفيحة حرارة hot plate
ساخنة لبعض دقائق لغرض تسيل الاكار ثم فحصت تحت المجهر لملاحظة تراكيب الفطر
وتأكيد التشخيص.

2-3-3: طريقة التشخيص باستخدام فحص PCR

تم إجراء فحص PCR باستخدام البادئات الخاصة بجين الـ 18S rDNA gene
لتشخيص الفطر *A.alternata* ، والتحري عن جين *pksJ* gene المسؤول عن انتاج سم
AOH من قبل الفطر *A.alternata*، حيث تكون الفحص من عدة خطوات وكما يأتي:

3-3-2-1: استخراج الحمض النووي من الفطر Fungus DNA extraction

تم إجراء استخراج الحمض النووي من عينات مستعمرات الفطر وذلك باستخدام العدة

التشخيصية EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit

المجهزة من شركة Bioneer الكورية، وتم إجراء الاستخلاص كالأتي:

1- نقل حوالي 200 مليغرام من مستعمرات النمو الفطري الى حاوية خزفية معقمة وباستخدام النايتروجين السائل ذو درجة حرارة -169°C تحت الصفر تم سحق المستعمرات الفطرية ومن ثم نقلت الى انابيب معقمة سعة 1.5ml .

2- اضيف $180\mu\text{l}$ من محلول Universal Digestion Buffer و $20\mu\text{l}$ مع انزيم Proteinase K الى كل عينة ثم مزجت جيدا بواسطة جهاز المازج وحضنت العينات بدرجة حرارة 56°C لمدة 30 دقيقة.

3- اضيف $100\mu\text{l}$ من محلول Universal Buffer PF ومزجت جيداً، حضنت بدرجة حرارة 20°C لمدة 30 دقيقة.

4- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 rpm لمدة 5 دقائق. من ثم نقل السائل الطافي الى انبوبة سعة 1.5 ml جديدة.

5- اضيف $100\mu\text{l}$ محلول Universal Buffer BD ومزجت جيداً بواسطة المازج.

6- بعد ذلك تم اضافة الكحول الايثيلي المطلق Absolute ethanol 96% الى جميع العينات ومزجت جيداً.

- 7- نقل المزيج الى انابيب خاصة EZ-10 column لاستخلاص الحامض النووي المجهزة مع العدة موضوعة داخل أنابيب جامعة tube collection سعة 2ml ووضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 rpm لمدة دقيقة وتم التخلص من الراسب.
- 8- اضيف 500 µl من محلول Universal PW Solution، وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 rpm لمدة دقيقة تم التخلص من الراسب.
- 9- اضيف 500 µl من محلول Universal Wash Solution وطردت مركزياً بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة وتم التخلص من الراسب.
- 10- وضعت الـ EZ-10 column الحاوية على الحمض النووي في أنابيب معقمة سعة 1.5 ml وطردت مركزياً بسرعة 12000rpm لمدة دقيقتين لغرض تجفيف الـ EZ-10 column membrane من الكحول والتخلص من الراسب.
- 11- اضيف 50 µl من محلول الـ TE Buffer لازابة الحامض النووي داخل الـ EZ-10 filter column ومن ثم حضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة وبعدها وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة لجمع الحمض النووي وبعدها خفضت بدرجة حرارة - 20 م° في الثلاجة لحين الاستعمال في فحص الـ PCR.

3-2-2-3 : فحص الحمض النووي المستخلص DNA profile

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من وقياس تركيز الاحماض النووية DNA and RNA من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA ng/µl وقياس نقاوته. اذ اخذ 1 ميكروليتر من كل عينة من الـ DNA المستخلص ووضعت على ركيزة الجهاز

بعد تنظيفها في كل فحص. وحددت نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280 nm) حيث ان الحمض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3-2-3-3 : تحضير مزيج PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل PCR باستخدام عدة الـ Accupower® PCR PerMIX المجهزة من قبل شركة الـ Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كما في جدول (5).

جدول (5) عدة الـ PCR PerMIX وحسب حجم كل مادة.

PCR master mix	Volume
DNA template	5µL
Forward primer (10pmol)	1.5µL
Reverse primer (10pmol)	1.5µL
Free nucleas water	12µL
Total	20µL

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل PCR في أنابيب حجم 0.2ml خاصة بعدة فحص الـ PCR (Accupower® PCR Premix) والحاوي على بقية مكونات تفاعل الـ PCR

المشار لها في جدول (3)، نقلت جميع الأنابيب الى جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000rpm لمدة ثلاثة دقائق، ثم وضعت في جهاز PCR Thermocycler .

4-2-3-3 : حالات الدورات الحرارية لفحص البلمرة PCR Thermocycler Conditions

اجري فحص تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام جهاز PCR Thermocycler وحسب كل جين جدول (6) وجدول (7).

جدول (6) اعداد واوقات الدورات الحرارية لجين 18S rDNA gene (Konstantinova et al. 2002)

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	5min
Denaturation	30	95 °C	5sec.
Annealing		55 °C	30sec
Extension		72 °C	45sec
Final extension	1	72 °C	7min
Hold	-	4 °C	Forever

جدول (7) اعداد واوقات الدورات الحرارية لجين *pksJ* gene وجين ITS

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	5min
Denaturation	30	95 °C	30sec.
Annealing		58 °C	30sec
Extension		72 °C	45sec
Final extension	1	72 °C	5min
Hold	-	4 °C	Forever

3-3-2-5: تحليل نتائج فحص الـ PCR

تم تحميل 3µl من الـ DNA ladder مع 10µl من نواتج PCR في جل الأكاروز وبتركيز 1% (1X TBE Buffer) إذ تم الترحيل بفرق جهد مقداره 70 فولت/سم وبتيار 40 ملي فولت ولمدة ساعة ونصف صبغ الجل بصبغة بروميد الأثيديوم المتألقة Ethidium bromide وبكمية 2µl وبعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على الحزم بواسطة UV transilluminator، لتحديد الناتج مع وحدة القياس وتم تصويرها باستخدام كاميرا رقمية.

3-3-2-6 : طريقة تسلسل الحمض النووي DNA sequencer method

تم إجراء طريقة تسلسل الحمض النووي لتحديد العلاقة الوراثية Phylogenetic tree analysis لعزلات فطر *A. alternata* وذلك بتحديد تسلسل نتيجة تفاعل البلمرة المتسلسل

لمنطقة الـ ITS ، باستخدام البادئات المصممة من قبل (Konstantinova et al.2002).
والمحدد تسلسله النيوكلوتيدي في جدول (4).

بعد إجراء فحص الـ PCR تم إرسال ناتج تفاعل PCR product الى شركة ماكرو جين. Macro gen company, USA, في الولايات المتحدة الامريكية وذلك لاجراء تسلسل الحامض النووي باستخدام جهاز (genetic analyzer).

استخدام برنامج قاعدة بيانات الـ NCBI-Genbank-Blast Alignment tool
وبرنامج الـ Mega 6 لتحليل النتائج المتعلقة بتسلسلات عزلات الفطر ورسم الشجرة التطورية
Phylogenetic tree analysis. وقد تم تأكيد التشخيص الجزيئي من قبل البروفيسور
دي هوك (De Hoog) (CBS Fungal Biodiversity Center Institute of the Royal
Netherlands Academy of Arts and Sciences. Netherlands)

3-4: سم الالترناريول

3-4-1: سم الالترناريول القياسي

تم الحصول على سم الالترناريول AOH القياسي Standard من شركة Sigma
الالمانية وبمقدار 5 مليغرام واستخدم هذا السم للكشف عن قدرة الفطر *A.alternata* على انتاج
سم الالترناريول AOH ولتحضير عدة تراكيز لعمل المنحني القياسي Standard curve
لتقدير كمية الانتاج تحت ظروف بيئية مختلفة.

3-4-2: الكشف عن انتاج سم الالترناريول AOH باستعمال تقنية صفائح

الكروماتوغرافيا الرقيقة TLC

تم اختبار قدرة جميع عزلات الفطر على انتاج سم الالترناريول حيث نمت هذه العزلات على وسط PSA وذلك بوضع قرص من مستعمرة الفطر بقطر 0.5 سم بعمر اسبوع في مركز كل طبق (محضر مسبقاً) بعدها حضنت جميع الاطباق عند درجة حرارة 25 م° لمدة 12 يوم بعدها اخذت ثلاثة اقراص لكل عذلة بقطر 0.5 سم ووضعت في انابيب اختبار واضيف لكل انبوب 250 مايكروليتر اثيل اسيتيت رجت بواسطة جهاز المازج vortex لمدة ساعة بعدها فتحت الانابيب وتركت في درجة حرارة المختبر لغرض التجفيف وعند التأكد من الجفاف تماما اضيف لكل انبوب اختبار 100 مايكروليتر ميثانول ثم اخذ من كل انبوبة اختبار ومن السم القياسي 10 مايكروليتر ووضعت على صفيحة ال TLC بعد ان عمل خط مستقيم عليها بمسافة (1) سم من قاعدة الصفيحة ، حيث وزعت على بعد 1 سم لكل عينة عن الاخرى بعدها تركت البقع لتجف ثم وضعت في حوض الفصل الحاوي على الطور المتحرك وتمت مراقبتها لحين وصول المحلول الى مسافة تقارب (1 سم) من النهاية العليا للصفيحة، اخرجت الصفائح وجففت ثم فحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية وبطول الموجي (365) نانوميتر وكشف عن وجود الالترناريول بالمطابقة مع بقعة السم القياسي ومعامل السريان (Rf) ولون التالى للنواتج الايضية للفطر *A. alternata* (Debjani et al., 2012).

حسب معامل السريان (Rf (Relative flow وذلك بتقسيم المسافة التي تحركتها بقعة

السم على المسافة التي تحركها المذيب.

3-4-3: استخلاص وتنقية سم الالترناريول AOH

بعد ان تم الكشف عن قابليه عزلات الفطر *A.alternata* لانتاج سم الالترناريول AOH باستخدام الصفائح الرقيقة Thin layer chromatography حددت العزلة الاكفا في انتاج السم وذلك باتباع طريقة Debjani وآخرون (2012) والتي تضمنت الخطوات التالية :-

- 1- اخذ ثلاثة اقراص قطر 1سم من مستعمرة كل عزلة بعد فترة تحضين 12 يوم.
- 2- وضع اقراص كل عزلة في انبوبة اختبار زجاجية.
- 3- اضيف الى كل انبوبة اختبار 1 مل من مادة الاثيل استيت.
- 4- وضعت على جهاز الرجاج Vortex لمدة ساعة.
- 5- تركت في درجة حرارة المختبر لحين الجفاف.
- 6- اضيف الى كل انبوبة 250 مايكروليتر من الاثيل استيت مرة اخرى.
- 7- اخذ 10 مايكروليتر من كل عينة ووضعت على الصفيحة الرقيقة الموضوع عليها اصلا السم القياسي وعلى مسافة 1 سم من الاسفل ومن الجانبين ومسافة 1 سم كذلك بين كل عينة واخرى.
- 8- بعد الجفاف وضعت في الطور المتحرك والذي حضر انيا من تلوين: اثيل استيت: حامض الفورميك وبنسبة 1 : 3 : 6 وكمية 200 ml (Debjani et al., 2012) حيث وضعت هذه الصفائح في حوض الترحيل واغلق وترك لحين وصول محلول الطور المتحرك الى بعد 1 سم من الحافة العلوية للصفحة
- 9- فحصت تحت الاشعه فوق البنفسجية وعلى الطول الموجي 365 نانوميتر وحددت بقعة السم بالمقارنة مع السم القياسي .

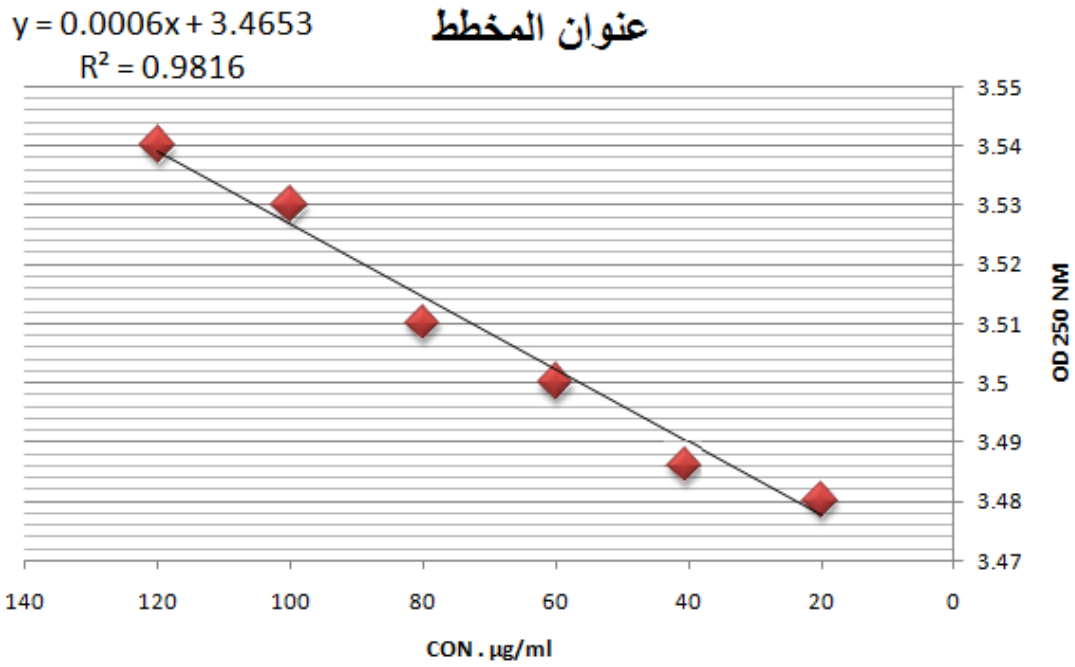
بعدها اعيد زراعه العزلة الاكفاً في الانتاج في عدة اطباق حاوية على الوسط الزراعي PSA حيث حصدت محتويات هذه الاطباق بعد 12 يوم من التحضين ووضعت في خلاط كهربائي واضيف لها الميثانول بنسبه 50 مل لكل طبق خلطت جيدا ثم وضعت على جهاز الرجاج vortex لمدة ساعة "رشح الخليط باستخدام ورق الترشيح Watman No.0.02 ركز المحلول بتركه ثلاثة ايام في درجة حرارة المختبر وفصل عن بقية النواتج الايضية للفطر *A.alternata* باستخدام الترحيل على ورق الصفائح الرقيقة حيث قصت بقع السم وذويت بالميثانول بعدها جفف الميثانول بدرجة حرارة المختبر للحصول على الكمية المطلوبة من سم الالترناريول AOH.

3-4-4: الكشف عن سم الالترناريول AOH باستخدام جهاز HPLC

استخدم جهاز سائل الكروموتوكرافي عالي الكفاءة High Performans Liquid Chromotography (HPLC) والموجود في وزارة العلوم والتكنولوجيا لغرض التأكد من نوعية السم المستخلص وبالمقارنة مع السم القياسي وباستخدام مذيب الميثانول وباستخدام طور متحرك (ميثانول : ماء ، 20 : 80) (Gezimar et al. 2013).

3-4-5: المنحنى القياسي لسم الالترناريول AOH

اعتمدت طريقة Al-Fatlawy (2013) للتقدير الكمي لسم الالترناريول AOH وذلك برسم منحنى قياس standard curve باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophometer وعلى الطول الموجي 250 نانوميتر حيث حضرت التراكيز التالية (20, 40, 60, 80, 100, 120 µg/ml) من العينة المراد قياسها بنفس الطريقة الواردة في الفقرة (3-4-3) لكل معاملة وتم التأكيد على اكمال الحجم الى 1 مل بعد اعادة ذوبان سم الالترناريول في الميثانول ثم سجلت قراءة الكثافة الضوئية وقورنت بالمنحنى القياسي الموضح بالشكل (2)



شكل (2) المنحنى القياسي لحساب تركيز سم الالترنايول AOH

3-4-6: تأثير الظروف البيئية في نمو الفطر *A.alternata* ونتاج السم AOH

3-4-6-1: تأثير درجة الحرارة في معدل نمو الفطر *A.alternata* ونتاج

السم AOH

استخدمت درجات الحرارة 20, 25, 30, 35 °م لبيان تأثير درجات الحرارة على معدل النمو ونتاج سم AOH حيث لقت اطباق حاوية على الوسط PSA بقرص 1 سم من حافة المستعمرة لفطر *A.alternata* وبثلاث مكررات لكل درجة حرارة ،اخذت نتائج معدل النمو بعد 6 ايام تحضين وذلك بحساب معدل قطرين متعامدين اما معدل انتاج AOH فحسب بطريقة المنحنى القياسي Standard curve بعد 12 يوم من التحضين.

3-4-6-2: تأثير دالة الحموضة pH في معدل نمو الفطر *A.alternata*

وانتاج السم AOH

استخدمت مستويات داله الحموضه pH 5, 6, 7, 8 لبيان تأثير الـ pH على نمو الفطر وانتاجه لسم AOH حيث لقت اطباق حاوية على الوسط الزراعي PSA بقرص 1 سم من حافة مستعمرة الفطر *A.alternata* وبثلاث مكررات لكل معامله حضنت جميع الاطباق على درجة حرارة 25 م° واخذت النتائج بعد 6 ايام لمعدل النمو وذلك بحساب معدل قطرين متعامدين . اما معدل الانتاج فحسب بطريقة المنحنى القياسي بعد 12 يوم من التحضين.

3-4-6-3: تأثير نوع الوسط في معدل نمو الفطر *A.alternata* وانتاج السم

AOH

حضرت اربعة انواع من الاوساط الزراعية هي Potato sucrose agar و Yeast extract agar و Czapicks Dox agar و dextrose agar Sabouraud لبيان تأثير نوع الوسط على معدل نمو الفطر وانتاجه السم AOH حيث لقت اطباق بتري حاوية على الاوساط اعلاه وبثلاث مكررات لكل وسط بقرص 1 سم من حافة مستعمرة الفطر *A.alternata* حضنت جميع الاطباق على درجة حرارة 25 م° لمدة 6 ايام اخذت النتائج بعدها بحساب معدل قطرين متعامدين لمعدل النمو اما معدل الانتاج فحسب بطريقة المنحنى القياسي بعد 12 يوم من التحضين.

3-4-6-4: تأثير الضوء والظلام في معدل نمو الفطر *A.alternata* وانتاج سم

AOH

لقت اطباق بتري حاوية على الوسط PSA بقرص 1 سم من حافة مستعمرة الفطر *A.alternata* قسمت هذه الاطباق الى مجموعتين الاولى حضنت على درجة حرارة 25 م تحت ظروف الضوء اما الثانية فحضنت بنفس درجة الحرارة ولكن تحت ظروف الظلام وبثلاث مكررات لكل معاملة اخذت النتائج بعد 6 أيام من التحضين وذلك بحساب معدل قطرين متعامدين لمعاملة النمو اما معدل انتاج السم فحسب بطريقة المنحنى القياسي بعد 12 يوم من التحضين.

3-5: دراسة التأثيرات السمية الوراثية لسم AOH في ذكور الفئران البيضاء

3-5-1: حساب الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية Lethal Dose

(LD₅₀) لسم الـ AOH

استخدمت طريقة Spearman-Karber Method الواردة في Martin وآخرون (1977) لحساب الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية LD₅₀ لسم الالترناريول AOH .

3-5-2: اختبار معامل الانقسام الخلوي Mitotic index assay

جهزت ثلاث مجاميع من ذكور الفئران البيضاء 5 فئران لكل معاملة حيث جرعت هذه المجاميع بسم الالترناريول AOH لمدة 21 يوم اضافة الى معاملة السيطرة وحسب المعاملات التالية:-

- 1-المجموعة الاولى جرعت بالتركيز 40mg/kg
- 2-المجموعة الثانية جرعت بالتركيز 60 mg/kg .
- 3-المجموعة الثالثة جرعت بالتركيز 80 mg/kg .
- 4-المجموعة الرابعة جرعت فقط بـ 5% ميثانول واعتبرت هذه المجموعة معاملة سيطرة كون المادة السامة قد حلت بـ 5% ميثانول .

3-5-2-1: تحضير الكروموسومات من الخلايا الجسمية لنقي العظم

بعد ان اكتملت مده التجريع والتي استمرت 21 يوماً استخلصت كروموسومات نقي العظم لدراسة الانحرافات الكروموسومية في كروموسومات تلك الخلايا واتبعت طريقة Allen واخرون (1977) للحصول على الكروموسومات وكما يلي :

تم حقن كل فأر 0.25 من الكولجيسين بتركيز 10 ملغم / كغم من وزن الجسم المحضر في الفقرة (3-1-4) عن طريق غشاء الخلب ثم قتلت الحيوانات بعد ساعتين من المعاملة وشرحت مباشرة .

3-5-2-2: استخراج خلايا نقي العظم Bone marrow cell recovery

- 1- ثبت الحيوان على جهته الظهرية وقص الجلد فوق منطقة الفخذ ثم ازيلت العضلات حول العظم وقطع ارتباطه بمفصلي الحوض والركبة .
- 2- بعد ان تم قطع العظم من نهاياته وغسله جيداً مسك باستخدام ملقط معقم وبشكل عمودي على فوهة أنبوبة اختبار وحقن بـ 5 مل من دارئ الفوسفات الملحي PBS الدافئ

37 م°، المحضر في الفقرة (3-4-1) لغرض انزال محتويات نخاع العظم ثم مزجت المحتويات جيداً .

3-2-5-3: حصاد الخلايا Cell harvest

نبتت الانابيب الحاوية على خليط شمل نخاع العظم + PBS في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق.

1-أخذ الراسب وأضيف اليه 5 مل من محلول واطئ التوتري كلوريد البوتاسيوم 0.075 مولاري بصورة تدريجية مع الرج المستمر ومن ثم تركت الانابيب في الحاضنة بدرجة 37 م° لمدة 30 دقيقة مع التحريك بين فترة وأخرى .

2-نبتت الانابيب بسرعة 2000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق اهمل الرائق وأخذ الراسب وأضيف اليه المحلول المثبت البارد والمحضر أنيا وبالتدريج على شكل قطرات تسال على الجدار الداخلي للأنبوبة مع الرج المستمر الى ان أكتمل الحجم المضاف الى 5 مل.

3-بعد ذلك حفظت الأنابيب بالثلاجة 4 م° لمدة نصف ساعة لغرض تثبيت الخلايا ثم نبتت مركزياً بسرعة (2000) دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق، أخذ الراسب واهمل الراشح وكررت العملية مرتان .

4-بعد ذلك تعلق الخلايا في 2 مل من المحلول المثبت ليكون جاهزاً لتحضير الشرائح الزجاجية .

3-5-2-4: التقطير وتصبيغ الشرائح الزجاجية Dropping and slide staining

1- تم مزج محتويات الانبوبة جيداً باستخدام ماصة باستور وقطر منه 4-5 قطرات على شرائح زجاجية نظيفة وباردة ومن ارتفاع مناسب 50 سم لأتاحة الفرصة للأنوية والكروموسومات بالانتشار بشكل جيد ثم تركت الشرائح الزجاجية لتجف بدرجة حرارة الغرفة .

2- صبغت الشرائح بصبغة كمزا لمدة 10 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر وتركت بعد ذلك لتجف، حضر لكل حيوان 5 شرائح لنقي العظم .

3- فحصت الشرائح الزجاجية بدقة بواسطة المجهر الضوئي باستخدام العدسة الزيتية Oli immersion lens (X100) ، اذ تم حساب (1000) خلية منقسمة وغير منقسمة لتحديد النسبة المئوية لمعامل الانقسام MI وحسب المعادلة التالية والواردة في Stich (1981) and San :-

عدد الخلايا المنقسمة

$$100 \times \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا المحسوبة (1000)}} = \text{معامل الانقسام الخلوي} \% \text{ (MI)}$$

العدد الكلي للخلايا المحسوبة (1000)

3-5-3: حساب معدل انحراف الكروموسومات Calculation chromosomal aberration

استخدمت نفس العينات في تجربة معامل الانقسام الخلوي لغرض حساب معدل الانحرافات الكروموسومية وتردد كل نوع عن طريق فحص ما لا يقل عن 250 خلية منقسمة وواضحة في الطور الاستوائي metaphase وحسب المعادلات أدناه والواردة في :-
(Al-Fatlawy ., 2012)

عدد الخلايا المحتوية على انحرافات

$$100 \times \frac{\text{النسبة المئوية للانحرافات الكروموسومية}}{\text{العدد الكلي للخلايا المحسوبة (250)}} =$$

العدد الكلي للخلايا المحسوبة (250)

تردد كل نوع في الخلايا المنقسمة

$$100 \times \frac{\text{تردد كل نوع من الانحرافات}}{\text{العدد الكلي للخلايا المحسوبة (250)}} = \%$$

(20) زوج كروموسومي × العدد الكلي للخلايا المحسوبة (250)

تردد الانحرافات في الخلايا المنقسمة

$$100 \times \frac{\text{التردد الكلي للانحرافات}}{\text{العدد الكلي للخلايا المحسوبة (250)}} = \%$$

(20) زوج كروموسومي × العدد الكلي للخلايا المحسوبة (250)

3-5-4: فحص الانوية الصغيرة Micronucleus Assay

تم إجراء هذا الفحص بالاعتماد على طريقة Schmid (1976) بحسب الخطوات الآتية :

1-أخذت عظام الساق أو الكتف للفئران التي تم تشريحها للحصول على كروموسومات الخلايا الجسمية اذ تم ازالة الجلد والعضلات المحيطة بالعظام بعد ذلك تم قص نهايتي العظم ومن ثم غسل محتويات هذه العظام بواسطة محقنه بأستعمال 2 مل من مصل جنين العجل fetal calf serm الذي اجري له عملية تثبيط حراري Heat inactivation في درجة حرارة 56 م° لمدة ساعة ونصف .

2-نبذت الانابيب الحاوية على خلايا نقي العظم بواسطه جهاز الطرد المركزي بسرعة 1000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق .

3-أخذ الراسب واهمل الرائق ، ووضعت قطرة صغيرة منه على حافة شريحة زجاجية اذ تم عمل مسحة Smear منها.

4- بعد ان جفت الشرائح صبغت بصبغة كمزا لمدة 10 دقيقة بعد ذلك غسلت باستخدام دارئ سورنسن Sorenson's buffer .

فحصت الشرائح بعد ان جفت بأستخدام العدسة الزيتية اذ تم حساب النسبة المئوية لظهور الانوية الصغيرة في 500 خلية من خلايا نقي العظم نوع الاورمة الحمراء المتعددة.

3-6: التحليل الإحصائي

استخدم التصميم العشوائي التام Completely Randomized design (CRD) في جميع التجارب المختبرية. وحللت النتائج وقورنت المتوسطات الحسابية باختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) تحت مستوى معنوي 0.05 (الراوي وخلف الله 1980) .

4-1: عزل وتشخيص الفطر *A.alternata*4-1-1: عزل الفطر *A.alternata* من الثمار المصابة

من خلال عملية جمع العينات تم الحصول على 24 عزلة تعود للفطر *Alternaria* عزلت من ثمار محصول الطماطة التي ظهرت عليها أعراض الإصابة ومن المناطق المحددة في الفقرة (3-2-1) والتي شملت محافظه كربلاء حيث سجل هذا الفطر تكرراً عالياً على تلك الثمار وكانت هذه العزلات موزعة كما في جدول 8.

جدول (8) عدد العزلات وأرقامها وفق مناطق العزل لمحافظة كربلاء

ت	اسم المنطقه	عدد العزلات	ارقام العزلات
١	المزارع الصحراوية لطريق كربلاء-الرزازة	10	3,6,7,8,9,11,12,18,19, 23
٢	المزارع الصحراوية لطريق كربلاء-النجف	7	4,14,15,16,17,20,21
3	مزارع ناحية الخيرات	5	1,5,10, 22 ,24,
٤	مزارع ناحية الحسينية	2	2, 13

4-1-2: النسبة المئوية للتردد والظهور للفطر *A.alternata*

يبين الجدول 9 ان اعلى نسبة تردد وظهور كانت للفطر *A.alternata* اذ بلغت 21.5% و 38.0 % على التوالي وهي نسبة عالية مقارنة ببقية الفطريات النامية اثناء عملية العزل الاولي لهذا الفطر كما واختلفت بقية الفطريات بنسبة ظهورها وترددتها . وهذه النسبة العالية جاءت من خلال استهداف ثمار الطماطة لعزل المسبب المرضي حيث تعتبر هذه الثمار وسط ملائم جدا لنمو الفطر *A.alternata* ويعد هذا الفطر من ابرز الفطريات واكثرها اصابة لهذه الثمار وذلك لمحتواها العالي من الرطوبة (Hasan, 1995).

ان عملية العزل انحازت بشكل كبير الى استهداف الفطر *A.alternata* من خلال التأكد من علامات الاصابة وشكل الفطر ومواصفاته على الثمرة والذي قاد الى استبعاد الاصابة غير المؤكدة خلال عمليات العزل، اما بقية الفطريات فاختلفت بنسب ظهورها وترددتها وان سبب نموها او تواجدها قد يعود الى تلوث هذه الثمار بها حيث تعد العديد من المزارع ملوثة بمئات الانواع الفطرية المختلفة كما ويعد بعضها متواجد في جميع الاماكن حتى في اجواء المختبر .

جدول (9) نسبة التردد والظهور للفطر *A.alternata*

النسبة المئوية للظهور %	النسبة المئوية للتردد %	الفطريات
38.0	21.5	<i>A.alternata.</i>
26.4	19.3	<i>Alternaria spp.</i>
0.8	0.3	<i>A.tenussima</i>
14.6	8.9	<i>Stemphylium</i>
10.4	6.3	<i>Aspergillus niger</i>

5.4	4.5	<i>Aspergillus</i> spp.
7.6	5.6	<i>Fusarium oxysporam</i>
6.4	5.9	<i>Penicillim</i> sp.
28.6	15.4	<i>Rhizopus</i> sp.
3.0	0.8	<i>Fusarium</i> sp.
22.0	11.3	Others

4-1-3: تشخيص الفطر *A.alternata*

4-1-3-1: التشخيص المظهري للفطر *A.alternata*

بعد الحصول على عزلات الفطر *Alternaia* spp. من ثمار الطماطة المصابة نميت على الوسط PSA ونقيت في مزارع نقية pure cultur. تبين ان 23 عزلة من العزلات اعلاه تعود الى الفطر *A.alternata* فقط عزلة واحدة هي الرقم 2 والمعزولة من ناحية الحسينية شخصت على انها *A.tenuissima* وتركت هذه العزلة مع عزلات الفطر *A.alternata* لسببين الاول تشابه الصفات المظهرية الى حد كبير مع صفات الفطر *A.alternata* بحيث يصعب تمييزها والسبب الثاني هو التأكد من نتائج التشخيص الجزيئي ونتاج سم الالترناريول AOH في التجارب اللاحقة ويوضح الشكل (A-3) مستعمرة الفطر *A.alternata* على الوسط الزرعي PSA اذ يظهر لون المستعمرة وحافتها ولون النمو في ظهر الطبق (الشكل B-3) وبعض الصفات المظهرية للفطر *A.alternata* كما يظهر فيه شكل الخيوط الفطرية واطوال سلاسل الابواغ وتفرعاتها وطرق ترتيب هذه الابواغ في السلاسل اضافة الى شكل البوغ الواحد وحواجزه الطولية والعرضية وطول المنقار وغيرها من الصفات التي اعتمدها المصادر اعلاه لغرض التشخيص المظهري .

ولما كانت الصفات المظهرية للفطر *A.alternata* تختلف باختلاف نوع الوسط والظروف البيئية المحيطة من درجة الحرارة و pH وغيرها (Pitt and Hocking, 1997) فقد حددت الصفات المظهرية للفطر قيد الدراسة عند تنميته على الوسط PSA ودرجة حرارة 25 م° و pH يساوي 6.5 وكانت هذه الصفات كالتالي. ينمو الفطر *A.alternata* المعزول من ثمار الطماطة بمعدلات سريعة يصل فيها قطر مستعمرة النمو الى 8 سم خلال 7 ايام عند تنميته على الظروف البيئية اعلاه ، السطح الامامي للغزل الفطري ذات لون ابيض في المراحل الاولى للنمو الا انه يتلون بلون زيتوني غامق مائل للسواد او بني غامق او فاتح بسبب قدرة الفطر *A.alternata* على انتاج صبغة الميلانين مع وجود اختلافات بسيطة في حدة اللون تبعا للمناطق المعزول منها كما في (شكل 3-A) أما السطح الخلفي فيكون بني غامق مائل إلى الأسود (الشكل 3-B)، اذ تختلف حدة لون الغزول الفطرية تبعا لاختلاف العزلات متأثرة بالظروف البيئية المحيطة بها والتي قد يتعدى تأثيرها لتظهر تغايرات في بعض الصفات المظهرية التي لها القابلية على التأثر بتلك الظروف (Bridge, 1989) حيث اكد Pryor and Michailides (2002) ان عزلات الفطر *A.alternata* غالبا ماتكون غير متماثلة متأثرة بالظروف البيئية المختلفة.

ويبين الشكل اعلاه امتلاك مستعمرة الفطر حافة منتظمة الشكل غير متعرجة صغيره ذات لون ابيض وتظهر في بعض الاحيان حلقات منتظمة في مستعمرة النمو .

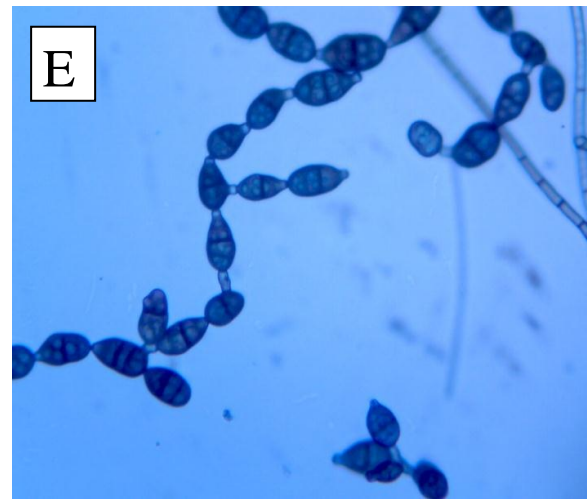
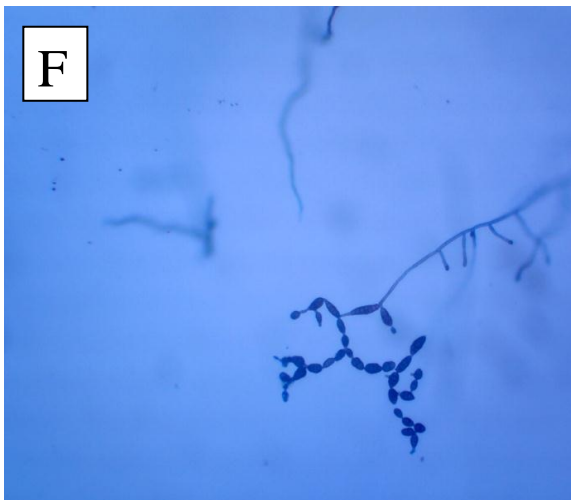
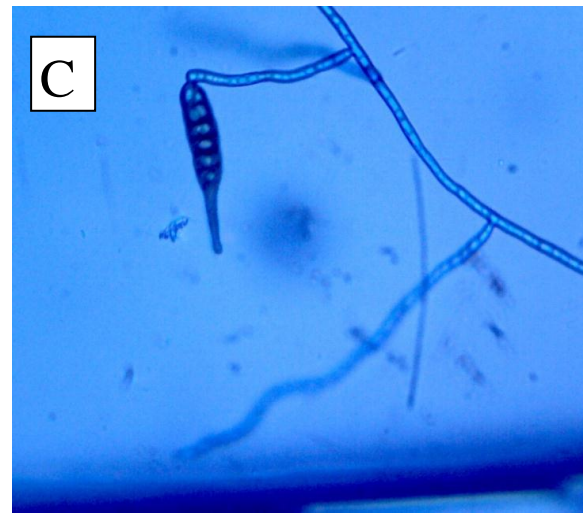
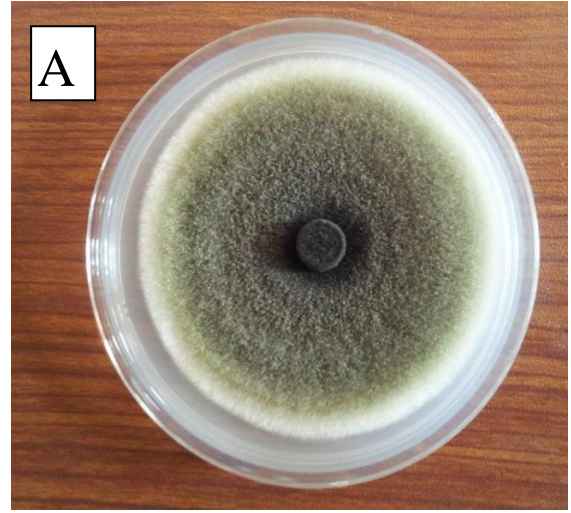
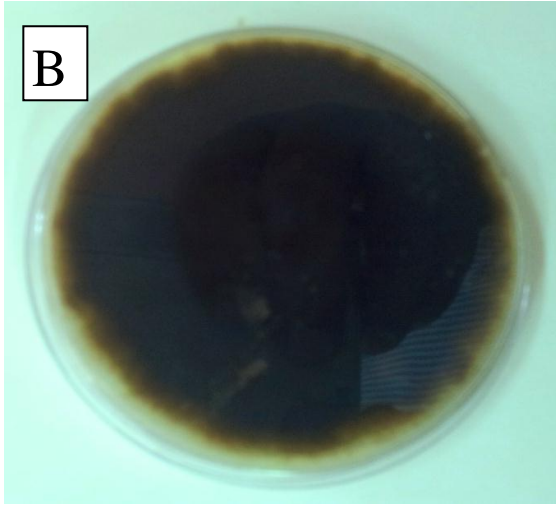
اما الفحص المجهرى فقد اظهر ان الحامل البوغي غير متفرع (الشكل 3-C) ومرتبطة به الابواغ لتكون مايعرف بالسلاسل حيث اظهرت النتائج امتلاك الفطر *A.alternata* سلاسل طويلة نسبيا قد يصل عدد ابواغها الى اكثر من 10 ابواغ وهذه السلاسل اما ان تكون مفردة او متفرعة كما في (الشكل 3-E,D,F) اما البوغ فهو ذا شكل كمثري او بيضوي يمتلك منقارا مخروطي الشكل يصل طوله الى ثلث طول البوغ تقريبا وله حواجز طولية 1-3 وعرضية 6-8 اعتمادا على عمر البوغ (الشكل 3-C) ، وتاتي هذه الصفات متشابهة تماما مع تلك التي ذكرها كل من (1971) , Ellis; (1993) Moubasher; (1997), Pitt and Hocking;

(1973); Streets(1975); Barnett and hunter; والتي تشابه الى حد كبير صفات الفطر

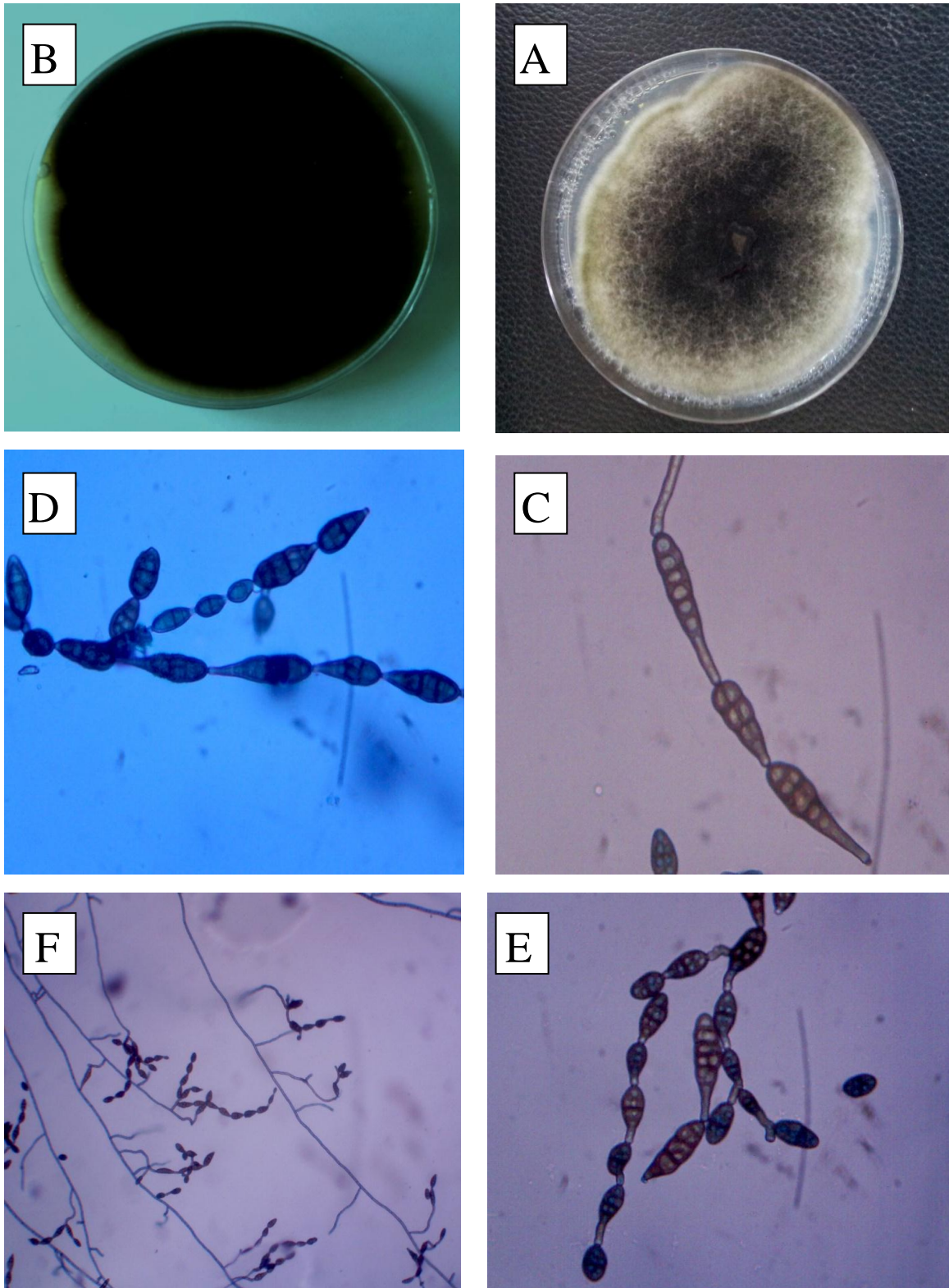
A.alternata اعلاه.

وأوضحت نتائج التشخيص المظهري التشابه الكبير في الصفات المظهرية للعزلة رقم 2 مع بقية العزلات الاخرى من حيث لون مستعمرة النمو والتي ظهرت باللون البني الغامق والمائل الى السواد كما في الشكل (A-4) ولون اسود لظهر مستعمرة النمو (الشكل B-4) والتي تشابه الى حد كبير مستعمرات نمو العزلات الاخرى للفطر *A.alternata* وكذلك بعض الصفات المظهرية الاخرى من حيث شكل الابواغ وسلاسلها وتفرعاتها وهي كصفات مظهرية قريبة جدا من الفطر *A.alternata* الا انها شخصت على انها عزلة تعود للفطر *A.tenuissima*.

ان جميع الصفات التي امتلكها الفطر *A.tenuissima* هي ذاتها التي ظهرت لبعض عزلات الفطر *A.alternata* كلون المستعمرة البني الغامق والمائل للسواد والثاليل التي ظهرت على الغزول الفطرية (شكل A-4) كذلك امتلاكها سلاسل طويلة نسبيا الا انها اقصر من تلك التي ظهرت في عزلة الفطر *A.alternata* كما ولم يختلف شكل البوغ وحجمه وحجم المنقار (شكل C-4) عن ماورد اعلاه كذلك امتلك هذا الفطر سلاسل طويلة الا انها اقصر بعض الشيء عن تلك التي يكونها الفطر *A.alternata* وهي أيضاً اما ان تكون مفردة او متفرعة كما في (الشكل E,D,F-4) لذلك كان من الصعب جدا تمييز هذه العزلة عن عزلات الفطر *A.alternata* من ناحيه التشخيص المظهري او طبقا لما تمتلكه العزلة من صفات مظهرية ويأتي هذا التفسير مطابق لما ذهب اليه Pryor and Michailides (2002) من وجود صعوبات لتحديد ميزة تصنيفية متخصصة للفطر *A.tenuissima* وهذا مادفع الباحث الى ترك هذه العزلة مع عزلات الفطر *A.alternata* لتوثيق التشخيص من الناحية الجزيئية.



شكل (3) الصفات المظهرية للفطر *A.alternata* -A المستعمرة B- المستعمرة من الناحية الظهرية
 C- بوع الفطر الحامل البوعي
 D and E- اطوال السلاسل وتفرعاتها (40X)
 F - طول السلاسل وتفرعاتها (10X)



المستعمرة -A المستعمرة من الناحية الظهرية -B
D and E - اطوال السلاسل وتفرعاتها (40X)

شكل (4) الصفات المظهرية للفطر *A.tenuissima*
C- بوغ الفطر والحامل البوغ
F- طول السلاسل وتفرعاتها (10X)

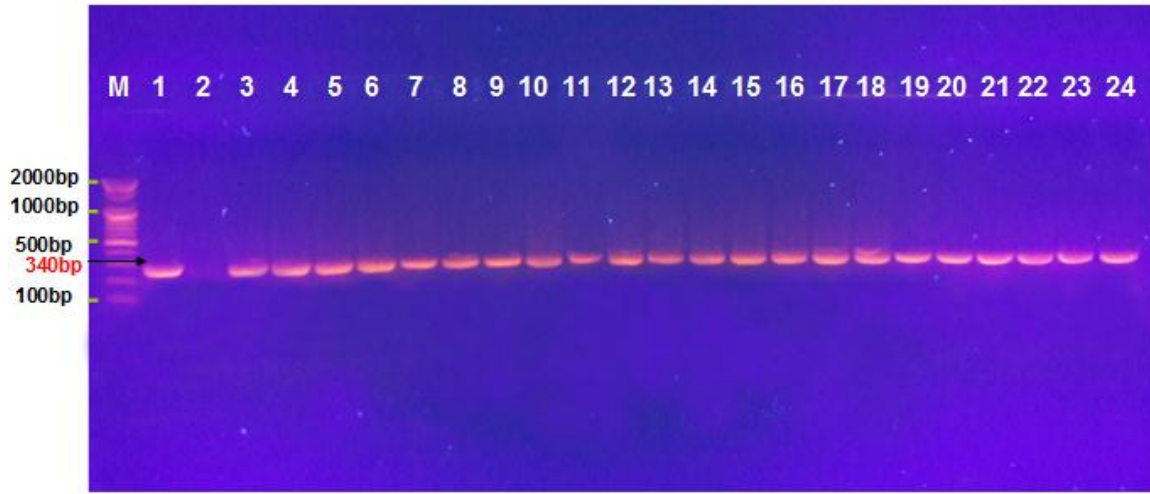
4-1-2-1: التشخيص الجزيئي للفطر *A.alternata*4-1-2-1-4: التشخيص الجزيئي للفطر *A.alternata* باستخدام بادئ متخصص

يشير الشكل 5 الى نجاح البادئ AAF2 ، AAR3 والمصمم من قبل Konstantinova وآخرون (2002) لتشخيص عزلات الفطر *A.alternata* بحسب هذا المصدر، حيث أعطى هذا البادئ حزم عند الوزن الجزيئي 340 bp ولجميع العزلات الفطرية المعزولة من محافظة كربلاء وهذا يؤكد ان جميع العزلات كانت تعود للفطر *A.alternata* باستثناء العزلة رقم 2 والذي فشل في التعرف على القطعة الجينية المستهدفة مما يؤكد ان هذه العزلة لم تكن تعود للفطر *A.alternata* وانما لنوع اخر.

اتفقت هذه النتائج مع نتائج الباحث اعلاه من ان هذا البادئ مصمم بشكل متخصص للكشف عن عزلات الفطر Specific primer for *A.alternata* عند الوزن الجزيئي 340 bp حيث طبق مع 12 عزلة للفطر *A.alternata* و 11 عزلة للفطر *A.radicina* و 7 عزلات للفطر *A.dauci* ولم ينجح في مضاعفة قطعة الجين المستهدفة الا مع عزلات الفطر *A.alternata* وفشل مع جميع العزلات الاخرى والتي صممت لها بادئات متخصصة نجحت تضخيم الجينات المستهدفة حسب الانواع، ويعود نجاح هذا البادئ في تخصصه تجاه عزلات الفطر *A.alternata* في تصميمه الدقيق حيث استهدف قطعة مفردة من جين 18S rDNA والتي يصل طولها الى 341 bp زوج قاعدي خاصة بالفطر اعلاه.

وتأتي هذه النتيجة متفقة مع نتائج التشخيص المظهري ولجميع عزلات الفطر *A.alternata* باستثناء العزلة 2 اذ لم يرتبط البادئ بجين الهدف وذلك لعدم وجود التسلسل او التتابع المكمل له وهذا امر طبيعي حيث ان البادئ مصمم لعزلات الفطر *A.alternata* وليس لغير ذلك من الانواع وهذا ما اكدته التجارب اللاحقة حيث بينت ان العزلة رقم 2 كانت

A.tenuissima كذلك اتفقت هذه النتائج مع كل من Konstantinova وآخرون (2002) و Mmbaga وآخرون (2011) الذين اشاروا الى ان البودائ المتخصصة تستطيع تضخيم مواقع محددة لجين معين للفطر *A.alternata* باستخدام جهاز PCR ومن شان هذه البودائ التشخيص السريع والموثوق لعزلات الفطر *A.alternata*.

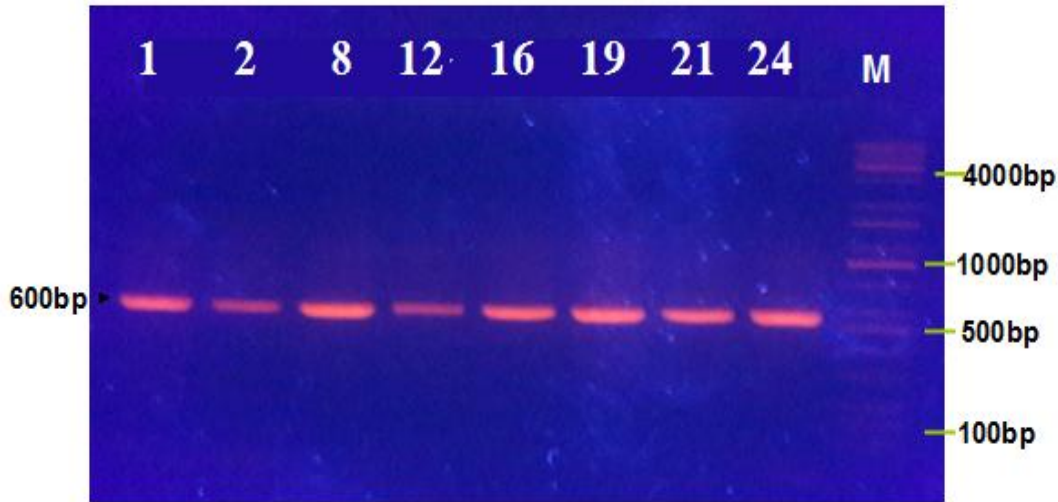


شكل (5) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنتائج البلمرة PCR بوزن 340bp للكشف عن تضخم جين 18S Ribosomal DNA تحت الاشعة فوق البنفسجية وباستخدام صبغة بروميد الاثديوم

4-1-2-1-2: التشخيص الجزيئي باستخدام جهاز التحليل الوراثي genetic analyzer

أوضحت نتائج هذه التجربة نجاح البادئ ITS4,ITS1 في اجراء التحليل الوراثي او تحديد تواليات منطقة ITS والمستخدم في تشخيص عزلات الفطر *A.alternata* حيث صمم هذا البادئ على اساس جنس الفطر *Alternaria* وليس الانواع وذلك لتحديد هوية الجنس وقد نجح هذا البادئ مع جميع العزلات بما فيها العزلة رقم 2 والشكل (6) يوضح نتائج الترحيل الكهربائي لثمان عينات عشوائية من العزلات المشخصة للتأكد من نجاح عمل البادئ في مضاعفة القطعة

المستهدفة من الجين وقد تم الحصول على نتائج التتابعات بعد ارسال ناتج جهاز البلمرة لفحص الـ PCR product لعملية التضاعف الى شركة ماكروجين في الولايات المتحدة الامريكية (Macro gene company, USA) وهي شركة متخصصة لتحديد تتابع الجينات المستهدفة للكائنات الحية بعد تضخيم قطع الهدف بجهاز الـ PCR وعند تحليل هذه النتائج بموقع المركز الوطني للمعلومات والتكنولوجيا الحيوية (National Center for NCBIBiotechnology Information) وهو موقع متخصص بالتحليل الجزيئي والوراثي على الشبكة العالمية للمعلومات (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) وتمت مقارنة النتائج مع البيانات التي تم الحصول عليها من بنك الجينات باستخدام موقع (Ncbi Blast) فقد تبين ان جميع العزلات تعود للفطر *A.alternata* باستثناء العزلة رقم 2 اذ اظهرت النتائج انها تعود للفطر *A.tenuissima*.



شكل (6) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لناتج البلمرة PCR بوزن 600bp للكشف عن تضخم منطقة ITS1 , ITS4 تحت الاشعة فوق البنفسجية وباستخدام صبغة بروميد الاثيوم (لثمان عينات عشوائية 1,2,8,12,16,19,21,24)

وهنا تأتي هذه النتائج مؤكدة لفحص الـ PCR باستخدام بادئ متخصص مما يعزز عملية التشخيص الجزيئي باستخدام هذا البادئ ويؤكد بشكل قاطع نوع هذه العزلات المعزولة من محافظة كربلاء ومقارنة كل عزلة مع العزلات العالمية المؤشرة في البنك الجيني gene bank ومدى تشابهها واختلافها (تغايرها) من الناحية الوراثية.

وتطابق هذه النتائج مع التشخيص المظهري الواردة في الفقرة 4-2-1 كما تؤكد وبشكل قاطع خصوصية البادئ AAF2, AAR3 في التشخيص الجزيئي للفطر *A.alternata* باستخدام جهاز PCR .

وعلى الرغم من الثبات العالي الذي تتمتع به هذه المنطقة وعدم تغايرها الا ان النتائج تشير الى ان هناك مجموعتين مختلفتين في تسلسل الحمض النووي لهذه المنطقة وهذا يعزى الى تأثير الظروف البيئية المختلفة التي تتمتع بها محافظة كربلاء او الى الاستخدام المفرط للمبيدات الكيميائية في المزارع المعزول منها الفطر .

اما درجة تطابق عزلات محافظة كربلاء مع العزلات العالمية فيوضحها الجدول رقم 10 حيث اختيرت العزلة رقم 1 كممثل للمجموعة الاولى والعزلة رقم 4 كممثل للمجموعة الثانية اضافة الى عزلة الفطر *A.tenuissima*، تبعاً لعدد القواعد المتماثلة ونسبة التماثل والقطعة الجينية المستهدفة. حيث يوضح الجدول اعلاه ان العزلة رقم 1 تطابقت مع عزلتين احدهما صينية بنسبة 100% (شكل A-7) والاخرى سعودية بنسبة 99% (شكل B-7) وبعده قواع نيتروجينية بلغ 992 قاعدة كذلك تطابقت مع عزلة صينية تالثة بمقدار 99% (شكل C-7) وبعده قواع نيتروجينية بلغ 917 قاعدة، اما العزلة رقم 4 فقد تطابقت مع عزلة تركية (شكل D-7) واخرى مكسيكية (شكل E-7) بنسبة 100% وبعده قواع نيتروجينية بلغ 992 قاعدة وتطابقت عزلة الفطر *A.tenuissima* مع عزلة هندية بنسبة 100% (شكل F-7) وبعده قواع نيتروجينية بلغ 992 قاعدة كذلك تطابقت مع عزلة صينية اخرى بمقدار 99% (شكل G-7) وبعده قواع نيتروجينية بلغ 917 قاعدة. ولربما يعود السبب في تطابق عزلات هذه البلدان مع عزلات العراق الى امتلاك

العراق تبادل تجاري واسع معها وفي ظل ضعف جهاز السيطرة النوعية وضعف اجراءات الحجر الزراعي ادى الى دخول هذه العزلات الى العراق واستيطانها في مناطق زراعية.

```

A.alternata 1 with China 1 isolate
Sequence ID: lcl|46663Length: 581Number of Matches: 1
Related InformationRange 1: 67 to 564Graphics Next Match Previous
Match First Match Alignment statistics for match #1 Score
Expect Identities Gaps Strand Frame
920 bits(498) 0.0( ) 498/498(100%) 0/498(0%) Plus/Plus
Query 1 CTCTGGGGTTACAGCCCTTGCTGAATTATTCACCCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTCCT 60
      |||
Sbjct 67 CTCTGGGGTTACAGCCCTTGCTGAATTATTCACCCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTCCT 126
Query 61 TGGTGGGGTTCGCCACCACCTAGGACAACCATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAG 120
      |||
Sbjct 127 TGGTGGGGTTCGCCACCACCTAGGACAACCATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAG 186
Query 121 TAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA 180
      |||
Sbjct 187 TAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA 246
Query 181 ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG 240
      |||
Sbjct 247 ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG 306
Query 241 AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACC 300
      |||
Sbjct 307 AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACC 366
Query 301 CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAA 360
      |||
Sbjct 367 CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAA 426
Query 361 GTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCA 420
      |||
Sbjct 427 GTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCA 486
Query 421 AAGGTC TAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC 480
      |||
Sbjct 487 AAGGTC TAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC 546
Query 481 CCGCTGAACTTAAGCATA 498
      |||
Sbjct 547 CCGCTGAACTTAAGCATA 564

```

A


```

A.alternata 1 with saudia Arabia isolate
Sequence ID: lc1|57075Length: 532Number of Matches: 1
Related InformationRange 1: 18 to 516Graphics Next Match
Previous Match First Match Alignment statistics for match
#1 Score Expect Identities Gaps Strand Frame
894 bits(484) 0.0( ) 494/499(99%) 0/499(0%) Plus/Plus

Query 1      CTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCGTACTTC TTGTTTCCT 60
            |||
Sbjct 18     CTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCGTACTTC TTGTTTCCT 77

Query 61     TGGTGGGTTCCGCCACCCTAGGACAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAG 120
            |||
Sbjct 78     TGGTGGGTTCCGCCACCCTAGGACAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAG 137

Query 121    TAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA 180
            |||
Sbjct 138    TAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA 197

Query 181    ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG 240
            |||
Sbjct 198    ACGCCGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG 257

Query 241    AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACC 300
            |||
Sbjct 258    AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACC 317

Query 301    CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAA 360
            |||
Sbjct 318    CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAA 377

Query 361    GTAATTGGCAGCCGGCCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACCTCTATCAGCA 420
            |||
Sbjct 378    GTAATTGGCAGCCGGCCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACCTCTATCAGCA 437

Query 421    AAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACCTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC 480
            |||
Sbjct 438    AAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACCTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC 497

Query 481    CCGCTGAACCTTAAGCATAT 499
            |||
Sbjct 498    CCGCTGAACCTTAAGCATAT 516

```

B

```

A.alternata 1 with China3 isolate
Sequence ID: lc1|16415Length: 580Number of Matches: 1
Related InformationRange 1: 66 to 564Graphics Next Match
Previous Match First Match Alignment statistics for match
#1 Score Expect Identities Gaps Strand Frame
917 bits(496) 0.0( ) 498/499(99%) 0/499(0%) Plus/Plus

Query 1      CTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCGTACTTC TTGTTTCCT 60
            |||
Sbjct 66     CTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCGTACTTC TTGTTTCCT 125

Query 61     TGGTGGGTTCCGCCACCCTAGGACAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAG 120
            |||
Sbjct 126    TGGTGGGTTCCGCCACCCTAGGACAACCATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAG 185

Query 121    TAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA 180
            |||
Sbjct 186    TAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA 245

Query 181    ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG 240
            |||
Sbjct 246    ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG 305

Query 241    AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACC 300
            |||
Sbjct 306    AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACC 365

Query 301    CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAA 360
            |||
Sbjct 366    CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAA 425

Query 361    GTAATTGGCAGCCGGCCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACCTCTATCAGCA 420
            |||
Sbjct 426    GTAATTGGCAGCCGGCCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACCTCTATCAGCA 485

Query 421    AAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACCTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC 480
            |||
Sbjct 486    AAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACCTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC 545

Query 481    CCGCTGAACCTTAAGCATAT 499
            |||
Sbjct 546    CCGCTGAACCTTAAGCATAT 564

```

C

A.alternata 4 with Turkey isolate
 Sequence ID: lc1|53625|Length: 573|Number of Matches: 1
 Related Information|Range 1: 47 to 545|Graphics Next Match
 Previous Match First Match Alignment statistics for match
 #1 Score Expect Identities Gaps Strand Frame
 922 bits(499) 0.0() 499/499(100%) 0/499(0%) Plus/plus

```

Query 1   TCAAAGTTGaaaaaaaaGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTG 60
Sbjct 545 TCAAAGTTGAAAAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTG 486
Query 61   TGCTGCGCTCCGAAACCAAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCAGATCTCCAGCAAA 120
Sbjct 485   TGCTGCGCTCCGAAACCAAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCAGATCTCCAGCAAA 426
Query 121  GCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAG 180
Sbjct 425   GCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAG 366
Query 181  GCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGA 240
Sbjct 365   GCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGA 306
Query 241  ATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAA 300
Sbjct 305   ATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAA 246
Query 301  GAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAA 360
Sbjct 245   GAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAA 186
Query 361  AAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAA 420
Sbjct 185   AAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAA 126
Query 421  GACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATAT 480
Sbjct 125   GACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATAT 66
Query 481  TTGTGTAATGATCCCTCCG 499
Sbjct 65   TTGTGTAATGATCCCTCCG 47

```

D

A.alternata 4 with Mexico isolate C
 Sequence ID: lc1|28035|Length: 540|Number of Matches: 1
 Related Information|Range 1: 2 to 500|Graphics Next Match
 Previous Match First Match Alignment statistics for match
 #1 Score Expect Identities Gaps Strand Frame
 922 bits(499) 0.0() 499/499(100%) 0/499(0%) Plus/plus

```

Query 1   TCAAAGTTGaaaaaaaaGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTG 60
Sbjct 500   TCAAAGTTGAAAAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTG 441
Query 61   TGCTGCGCTCCGAAACCAAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCAGATCTCCAGCAAA 120
Sbjct 440   TGCTGCGCTCCGAAACCAAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCAGATCTCCAGCAAA 381
Query 121  GCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAG 180
Sbjct 380   GCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAG 321
Query 181  GCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGA 240
Sbjct 320   GCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGA 261
Query 241  ATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAA 300
Sbjct 260   ATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAA 201
Query 301  GAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAA 360
Sbjct 200   GAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAA 141
Query 361  AAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAA 420
Sbjct 140   AAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAA 81
Query 421  GACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATAT 480
Sbjct 80   GACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATAT 21
Query 481  TTGTGTAATGATCCCTCCG 499
Sbjct 20   TTGTGTAATGATCCCTCCG 2

```

E

Alternaria tenuissima with India isolate
 Sequence ID: lcl|50509|Length: 498|Number of Matches: 1
 Related InformationRange 1: 8 to 495|Graphics Next Match
 Previous Match First Match Alignment statistics for match
 #1 Score Expect Identities Gaps Strand Frame
 678 bits(488) 0.0() 488/488(100%) 0/488(0%) Plus/Plus

```

Query 7      GGTTCCTCCCTTGGCTGAATAATTCACCCCTTGCCTTTTGCATACTTCTTGTTCCTTGGTGG 65
          |||
Sbjct 8      GGTTCCTCCCTTGGCTGAATAATTCACCCCTTGCCTTTTGCATACTTCTTGTTCCTTGGTGG 67

Query 66     GTTCGCCCAACACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCACCCTTTAAACAA 125
          |||
Sbjct 68     GTTCGCCCAACACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAA 127

Query 126    ATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGAATCGATGAACAACGCGC 185
          |||
Sbjct 128    ATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTCTGGAATCGATGAACAACGCGC 187

Query 186    CGAAATGCAAGAAGTTTGGTGAATTGCAGAAATTCATCGAATCTTTGAATCTTTGAAGGCT 244
          |||
Sbjct 188    CGAAATGCAAGAAGTTTGTGAATTGCAGAAATTCAGTCAATCATCTAATCTTTGAACGCAT 247

Query 245    CATTGGGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCCTCAAG 304
          |||
Sbjct 248    CATTGGGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCCTCAAG 307

Query 305    CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTGTCTTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATT 364
          |||
Sbjct 308    CTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTGTCTTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATT 367

Query 365    GGCAGCCGGCCTACTGTTTCGGAGCGGCGCAAGTCACGCTCTCTATCAGCAAAGGCC 424
          |||
Sbjct 368    GGCAGCCGGCCTACTGTTTCGGAGCGGCGCAAGTCACGCTCTCTATCAGCAAAGGCC 427

Query 425    TATTTTCCATTTTGCCTTTTTTCAAGTTTTGACCCCGATCAGGTTGGGATACCCGCTG 484
          |||
Sbjct 428    TATTTTCCATTTTGCCTTTTTTCAAGTTTTGACCCCGATCAGGTTGGGATACCCGCTG 487

Query 485    AACTTAAG 492
          |||
Sbjct 488    AACTTAAG 495
  
```

F

Alternaria tenuissima with China isolate
 SRelated InformationRange 1: 19 to 548|GenBankGraphics Next Match
 Previous Match First Match Alignment statistics for match
 #1 Score Expect Identities Gaps Strand Frame
 955 bits(517) 0.0() 526/530(99%) 2/530(0%) Plus./Plus,

```

Query 10     CCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTG 68
          |||
Sbjct 548     CCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTG 489

Query 69     ATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAA 128
          |||
Sbjct 488     ATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAA 429

Query 129    GGCAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTAC 188
          |||
Sbjct 428     GGCAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTAC 369

Query 189    AAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG 248
          |||
Sbjct 368     AAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG 309

Query 249    ATTCGATGATTCAGTGAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC 308
          |||
Sbjct 308     ATTCGATGATTCAGTGAATCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTC 249

Query 309    ATCGATGCCAGAACCAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTAATTTGTTACTGAC 368
          |||
Sbjct 248     ATCGATGCCAGAACCAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTAATTTGTTACTGAC 189

Query 369    GCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCCTAGTGGTGGCGAACCCACCAAGGAA 428
          |||
Sbjct 188     GCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCCTAGTGGTGGCGAACCCACCAAGGAA 129

Query 429    ACAAGAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTT 488
          |||
Sbjct 128     ACAAGAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTT 69

Query 489    CCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGCCCC-CCTAC 537
          |||
Sbjct 68     CCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGAGGCCCC-CCTAC 19
  
```

G

الشكل (7) تطابق العزلات المحلية للفظر *A.alternata* مع العزلات العالمية حسب موقع NCBI Blast العالمي (*A.alternata*)
 عزلة 1 مع العزلات (China 3-C , Sudia Arabia -B , China 1-A)
 عزلة 4 مع العزلات (China -G, India -F مع *A.tenuissima*) (Mexico -E Turkey-D)

جدول (10) تطابق عزلات الفطر *Alternaria alternata* مع العزلات العالمية

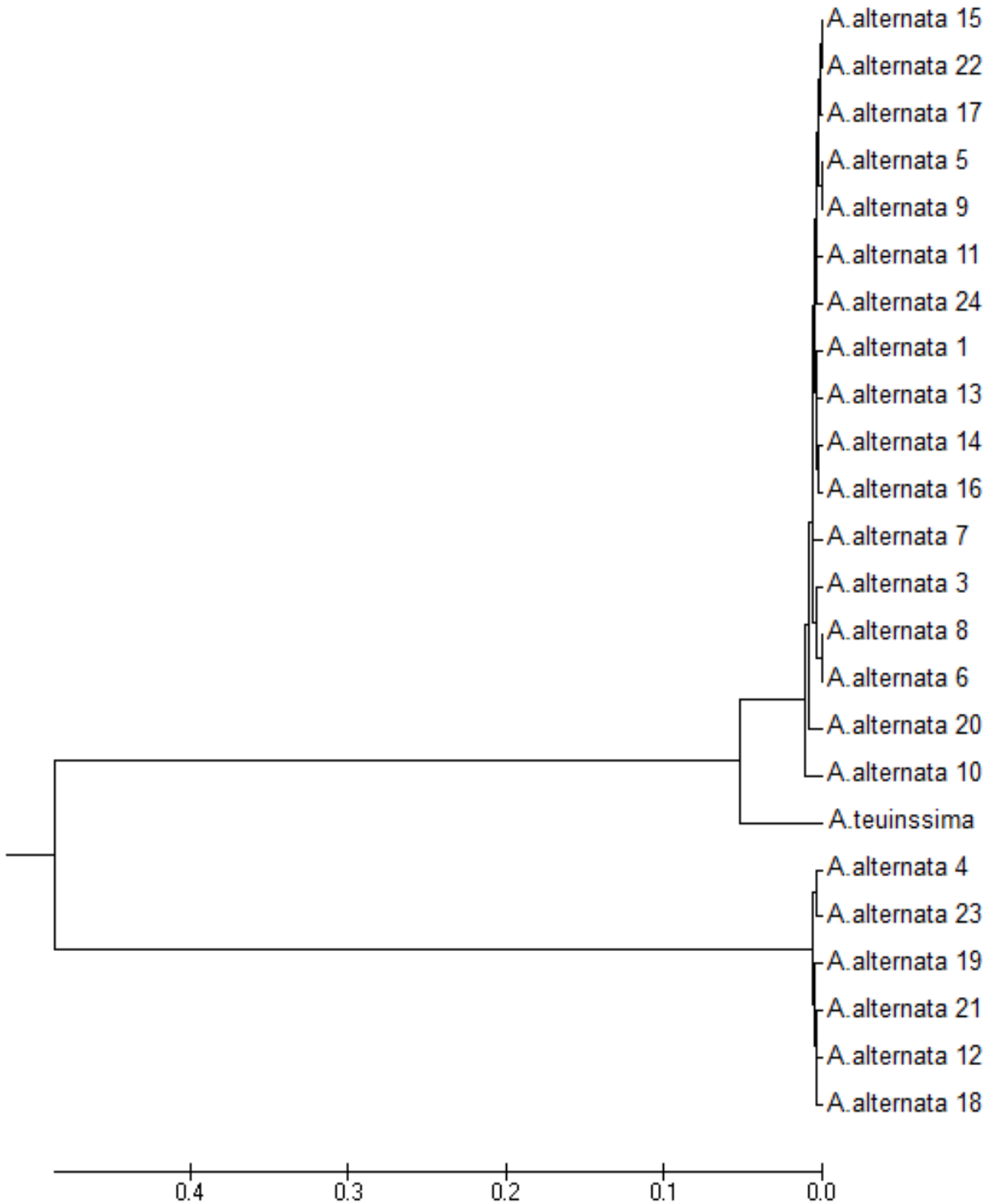
No.of Karbala Alternaria isolate	Accession Number	Country	Expect
1	KJ716875.1	China1	0
1	HE649372.1	Saudia Arabia	0
1	KJ716876.1	China3	0
4	KJ739880.1	Turkey	0
4	KJ677245.1	Mexico	0
2	JF710531.1	India	0
2	KF887131.1	China	0

اما نتائج تحليل تسلسل الحامض النووي DNA sequencing لمنطقة ITS ببرنامج Mega 6 فقد وضعت عزلات الفطر *A.alternata* في مجموعتين تطابق افراد كل مجموعة فيما بينها واختلفت المجموعة الاولى عن المجموعة الثانية بمقدار 0.5 شملت المجموعة الاولى 17 عزلة هي (1,3,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15,16,17,20, 22, 24) وشملت المجموعة الثانية 6 عزلات هي (4, 12, 18, 19, 21, 23) فيما استبعدت العزلة رقم 2) عن كلا المجموعتين ويمثل شكل 8 تطابق العزلات Aligment باستخدام برنامج Mega 6 اذ يستطيع هذا البرنامج مقارنه تسلسلات الحمض النووي على مستوى القاعدة النروجينية الواحدة من ناحية نوع القاعدة او وجودها من عدمه.

وهذا يعني ان عزلات الفطر *A.alternata* السائدة في كربلاء هي عبارة عن مجموعتين مختلفتين من الناحية الوراثية. كما حددت بعض الاختلافات البسيطة بين العزلات ضمن كل مجموعة ويعزى هذا الاختلاف الى تأثير الظروف البيئية المختلفة على جينوم genome هذه العزلات ولا يعد هذا الاختلاف البسيط ذا معنى من الناحية الجزيئية او الوراثية (Kuninaga, and Yokusawa. 1987).

ومن خلال هذا البرنامج ايضاً امكن رسم الشجرة التطورية لعزلات الفطر *A.alternata* وكما في الشكل (9) لقد مثل هذا الشكل الشجرة التطورية لعزلات الفطر *A.alternata* حيث رسمت هذه الشجرة وحددت المسافة الوراثية بين جميع العزلات باستخدام برنامج Mega 6 لتسلسل منطقة ITS الذي تم الحصول عليه من الشبكة العالمية للمعلومات (الانترنت) واجريت به هذه التحاليل اضافة الى فحص التطابق بين العزلات Aligment.

وتاتي هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه De Hoog (2002) من ان الفطر *A.alternata* محافظاً جداً على النظام التطوري ويمتلك تغاير وراثي منخفض جدا وهي اقرب ماتكون الى النوع *A.tenuissima* اذ تم الحصول على تسلسل القواعد النروجينية للحمض النووي DNA sequencing للقطعة المستهدفة من منطقة الـ ITS



شكل (9) الشجرة التطورية لعزلات الفطر *A.alternata* حسب برنامج Mega 6

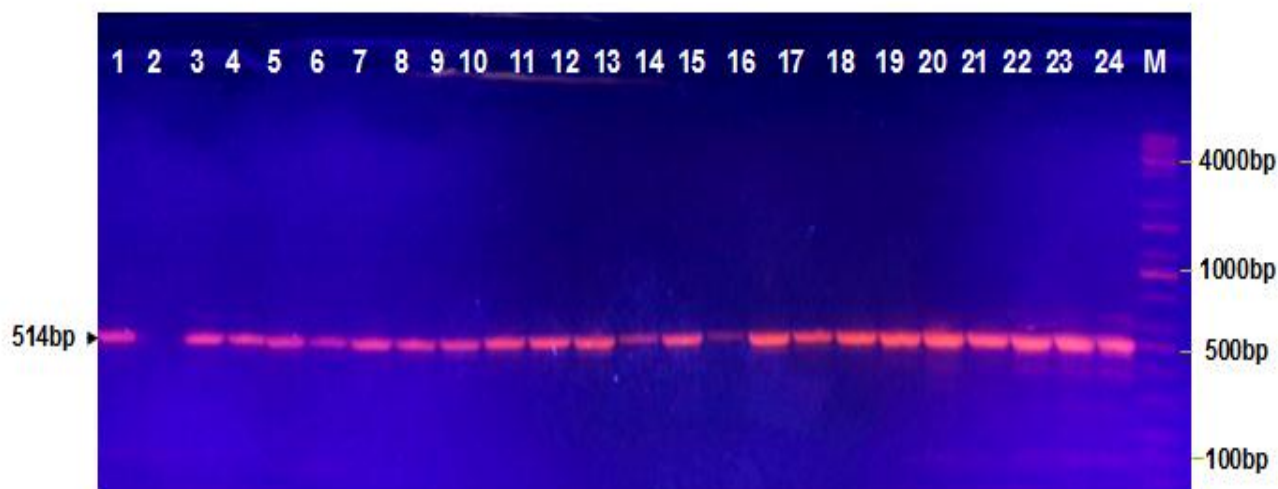
4-2: الكشف عن جين *pksJ* gene المسؤول عن انتاج السم Alternariol

يشير الشكل (10) الى نجاح البادئ PKSJ Primer والمصمم في هذه الدراسة للكشف والتحري عن الجين المسؤول عن انتاج سم AOH حيث استطاع هذا البادئ تضخيم القطعة المستهدفة من *PKSJ* gene وانتاجية حزم بوزن جزئي 514pb على هلام الاكاروز لجميع العزلات التي انتجت السم حسب نتائج التجربة الواردة في الفقرة (3-5-2) وفشل هذا البادئ مع العزلة 2 التي لم تتمكن اساسا من انتاج سم AOH وحسب التجربة اعلاه الا ان مسالة ترك هذه العزلة في هذه التجربة هي بمثابة اعتبارها سيطرة سالبة لتأكيد عمل البادئ . وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Debjani وآخرون (2012) من ان الجين المسؤول عن انتاج سم الالترناريول AOH في جينوم الفطر *A.alternata* هو الجين *PKSJ* gene وعلى الرغم من تمكن الباحث اعلاه من تحديد تسلسل قواعد الحمض النووي لهذا الجين الا انه لم يشر الى تصميم بوادئ متخصصة تعمل على تحديد وجود الجين من عدمه في عزلات الفطر *A.alternata* .

وتعد هذه الدراسة هي الدراسة الوحيدة عالميا التي تضمنت تصميم بادئ متخصص

specific primer للكشف عن جين *pksJ* gene المسؤول عن انتاج سم الالترناريول AOH

في عزلات الفطر *A.alternata* .



شكل (10) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنتائج البلمرة بجهاز الـ PCR بوزن 514bp للكشف عن تضخم جين *pksJ* تحت الاشعة فوق البنفسجية وباستخدام صبغة بروميد الاثديوم

3-4: استخلاص وتنقية سم الالترناريول AOH

1-3-4: الكشف عن انتاج سم الالترناريول AOH باستخدام كروموتوغرافيا

الطبقة الرقيقة TLC

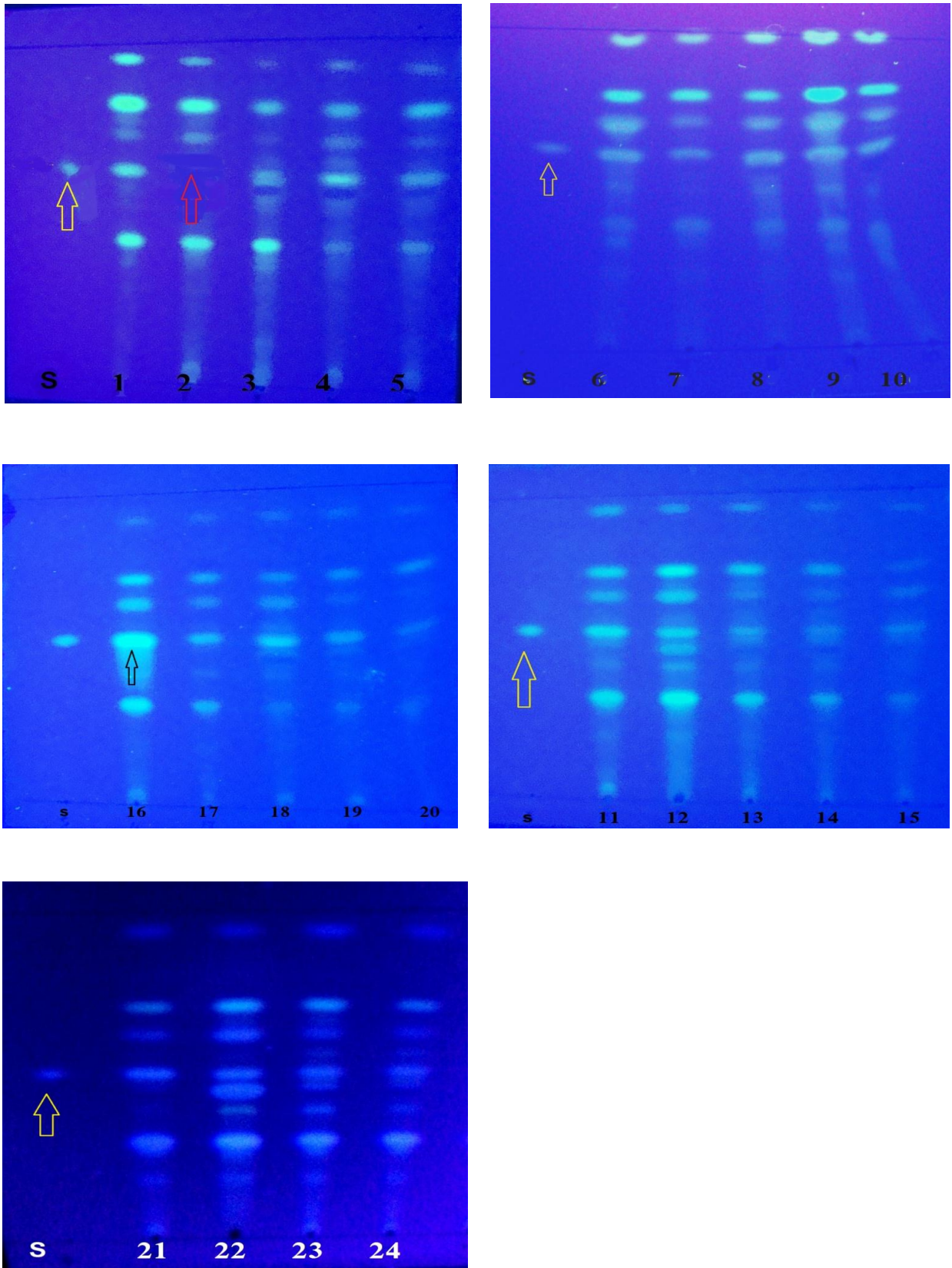
اظهرت نتائج الكشف عن انتاج سم AOH باستخدام كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC وبالمقارنة مع بقعة السم القياسي ان 23 عزلة تعود للفطر *A.alternata* لها القدرة على انتاج سم AOH فيما لم تستطع العزلة 2 والتي شخصت على انها *A.tenuissima* من انتاج السم وكانت العزلة رقم 16 هي العزلة الاكفأ في انتاج السم AOH والتي استخدمت لاحقا في جميع التجارب المختبرية التي تخص تأثير الظروف البيئية وإنتاج السم والشكل 11 يوضح ظهور بقع السم على صفائح TLC بالمقارنة مع بقعة السم القياسي ولون التالفق اذ اشار Asam وآخرون

(2010) الى ان بقعة سم AOH ذات تالق ازرق براق تحت الاشعة فوق البنفسجية UV وعلى الطول الموجي 365 نانوميتر باستخدام صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة نوع G60.

وتأتي هذه النتائج متفقة مع ما اشار اليه Li and Liangcheng (2006) من ان اغلب عزلات الفطر *A.alternata* لها القدرة على انتاج سم AOH وتحت مختلف الظروف وعلى اغلب عوائله النباتية (Barkai-Golan, 2008) وهذا ماتم ملاحظته فعلا حيث لوحظ ان جميع عزلات الفطر *A.alternata* قيد الدراسة كان لها القدرة على انتاج سم الالترناريول AOH.

4-3-2: حساب معامل السريان لسم الالترناريول AOH

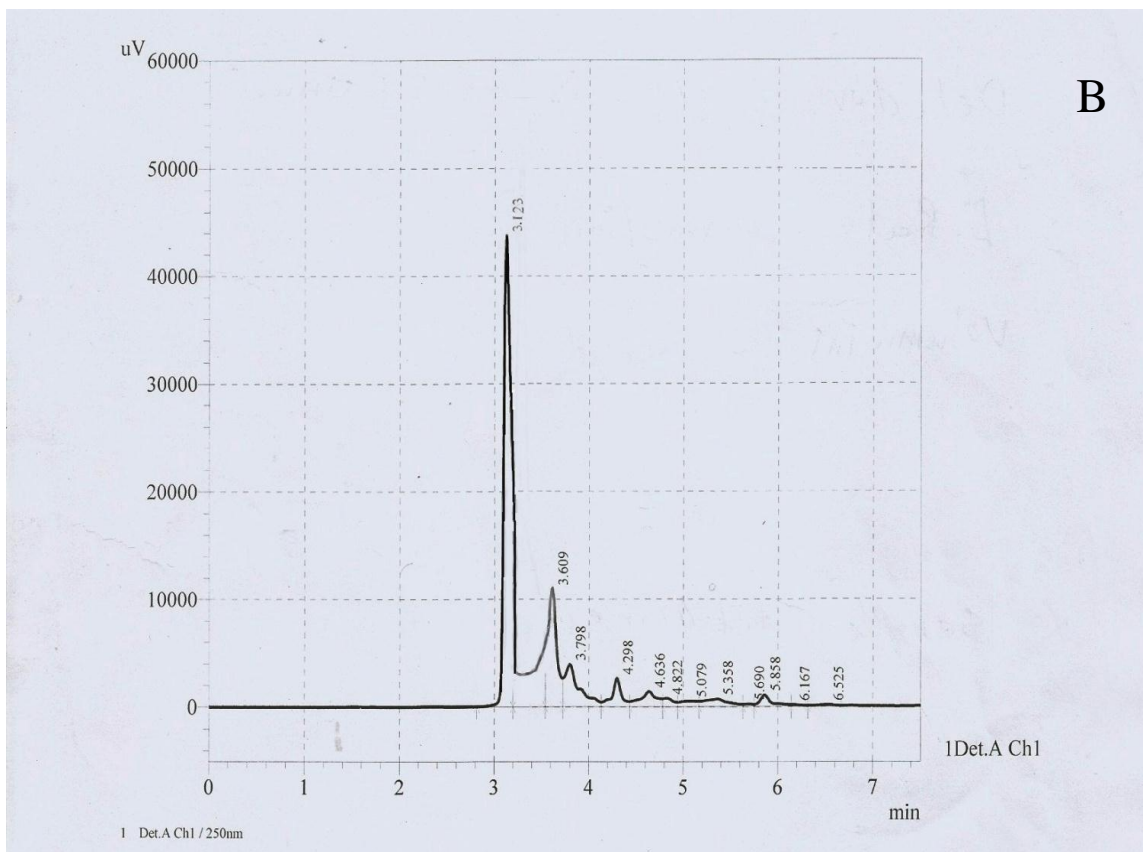
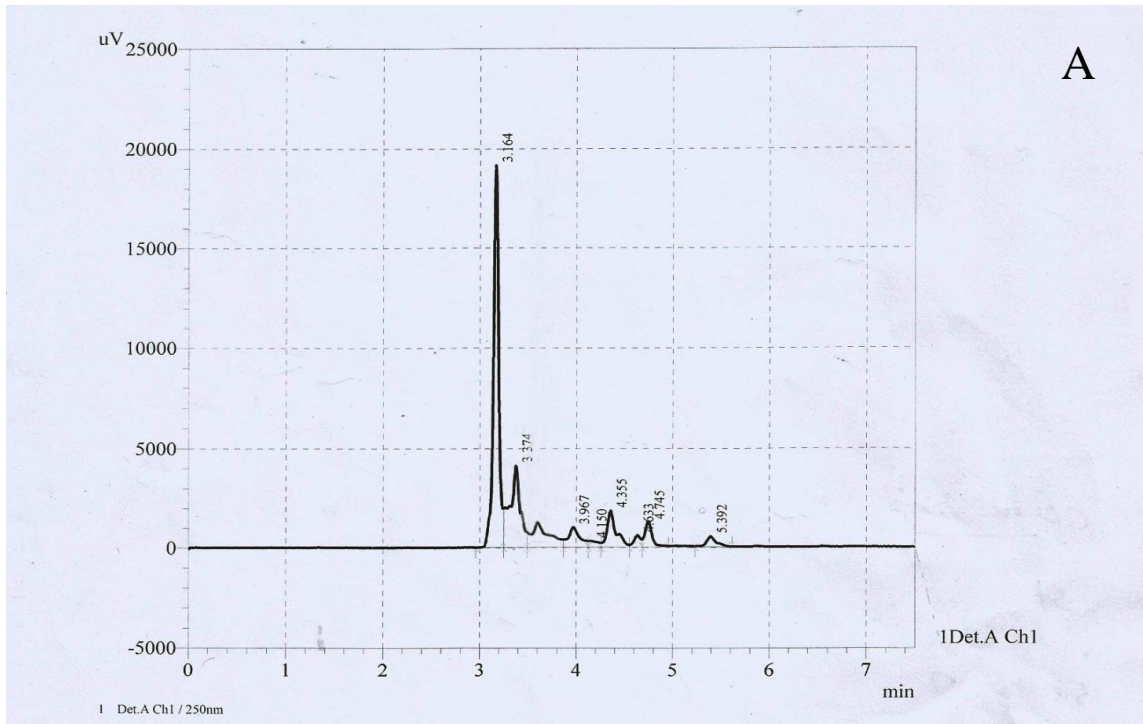
اظهرت نتائج حساب قيمة معامل السريان لسم AOH ان سم الالترناريول AOH يمتلك معامل سريان يساوي 0.43 عند استخدام طور متحرك يتكون من Tuleun : Athylacetate : Formic acid ونسبة 1 : 3 : 6 يذكر ان قيمة معامل السريان تختلف باختلاف الطور المتحرك او باختلاف نسبة كل مادة الى الاخرى كما ولم تشر المصادر الى قيمة معامل سريان سم AOH باستخدام الطور المتحرك أعلاه.



شكل (11) لوحة TLC (هلام السيليكا 10x10 cm G60) (تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية 336 نانومتر) يوضح بقع سم الالترناريول والبقعة القياسية باستخدام الطور المتحرك (التولوين، خلات الإيثيل، حامض الفورميك) 6 : 3 : 1 للعزلات 1-24

4-3-3: الكشف عن سم الالترناريول AOH باستخدام جهاز HPLC

يوضح الشكل 12، ان المادة التي استخلصت من نواتج ايض الفطر *A.alternata* كانت سم الالترناريول AOH بالمقارنة مع منحنى السم القياسي ووقت الظهور لكل منهما كذلك يلاحظ من الشكل اعلاه وجود بعض المواد الاخرى ولكن بتراكيز واطئة لا تعد مؤثرة على عملية الاستخلاص والنقاوة حيث يشير بروتوكول الشركة المجهزة للسم القياسي الى ان نسبة نقاوته بلغت 98% وهذا واضح من الشكل اعلاه هذا من جهة وربما يعزى ذلك الى حدوث حالات تلوث اثناء عملية الاستخلاص والتنقية ومن جهة اخرى قد يكون هناك مركبات اخرى في نواتج الايض قريبة جدا من سم AOH اثناء الاستخلاص بحيث يصعب فصلها عن السم وهذا ما يؤكد وجودها في منحنى السم القياسي ومنحنى السم المستخلص مع اختلاف التراكيز ولا توجد اي اهمية لهذه المواد بسبب انخفاض تراكيزها الى المستوى غير المؤثر.



شكل (12) الكشف عن سم AOH المستخلص من عزلة 16 بجهاز HPLC ومقارنته مع السم القياسي
 A - السم القياسي B - السم المستخلص اثناء الدراسة

4-4: تأثير بعض الظروف البيئية في نمو الفطر *A.alternata* وإنتاجه لسم

AOH

4-4-1: تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر *A.alternata* وإنتاجه سم AOH

يوضح الجدول 11 ان درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر *A.alternata* (عزلة 16) كانت 25م° اذ بلغ معدل قطر مستعمرة النمو 8.2 سم وقد اختلف معنوياً على مستوى احتماليه $P<0.05$ عن معاملة درجات الحرارة الاخرى في حين بلغ اقل نمو ويفارق معنوي عند درجة حرارة 35 م° كذلك انخفض معدل النمو عند درجة حرارة 20 م° ويفارق معنوي ايضاً عن المعاملات الاخرى وهنا ربما يعود السبب في هذا الانخفاض الى ضعف النمو مع ارتفاع او انخفاض درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو الى التأثير على الانزيمات المسؤولة عن النمو والفعاليات الحياتية الاخرى (الاسدي والسعدون، 2011)، في حين سجلت درجة الحرارة 35 م° اقل نمو بلغ 2.1 سم وهنا اتفقت هذه النتيجة مع ما اشار اليه كل من Stavely and (1970) Main و Slana (1971) Stavely and من ان اقل نمو سجل للفطر *A.alternata* كان عند درجة حرارة 38 م°.

ان معدل نمو الفطر يتاثر بانخفاض وارتفاع درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو والسبب في ذلك يعود الى ان ارتفاع درجة الحرارة يوتر على جميع تفاعلات الخلية التي تشترك فيها الانزيمات حيث تؤدي الى احداث خلل في عمل هذه الانزيمات اما انخفاض درجة الحرارة فيؤدي الى توقف عبور المواد الغذائية من خلال الغشاء البلازمي (Tanner, 1997).

كما ان نمو الفطريات يعتمد ويتحدد بنوع الإنزيمات او مدى تأثير البروتينات داخل الخلية بالحرارة اذ ان الانخفاض السريع في معدل سرعة النمو عند ارتفاع درجة الحرارة اكبر من المثلى يأتي نتيجة فقدان طبيعة الإنزيم المسيطر على سرعة النمو او ربما انزيمات اخرى (المظفر، 1983).

ولقد وجد ان الاحياء الاليفة لدرجة الحرارة العالية تمتلك إنزيمات أكثر استقرارا بهذه الدرجة ولا تفقد طبيعتها بسهولة .كذلك تأثير سرعة التفاعلات داخل الخلية وإنتاجها مركبات اىضية كالمسوم الفطرية بعامل الحرارة (Chaplin and Bucke, 1990).

جدول(11) تأثير درجة الحرارة في نمو الفطر *A.alternata* بعمر 7 ايام وانتاجه سم AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA

درجة الحرارة	معدل قطر مستعمرة النمو (سم)	معدل انتاج السم (مايكروغرام / مل)
20	4.3±0.28 ^a	124.5 ^a
25	8.2±0.25 ^b	112.8 ^b
30	6.1±0.10 ^c	141.1 ^c
35	2.1±0.05 ^d	74.5 ^d
L.S.D	0.38	0

عندما تكون الاحرف مختلفة أي ان الفروقات معنوية
عندما تكون الاحرف متشابهة أي ان الفروقات غير معنوية P<0.05

ومن الجدول اعلاه يلاحظ ان درجة الحرارة أثرت ايضاً وبفارق معنوي في عملية انتاج سم AOH حيث مثلت درجة حرارة 30 م أعلى قيمة لانتاج السم وبلغت 141.5 مايكروغم/مل في حين انخفض معدل الانتاج وبفارق معنوي مع ارتفاع درجة الحرارة وصولا الى 74.5 مايكرو غرام/مل عند درجة حرارة 35 م وأشار Pose (2010) واخرون الى ان افضل درجة حرارة لانتاج

سم AOH هي 28 م كما وتأتي هذه النتائج متفقه مع يؤكد عليه Pose وآخرون (2009) من ان درجة الحرارة الملائمة لنمو الفطر *A.alternata* تختلف عن درجة الحرارة المثلى لانتاج سم AOH.

4-4-2: تأثير دالة الحموضة pH في نمو الفطر *A.alternata* و انتاج سم AOH

يوضح الجدول 12، تأثير دالة الحموضة في معدل نمو الفطر *A.alternata* و انتاج سم AOH حيث مثل pH عند القيمة 6 افضل حالة نمو للفطر والتي وصل فيها قطر مستعمرة النمو الى 8.5 سم وبفارق معنوي عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ عن بقية المعاملات الاخرى وقد مثل pH عند القيمة 8 اقل معدل نمو وصل الى 4.3 سم وتاتي هذه النتائج متفقه مع ما اشار اليه Mohapatra وآخرون (1977) من ان افضل pH لنمو الفطر *A.alternata* كان 6.5 ويقل معدل النمو بزيادة وانخفاض مستوى حامضية الوسط.

اما فيما يخص معاملة انتاج سم AOH فقد اختلفت المعاملات وبفارق معنوي مع تغيير قيمه الـ pH فقد مثل pH 6 اعلى انتاج بلغ 116.1 مايكروغرام/مل اما اقل قيمة انتاج فكانت عند pH 8 حيث بلغت 57.8 مايكروغرام/مل.

وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Brzonkalik وآخرون (2012) من ان الـ pH المثالي لإنتاج السم هو 4.5 وتفسر نتائج كل من Tanner (1997) و Morra (1997) تأثير الرقم الهيدروجيني في عملية إنتاج سم الـ AOH من ان الرقم الهيدروجيني قد يؤثر على تأين المركبات الموجودة في الوسط ودرجة ارتباطها بالانزيمات الموجودة في الغشاء البلازمي لخلية الفطر كذلك تأثيره على فعالية ونشاط هذه الانزيمات وباقي انزيمات الفطر ومن ثم زيادة سرعة العمليات الحيوية المرتبطة بها التي من ابرزها سرعة الانبات وسرعة تكوين الابواغ.

جدول(12) تاثير دالة الحموضة pH في نمو الفطر *A.alternata* بعمر 7 ايام وانتاجه سم

AOH بعمر 12 يوم على وسط PSA

معدل انتاج السم (مايكروغرام / مل)	معدل قطر مستعمرة النمو (سم)	دالة الحموضة (pH)
104.5 ^a	5.5±0.70 ^a	5
116.1 ^b	8.5±0.10 ^b	6
74.5 ^c	6.8±0.26 ^c	7
57.8 ^d	4.3±0.20 ^d	8
0	0.23	L.S.D

عندما تكون الاحرف مختلفة أي ان الفروقات معنوية

عندما تكون الاحرف متشابهه أي ان الفروقات غير معنوية P<0.05

4-4-3: تأثير نوع الوسط الزرعي في نمو الفطر *A.alternata* وانتاج AOH

يتبين من الجدول13، ان هناك فروق معنوية في معدل نمو الفطر *A.alternata* تبعاً لنوع الوسط الزرعي حيث اظهر وسط PSA تفوقاً معنوياً على الأوساط الأخرى في معدل نمو الفطر *A.alternata* حيث بلغ قطر مستعمرة النمو 8.2 سم فيما انخفض معدل النمو في انواع الاوساط الاخرى وصولا الى اقل معدل نمو بلغ 4.0 سم على وسط الـ sabouraud Dextrose agar وتأتي هذه النتائج متفقة مع ما اشارت اليه العديد من المصادر من ان وسط PDA يعد افضل انواع الاوساط الزرعية لنمو الفطريات (Saha et al., 2008)

وتتفق هذه النتائج مع ما وجدته Arunakumara (2006) إذ لاحظ تفوق وسط PDA على جميع الاوساط الاخرى في نمو الفطر *A. alternata* كذلك اتفقت هذه النتائج مع Mazzonetto وآخرون (1996) الذي اشار الى ان افضل وسط لنمو الفطر هو *A.alternata* PDA وربما يعود السبب في ذلك الى احتواء هذا الوسط على المواد الضرورية لنمو الفطر (Shahin and Shepared, 1979).

ولا تتفق هذه النتائج مع Ojiambo (1997) الذي أكد ان الوسط PDA لا يعد الوسط الأمثل لنمو الفطر *A.alternata* . وأوضحت النتائج تفوق وسط الزابك معنوياً على وسطي خلاصة الخميرة Yeast extract agar ووسط السابرويد Sabouraud agar ولربما يعود السبب في ذلك الى وجود نترات الصوديوم كمصدر للنيتروجين الضروري في تصنيع البروتينات الضرورية لانتاج التراكيب الخضرية للفطر فضلا عن احتوائه على سكر الدكستروز كمصدر للكربون (Goyal, 1977).

اما فيما يخص انتاج السم AOH فبيين الجدول اعلاه ان الوسط الزرعي PSA كان الافضل في انتاج السم اذ بلغت كمية الانتاج باستخدام هذا الوسط 112.8 مايكروغم/مل متفوقة معنوياً على بقية الاوساط الاخرى قيد الدراسة كذلك أوضحت النتائج تفوق وسط الزابك اكار معنوياً على كل من وسطي خلاصة الخميرة Yeast extract agar والسابرويد Sabouraud agar وهذه النتائج لا تتفق مع العديد من الدراسات التي تشير الى ان وسط خلاصة الخميرة يعد افضل الاوساط الزراعية المستخدمة لانتاج السموم الفطرية (Al-Fatlawy, 2012).

جدول (13) تأثير نوع الوسط في نمو الفطر *A.alternata* وانتاجه سم AOH بعمر 7 ايام

وانتاجه سم AOH بعمر 12 يوم

معدل انتاج السم (مايكروغرام / مل)	معدل قطر مستمرة النمو (سم)	نوع الوسط
112.8 ^a	8.2±0.10 ^a	PSA
104.5 ^b	7.1±0.35 ^b	Czapeck's Agar
77.8 ^c	5.8±0.37 ^c	Yeast Extract Agar
50.2 ^d	4.0±0.20 ^d	Sabouraud Agar
0	0.17	L.S.D

عندما تكون الاحرف مختلفة أي ان الفروقات معنوية

عندما تكون الاحرف متشابهة أي ان الفروقات غير معنوية P<0.05

4-4-4: تأثير عاملي الضوء والظلام في نمو الفطر *A.alternata* وإنتاجه السم

AOH

اوضحت نتائج الجدول 14، ان نمو الفطر تحت ظروف الظلام تفوق معنوياً عن نموه

تحت ظروف الضوء فقد وصل قطر مستعمره النمو الى 8.2 سم تحت ظروف الظلام فيما بلغ

6.5 سم تحت ظروف الضوء وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره (Slavov et al., 2004) من ان ظروف الضوء اخفضت معدلات نمو الفطر *A.alternata* وبفارق معنوي عن ظروف الظلام.

اما انتاج سم AOH فيوضح الجدول اعلاه تفوق معاملة الظلام وبفارق معنوي كبير عن معاملات الضوء إذ بلغت كمية الانتاج 182.8 مليغم/مل وهي اعلى قيمة سجلت لانتاج سم الالترناريول في جميع المعاملات السابقة وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Kenneth واخرون (1978) من ان معاملة الظلام لانتاج سم AOH تفوقت معنويا على معاملة الضوء إذ بلغت كمية السم المنتج 185 مليغم/مل تحت ظروف الظلام و 74.5 مليغم/مل تحت ظروف الضوء ولفترة حضان بلغت 7 ايام واعزى الباحث اعلاه السبب في ذلك الى امتلاك الفطر *A.alternata* مهيئات precursors تحفز انزيمي Malonyl COA و Acety COA واللذان يعدان المهيئين الرئيسيين لعملية التخليق الحيوي لسم AOH وفي حالة تعرض هذين المهيئين للضوء فان مسار التخليق الحيوي يتغير لتعمل على تخليق الصبغات Pigments.

جدول (14) تأثير عاملي الضوء والظلام في نمو الفطر *A.alternata* بعمر 7 ايام وانتاجه سم AOH بعمر

12 يوم على وسط PSA

معدل انتاج السم (مايكروغرام / مل)	معدل قطر مستمرة النمو (سم)	نوع المعاملة
74.5 ^a	6.5±0.35 ^a	ضوء
182.8 ^b	8.2±0,10 ^b	ظلام
0	2.41	L.S.D

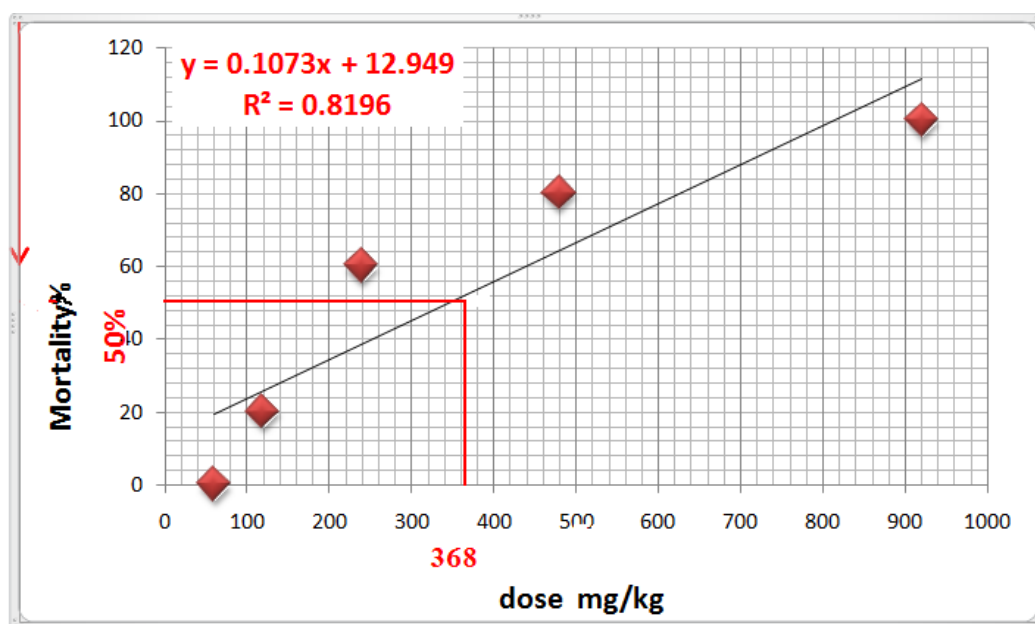
عندما تكون الاحرف مختلفة أي ان الفروقات معنوية وعندما تكون الاحرف متشابهة أي ان الفروقات غير معنوية P<0.05

4-5: حساب الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية LD₅₀ لسم AOH

اظهرت نتائج هذه التجربة ان قيمة الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية LD₅₀ لسم الالترناريول AOH قد بلغ 368 مليغم/مل للفئران وذلك باستخدام المنحنى القياسي للجرع المختلفة مع النسبة المئوية لنفوق الحيوانات المختبرية الكلية وبتطبيق معادلة الخط المستقيم بعد حقن هذه الحيوانات تحت غشاء الجنب بالتراكيز المبينة في الجدول 15، لمدة 24 ساعة سببت الجرعة 920 مليغم/مل نسبة موت بلغت 100% اما الجرعة 60 مليغم/كغم فلم تتسبب بموت أي من الحيوانات المختبرية، كما يوضح الشكل 13، المنحنى القياسي الذي حسب بواسطته قيمة الـ LD₅₀ وقد اختلفت هذه النتيجة عن ما ذكره Liu وآخرون (1992)، من ان قيمة LD₅₀ لسم AOH قد بلغ 400 مليغم/كغم بالنسبة للفئران وهذا الاختلاف ربما يعود الى طبيعة الحيوانات المختبرية من الناحية الصحية وظروف المعيشة التي تربي بها اضافة الى طبيعة النظام الغذائي المعتمد لتلك الحيوانات.

جدول (15) النسبة المئوية لموت الفئران لمجموعة جرع من سم AOH بعد 24 ساعة من الحقن

% لمعدل الوفيات	التراكم		عدد الفئران الميتة	عدد الفئران الحية	عدد الفئران	الجرعة مليغرام/كغم
	ميت	حي				
0	0	12	0	5	5	60
20	1	7	1	4	5	120
60	4	3	3	2	5	240
80	8	1	4	1	5	480
100	13	0	5	0	5	920



شكل (13) المنحنى القياسي لقيمة الجرعة الفاتلة لنصف الجماعة السكانية LD₅₀

4-6: تأثير سم AOH في المعايير الوراثية لذكور الفئران البيضاء

4-6-1: معامل الانقسام الخلوي Mitotic index

أظهرت النتائج وحسب الجدول 16، انخفاض قيمة معامل الانقسام الخلوي بعد 21 يوم من التعرض لسم AOH وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة حيث بلغت قيمته 10.6% عند التركيز 40 مليغم/كغم وانخفضت هذه النسبة مع زيادة التركيز لتصل الى 6.2% مع التركيز 60 مليغم/كغم و2.1% مع التركيز 80 مليغم/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغ فيها معامل الانقسام الخلوي 14.2% وكما في الشكل (14). وتؤكد هذه النتائج التأثير السام لسم الالترناريول AOH حيث ينخفض معامل الانقسام الخلوي مع زيادة تركيز المادة السامة (Solhaug *et al*, 2013) وتأتي هذه النتائج متفقة لما توصل اليه Bartek (2004) من ان سم AOH يعمل على استحداث توقف دورة انقسام الخلية من خلال تأثيره في بعض المواقع المسيطرة على عملية

الانقسام الخلوي. كما يعمل سم الـ AOH على تحطيم أجزاء من شريط الحامض النووي DNA حيث اثبت Solhaug وآخرون (2012) ان هذا التحطم يؤدي الى انخفاض او ضعف تكاثر الخلايا، كما تؤكد هذه النتائج مع ما توصل اليه Saure وآخرون (1978) من ان تضرر الخلية وموتها يعتمد على تركيز المادة السامة اذ نلاحظ من الجدول أدناه انخفاض معامل الانقسام الخلوي مع زيادة تركيز جرعة سم الـ AOH، ومن جانب آخر فان بعض الإنزيمات والبروتينات التي تسيطر على عملية الانقسام الخلوي وتضاعف الحامض النووي تتأثر ايضاً بالتعرض لهذا السم (Fehr et al., 2009).

جدول (16) تأثير تراكيز مختلفة من سم AOH في معامل الانقسام الخلوي لخلايا نقي العظم لذكور الفئران

المعاملات	%معامل الانقسام الخلوي بعد 21 يوم من التعرض لسم AOH
السيطرة	14.2± 0.90 ^a
T1 (40 mg/kg)	10.6± 1.20 ^b
T2 (60 mg/kg)	6.2± 0.45 ^c
T3 (80 mg/kg)	2.1± 0.15 ^d
L.S.D	1.4

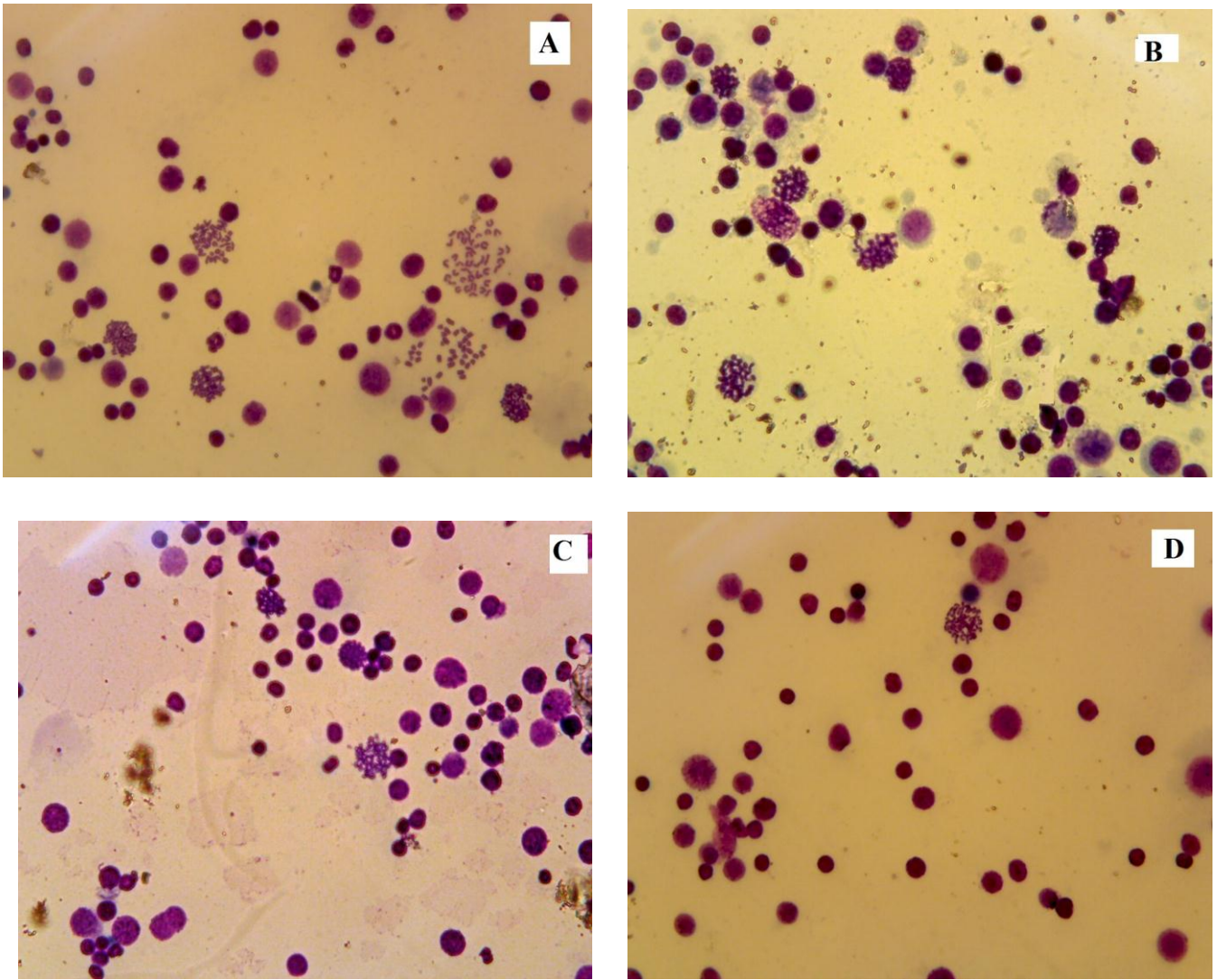
عندما تكون الاحرف مختلفة أي ان الفروقات معنوية

وعندما تكون الاحرف متشابهة أي ان الفروقات غير معنوية P<0.05

T1: تعني المعاملة الاولى

T2: تعني المعاملة الثانية

T3 : تعني المعاملة الثالثة



شكل (14) خلايا منقسمة لنقي عظم ذكور الفئران نتيجة التعرض لسـم AOH (المجهر المركب الاعتيادي 40x)

60mg/kg الجرعة -C

40mg/kg الجرعة -B

-A معاملة السيطرة

80mg/kg الجرعة -D

4-6-2: الانحرافات الكروموسومية Chromosomal Aberration

أظهرت نتائج الجدول 17، زيادة عدد الانحرافات الكروموسومية مع زيادة تركيز سم AOH وبفارق معنوي لجميع المعاملات حيث يسبب التركيز 40 مليغم/كغم نسبة الانحرافات بلغت 1.70% وازدادت هذه النسبة مع زيادة التركيز لتصل الى 3.55% عند التركيز 80 مليغم/كغم.

وتتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي تضمنت تأثير السموم الفطرية في احداث تشوهات غير طبيعية في كروموسومات خلايا نقي العظم (Al-Fatlawy, 2012) وأظهرت نتائج الدراسة الحالية حدوث اكثر من حالة تشوه لكروموسومات خلايا نقي العظم لذكور الفئران (الشكل 15) فقد تبين ان حالات Ring, Deletion, Acentric, and break chromosom هي اكثر حالات الانحرافات الحاصلة للكروموسومات نتيجة التعرض لسم AOH وهذا مؤشر على حدوث التغيرات الكروموسومية في هذه الخلايا وهذا التحطم الوراثي فيما لو ثبت او انتقل الى الطور الثاني لبناء الخلية في مراحل الانقسام الخلوي، فمما لاشك فيه انه سيقود لحدوث تأثيرات سرطانية Carcinogenic effect او تشوهات جنينية Teratogenic effect أو غيرها (Klassen, 2001).

ان التأثير الوراثي لأي مادة سامة يعزى الى التأثير على شريط الحمض النووي DNA خلال عملية البناء والتخليق ومن الممكن ان يؤدي هذا التأثير الى تثبيط او توقف عملية بناء الـ DNA أو ان يتسبب في تحطيمه (Obrecht-Pflumio and Dirheimer, 2000).

اما المسار الآخر للتأثيرات الوراثية للسموم الفطرية فهو يعزى الى ان للسموم الفطرية القدرة على تحرير الجذور الحرة free Radicals وخلق مايسمى بالاجهاد التاكسدي فلجذور الاوكسجين الحرة ROS كمجموعة الهيدروكسيل واوكسيد النتروجين القدرة على تحطيم القواعد النيتروجينية لشريط الدنا DNA لتسبب في احداث مختلف التشوهات في شريط الـ DNA (Shukla et al., 2004).

الانحرافات الكروموسومية الكلية		تردد كل نوع من الانحرافات الكروموسومية										عدد الخلايا المحسوبة	الانحرافات الكروموسومية
		dicentric Chromosome		Deletion Chromosome		Acentric Chromosome		break Chromosome		Ring Chromosome			
النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %	العدد		
0.10	a 5±2.08	-	-	0.04	a 2±2.08	0.06	a 3±1.00	0	a 0	0	a 0	250	السيطرة
1.62	b 81±3.05	-	-	0.32	b 16±1.15	0.22	b 11±0.57	0.12	b 6±3.21	0.96	b 48±4.35	250	(T1) 40 mg/k g
2.42	c 121±5.50	-	-	0.44	c 22±3.60	0.32	c 16±4.16	0.18	b 9±0.57	1.48	c 74±2.08	250	(T2) 60 mg/k (g)
3.38	d 169±2.64	-	-	0.56	d 28±1.73	0.60	d 30±1.00	0.26	c 13±4.16	1.96	d 98±1.52	250	(T3) 80 mg/k (g)
	6.7				4.3		4.1		4.9		4.5		L.S. D

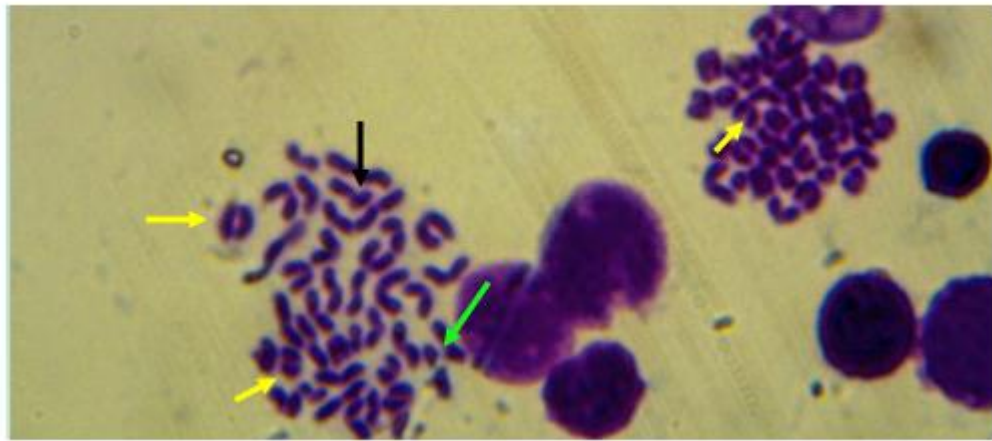
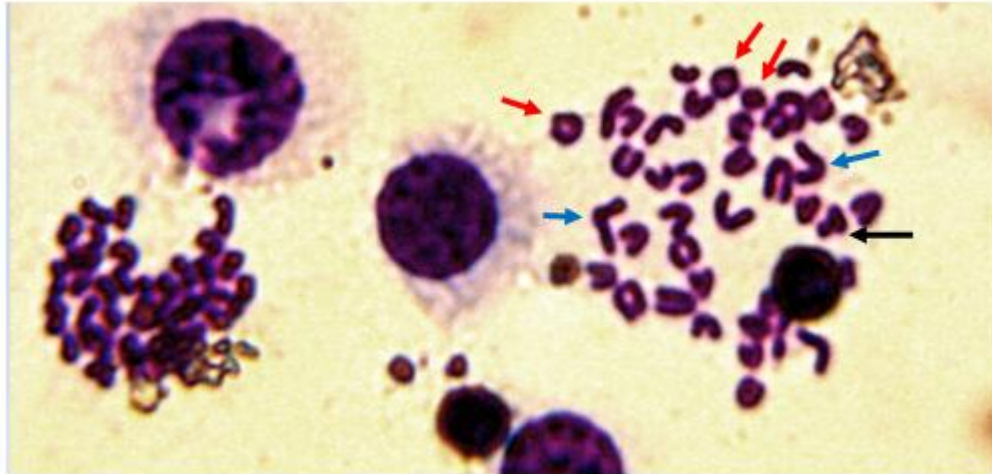
جدول (17) تأثير تراكيز مختلفة من سم AOH في النسبة المئوية لتردد كل نوع من الانحرافات الكروموسومية واعدادها في خلايا نقي عظم نكور الفئران عندما تكون الاحرف مختلفة أي ان الفروقات معنوية وعندما تكون الاحرف متشابهة أي ان الفروقات غير معنوية
P<0.05

T3: تعني المعاملة

T2: تعني المعاملة الثانية

T1: تعني المعاملة الاولى

الثالثة



شكل (15) الانحرافات الكروموسومية لخلايا نقي العظم لذكور الفئران المجرعة بتركيز مختلفة من سم AOH
(100X).

Acentric chromosome	→	Ring chromosome	→
deletion chromosome	→	Break chromosome	→
		fragments	→

4-6-3: معامل تكوين الانوية الصغيرة

تشير نتائج الجدول 18، الى زيادة معامل تكوين الانوية الصغيرة ويفارق معنوي لجميع المعاملات بالمقارنة مع معاملة السيطرة حيث ازداد معامل تكوين هذه الانوية وصولاً الى

16.2% عند التركيز 80 مليغم/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغ فيها هذا المعامل 3.7%، ويعد معامل تكوين الانوية الصغيرة واحداً من اهم مؤشرات تحطم الكروموسومات والحامض النووي DNA (Streffer *et al.* 1998) والشكل (16) يوضح تكون هذه الانوية نتيجة التعرض لسم AOH .

وتأتي هذه النتائج متممة لما ظهر في نتائج الفقرتين السابقتين والتي يظهر فيها زيادة معامل الانقسام الخلوي وزيادة معدل حدوث الانحرافات الكروموسومية نتيجة التعرض لسم AOH.

جدول (18) تأثير تراكيز مختلفة من سم AOH في معامل تكوين الانوية الصغيرة لخلايا نقي العظم لذكور الفئران

المعاملات	% تكوين الانوية الدقيقة بعد 21 يوم من التعرض لسم AOH
السيطرة	3.7± 0.17 ^a
T1 (40 mg/kg)	8.2± 0.55 ^b
T2 (60 mg/kg)	11.6± 0.26 ^c
T3 (80 mg/kg)	16.2± 0.15 ^d
L.S.D	2.7

عندما تكون الاحرف مختلفة أي ان الفروقات معنوية وعندما تكون الاحرف متشابهة أي ان الفروقات غير معنوية P<0.05 T1:تعني المعاملة الاولى T2: تعني المعاملة الثانية T3: تعني المعاملة الثالثة



شكل (16) الانوية الصغيرة لخلايا نقي العظم لذكور الفئران المجرعة بتركيز مختلفة من سم AOH

وقد اتفقت جميع نتائج اختبارات معايير الوراثة الخلوية اعلاه مع ما توصلت إليه الهيئة الأوربية لسلامة الأغذية (EFSA) (2011) في دراسة موسعة لسموم الفطر *A.alternata* حيث اثبتت ان السم AOH هو مادة سامة للخلايا Cytotoxic ويأتي بالدرجة الثانية من ناحية مخاطره السمية بعد سم ATX-II الذي يعد اخطر انواع سموم هذا الفطر وتكمن خطورة سم AOH من خلال تأثيره في مرحلتي S,G0 من مراحل الانقسام الخلوي (Lehmann *et al.*, 2005) ويعد هذا السم المسؤول الأول عن تحطم اشربة الحمض النووي DNA كميكانيكية عمل داخل جسم الكائن الحي او انه يعمل على زيادة توليد جذور الاوكسجين الحرة حتى مع المستويات الواطئة لتركيز السم (Solhaug *et al.*, 2013) اما التراكيز العالية فتعمل على التحطيم المباشر للـ DNA وموت الخلايا (Lehmann *et al.*, 2005).

الاستنتاجات

- 1- تشخيص مجموعتين فقط للعود للفطر *A.alternata* في محافظة كربلاء.
- 2- نجاح البادئ AAF2 و AAR3 في تخصصه لتشخيص عزلات الفطر *A.alternata* المنتشرة في محافظة كربلاء وباستخدام تقنية البلمرة.
- 3- يعد التشخيص الجزيئي باستخدام تقنية الـ DNA Sequencing نتائج غير قابلة للخطأ ومعتزف بها عالمياً ومن خلالها يمكن تحديد التغيرات الوراثية على مستوى العزلات.
- 4- نجاح البادئ PKSJ في التعرف على الجين المسؤول عن عملية إنتاج سم الـ AOH.
- 5- قدرة جميع عزلات الفطر *A.alternata* قيد الدراسة على إنتاج سم الـ AOH.
- 6- اثرت كل من العوامل البيئية (درجة الحرارة ودالة الحموضة pH ونوع الوسط الزعي والضوء والظلام) في نمو الفطر *A. alternata* وإنتاجه سم AOH.
- 7- بلغت الجرعة القاتلة لنصف الجماعة السكانية LD₅₀ لسم AOH 368 مليغم/كغم للفئران.
- 8- لسم الالترناريول AOH القدرة على خفض معامل الانقسام الخلوي وإحداث زيادة في معدل الانحرافات الكروموسومية وتكوين الانوية الصغيرة .

التوصيات

- 1- اجراء دراسات واسعة تشمل جميع محافظات العراق للكشف عن سلالات الفطر *A.alternata* .
- 2- استخدام التقنيات الجزيئية المختلفة في تشخيص الفطريات
- 3- الكشف عن انواع الاخرى للجنس *Alternaria* التي لها القدرة على انتاج سم AOH.
- 4- الكشف عن السموم الاخرى التي تنتج من قبل الفطر *A.alternata* والتي لها تاثيرات سمية للكائنات الحية .
- 5- دراسة تاثير التداخل بين الظروف البيئية المختلفة على نمو الفطر *A.alternata* وانتاجه سم AOH.
- 6- دراسة تاثيرات السموم الاخرى المنتجة من قبل الفطر *A.alternata* على المعايير الوراثية في خلايا نقي العظم لذكور الفئران.
- 7- إجراء دراسات لتحديد العوامل الفيزيائية والكيميائية والإحيائية التي لها القدرة على تحطيم سم AOH او التقليل من تأثيراته السامة.

المصادر العربية

هادي، فرات عبد الحمزة وناصر، خالد سلمان، (2010). تأثير عقار الفولتارين في بعض المؤشرات الوراثية في الفئران البيض مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 23، العدد (1).

الاسدي ، رامز مهدي صالح والسعدون ، عبد الله حمود ، (2011). دراسة للفطر *Alternaria alternate* كمسبب لمرض خياس طلع نخيل التمر مجلة البصرة لاجتات نخلة التمر . المجلد (10) :العدد 2

الراوي، خاشع محمود وعبدالعزيز خلف الله. (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

الحمداي، عدنان حمد عبيد و سرحان، عبد الرضا طه وعبد الحسين، محمد محسن (2011) الكشف عن قابلية بعض الفطريات الانتهازية المسببة لالتهابات الإذن الوسطى على إنتاج الأفلاتوكسين مجلة كلية المأمون الجامعة العدد السابع عشر ص(157-164).

عبد الحميد ، عبد الحميد محمد . (2000) . الفطريات والسموم الفطرية . كلية الزراعة - جامعة المنصورة .

الهيبي ، أياد عبد الواحد. (1992) . السموم الفطرية ، المفهوم العام - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - جامعة بغداد .

المظفر، سامي عبد المهدي. (1983). حركيات الانزيمات الجزء الثاني . مطبعة الخلود، بغداد.

محمد ، علا جاسم.(2012). دراسة مظهرية وجزيئية وامراضية للفطر *Alternaria* رسالة ماجستير ،كلية العلوم/ جامعة بابل

المصادر الاجنبية

- Ad'hiah, A. H., Suliaman, G. M. and Al-Zaidy, M. S. (2007).** Some immunological evaluation of Propolis in albino male mice. Journal of the Faculty of medicine (Accepted).
- Agnes, A. (2009).** Distribution and characterization of sweet potato *Alternaria* blight isolates in Uganda. MSc. Thesis. Makerere University, pp. 81.
- Agrios, G. N. (2005).** Plant pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press Amsterdam. pp. 922.
- Alexandrakis, G., Sears, M. and Gloor, P. (1996).** Postmortem diagnosis of *Fusarium* panophthalmitis by the polymerase chain reaction. Am J Ophthalmol 121:221–223.
- Al-Fatlawy, A. R. (2012).** Toxic Effects of Ochratoxin A in Rats and Pups. PHD thesis Veterinary Medicine College University of Baghdad.
- Allen, J.w. , Shaler, C.F., Menders, R.W. and Ollat, S.A. (1977) .** A simplified technique for *in vivo* analysis of sister chromatid exchange using 5- bromodeoxyuridine tablets .Cytogenet cell Genet. 18: 231- 237.
- Al-Terehi M. N., Al Ameri Q. M., Al Saadi, A. H. and Ewadh M. J. (2013).** Cytotoxic and Genotoxic Effect of Aflatoxin B1 Research in Pharmacy 3(1): 07-13.
- Andersen, B., Kroger, E., and Roberts, R. G. (2001).** Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen*, and *A. ongipes* Mycological Research.(105) 3: 291–299
- Anginyah, T. J., Narla, R. R., Carey, E. E. and Njeru, R. (2001).** Etiology, effect of soil pH and Sweetpotato varietal reaction to

- Alternaria* Leaf petiole and stem blight in Kenya. African Crop Science Journal, 9: 287-282.
- Arunakumara, K. T. (2006).** Studies on *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Jones and Grout Causing Early Blight of Tomato M.Sc. Thesis University of Agricultural Sciences. College of Agriculture, Dharwad. pp. 70.
- Asam S. Konitzer K. and Rychlik M. (2010).** Precise determination of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in cereal, fruit and vegetable products using stable isotope dilution assays. Mycotoxin Research, 27: 23-28.
- Avni, T., Leibovici, L., and Paul, M. (2011).** PCR diagnosis of invasive candidiasis systematic review and meta-analysis. J clin microbiol., 49(2): 665–670.
- Barkai-Golan R. (2008).** *Alternaria* mycotoxins. In: Mycotoxins in fruits and vegetables.. Academic Press, San Diego, CA, USA, 185-203.
- Barnett, H.L. and B.B. Hunter. (1973).** Illustrated genera of imperfect fungi. pp 240.
- Bartek, J., Lukas, C. and Lukas, J., (2004).** Checking on DNA damage in S phase. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 792-804.
- Batista, D. C., Lima, M. A., Haddad, F., Maffia, L. A., and Mizubuti, E. S. G. (2006).** Validation of decision support systems for tomato early blight and potato late blight, under Brazilian conditions. Crop Prot. 25:664-670.
- Bellemain, E.; Carlsen, T.; Brochmann, C.; Coissac, E.; Taberlet, P. and Kauserud, H. (2010)** ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10: 2180-2189.

- Belloch, C., Fernandez-Espinar, T., Querol, A., Garcia, M. D. and Barrio, E.(2002).** An analysis of the inter and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon. *Yeast*. 19: 257-268.
- Benson, H.J. (2002).** Microbiological Applications. 8th ed. McGraw – Hill Companies, Inc. USA. pp. 22-105.
- Boermans, H. J., and Leung, M.C. (2007) .** Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *Internat. Food Microbiol.* 98: 3309-3316.
- Booth, C. (1971).** Methods in Microbiology. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. England. pp. 20-23.
- Borman, A. M.; Linton, S. M.; and Johnson, M. E. (2008)** Molecular identification of pathogenic fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: 61(1) i7–i12.
- Bottalico, A. and Logrieco, A. (1998).** Toxigenic *Alternaria* species of Economic Importance. In: H.K. Sinha and D. Bhatnagar(eds.) *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 65-108.
- Bridge, P.D., Hawksworth, D.L., Kozakiewics, Z., Onions, A.H.S., Paterson, R.R.M., Sackin, M.J. and Sneath, P.H.A. (1989).** A Reappraisal of the Terverticillate *Penicillia* using biochemical, physiological and morphological features: I. Numerical Taxonomy. *J. Genet. Microbiol.*, 135: 2941-2966.
- Brugger, E.M., Wagner, J.r., Schumacher, D.M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M., Lehmann, L., (2006).** Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*.164: 221-230.

- Brzonkalik K, Hummer D, Sylatk C. and Neumann A (2012)**
Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation. AMB Express 10.1186/2191-0855-2-28.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M. (1994) .**
DNA amplification fingerprinting with very short primers. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 18-25.
- Chaplin, M.F. and Bucke, C. (1990)** Enzyme Technology. Cambridge: Cambridge University Press. This book is out of print, an electronic version is updated by M. Chaplin and available .
- Chelkowski, J. and Visconti, A. (1992).** *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, pp. 449–541.
- Cho, H. S., Kim, B. R. and Yu, S. H. (2001).** Taxonomic studies on *Alternaria* in Korea. Mycobiology, 29: 27-42.
- De Hoog, G. S., Uijthof, J. M. J., Gerrits, A. H. G., Figge, M. J. and Weenink, X. O. (1997).** Comparative rDNA diversity in medically significant fungi. Microbiol. Cult. Coll. 13: 39-48.
- De Hoog, G.S. and Horr , R. (2002).** Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species described from humans and their identification in the routine laboratory. Mycoses 45, 259-276.
- De Hoog, G. S. and Vitale, R. G. (2007).** *Bipolaris, Exophiala, Scedosporium, Sporothrix, and other dematiaceous fungi.* In: Murray, P.R. *et al.* (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington Pp. 1898.

- Dmello, J. P. F. (1991).** Antigenic proteins in Toxic substances in crop plants. Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry. pp. 107-125.
- EFSA (European Food Safety Authority), (2011)** Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food EFSA Journal. 9(10):2407.
- Ellis, M.B. (1971).** Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 608 pp.
- Escuredo, O., Seijo, M. C., González, M. F. and Iglesias, I. , (2010).** Effects of meteorological factors on the levels of *Alternaria* spores on a potato crop. Int J. Biometeorol 55(2):243-252
- Eshel, D., Miyara, I., Ailing.T., Dinoor, A. and Prusky, D. (2002).** pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. Molecular Plant- Microbe Interactions, 15: 774-779.
- Etcheverry, M. , Chulze S. , Dalcero A. , Varsavsky E. and Magnoli C. (1994).** Effect of water activity and temperature on Tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on sunflower seeds June, Volume 126, Mycopathologia Issue 3: 179-182 .
- Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J., Christensen, M.O., Boege, F., Altemoller, M., Podlech, J. and Marko, D., (2009).** Alternariol acts as topoisomerase a poison, preferentially affecting the Halpha isoform. Mol Nutr Food Res 53: 441-451.
- Fenech, M. 2000.**The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 455: (1-2) 81-95.

- Fetaih, H. A., Dessouki, A. A., Hassanin, A. A. and Tahan. A. S. (2014).** Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats.. pii: S0344-0338(14)00171.
- Fujita, S., and Hashimoto T. (2000).** DNA fingerprinting patters of *Candida* species using Hinfl endonuclease. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1381–1389.
- Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S. and Hashimoto, T.(2001).** Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *J. Clin. Microbiol.* 39(10):3617-3622.
- Galvano, F., A. Ritieni, G. Piva and A. Pietri. (2005).** Mycotoxins in the human food chain. In: Mycotoxin Blue Book (D. Diaz, ed). Nottingham University Press, UK, pp. 187-224.
- Gent, D. and Schwartz, H., (2003).** Validation of potato early blight disease forecast models for Colorado using various sources of meteorological data. The American Phytopathological Society Volume(87)1: 78 – 84.
- Gezimar, D. S.; Axel, M.; Cristina, D.; Bernd, S. and Edson, R. (2013)** Identification of *Alternaria alternata* Mycotoxins by LC-SPE- NMR and Their Cytotoxic Effects to Soybean (*Glycine max*) Cell Suspension Culture *Molecules* , 18(3), 2528-2538.
- Goyal, K. N. (1977).** Effect of pH, carbon and nitrogen nutrition on the growth of *Alternaria tenuis*. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 7: 155-157.
- Green, S. J., Freeman, S. , Hadar, Y. , and Minz, D.(2004).** Molecular tools for isolate and community studies of Pyrenomycete fungi. *Mycologia*, 96(3) pp. 439–451.

- Guarro, J., Gene, J. and Stchigel, A. M. (1999)** . Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev. 12: 454-500.
- Hasan, H.A.H. (1995)**. *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. Mycopathologia. 130: 171-177.
- Hasan, H.A. (1996)**. *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 43: 125–133.
- Hatzipapas, P.; Kalosaka,K.; Dara, A.; and Christias C. (2002)**. Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. Mycological Research. 106(11) :1349-1359.
- Heddle, J. A. (1973)** A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat. Res.18:187-190.
- Henrik N. R., Erik K., Martin R., Nils, H. and Henrik, K. L. (2008)** Intraspecific *ITS* Variability in the Kingdom *Fungi* as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification Evol Bioinform Online., 4: 193–201.
- Hershkovitz M. A. and Lewis L. A. (1996)**. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. Mol Biol Evol.,13:1276–1295.
- Hubballi, M., Nakkeeran S., Raguchander T., Anand T. and Samiyappan R.. (2010)**. Effect of Environmental Conditions on Growth of *Alternaria alternata* Causing Leaf Blight of Noni World Journal of Agricultural Sciences 6 (2): 171-177.
- Imran , Z.K. and Hasan , K.M.A.(2012)**. Identification of fungi in Gizzard of meat chickens in Babylon province by Chromagar

and PCR technique Basrah .J.of veterinary research. 11(4) :318-325.

Kaul, N. A. and Saxena, H. K. (1989). Physiologic specialization in *Alternaria solani* causing early blight of potato. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology. 18(2): 128-132

Keller, N. P., Nesbitt C., Sarr B, Phillips T. D. and Burow G. B. (1997). pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. Phytopathology. 87:643–648.

Kenneth S., Ebbe S., and Torgny U. (1978). Light Inhibits the Production of Alternariol and Alternariol Applied and environmental microbiology. Vol. 36, No. 5: 655-657.

King, M. T., wild, K., Gocke, E. and Esckhardt, K. (1982). 5-Brdurd tablets with improved depot effect for analysis *in vivo* of SCE in Bon marrow and spermatogonia cells, *Mutation res.*, 97: 117 – 129.

Klaassen, C. D. (2001). Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (6th ed.). McGraw-Hill Professional.

Kohmoto, K., Singh U. S. and Singh, R. P. (1995). Pathogenesis and Host Specificity in Plant Disease: Histological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases. Pergamon/Elsevier Science Ltd. N.Y. 2: 407.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Jr,W.C.(1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.5thed.,Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp121-139.

Konstantinova, P., Bonants, P. J. M., Van Gent-Pelzer, M. P. E., Van Der Zouwen, P. and Van Den Bulk, R. (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp.

in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. Mycol. Res., 106: 23-33

Kuninaga, S., and Yokusawa, R. (1987). Studies on the taxonomy of plant pathogenic fungi by a comparison of DNA homology. I. Genetic relatedness among species in the genus *Alternaria*. (In Japanese.) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 53:368-369.

Kuroda, Y. and Hara, Y. (1999). Antimutagenicity of tea polyphenoles. Mutation Research. 436:69-97.

Kutt, M.L., Loiveke, H. and Tanner, R. (2010). Detection of alternariol in Estonian grain samples. Agronomy Research, 8 (Special Issue II). 317–322.

Kwasna, H. (1992). Ecology and nomenclature of *Alternaria*. Chelkowsk: J. Visconti A. Topics In Secondary Metabolism *Alternaria*: Biology, plant diseases and metabolites. In, (eds). Elsevier, Amsterdam, pp.63-100

Lacey, J. (1992). Effects of environment on growth and mycotoxin production by *Alternaria* species J. Chelkowski, A. Visconti (Eds.), *Alternaria*: Biology, Plant Diseases and Metabolites, Elsevier, Amsterdam. pp. 381- 407.

Laemmlen, F. (2001). *Alternaria* Diseases. Division of Agric. & National Resources, University of California. Publication 8040.

Larone, D. H. (2002). Medically important fungi a guide to identification. 4th ed. ASM Press. Washington. pp. 221.

Lehmann, L. Esch H. L. Wagner, J. Rohnstock, L. and Metzler M. (2005). Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells. Toxicology Letters, 158, 72-86.

- Li X. and Liangcheng D. (2006).** Direct detection and quantification of *Alternaria alternata lycopersici* toxins using high - performance liquid chromatography-evaporative light- scattering detection. *Journal of Microbiological Methods*, 64: 398-405 .
- Lialiaris, T., Mourelatos, D., Bautis, L., Papageorgiou, A., Christianopoulou, M., Papageorgiou, V.J. and Dozivassiliades, J. (1989).** Comparative study on cytogenetic effect by diplatinum complex of the ligands of naphtharazarin and squaric acid in human lymphocyte. *J. Pharma. Exptl. Thre.*, 251: 368-371.
- Lioi, M., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, S. and Ursini, M. (2004).** Ochratoxin A and Zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat. Res.*, 557: 19-27.
- Liu, G.T.; Qian, Y.Z.; Zhang, P.; Dong, Z.M.; Shi, Z.Y.; Zhen, Y.Z.; Miao, J. and Xu, Y.M. (1991).** Relationships between *Alternaria alternata* and esophageal cancer. *IARC Sci Publ* 105: 258—262.
- Liu G.T., Quian Y.Z., Zhang P., Dong W.H., Qi Y.M., et al. (1992)** Etiological role of *Alternaria alternata* in human esophageal cancer. *Chin Med J* 105: 394—400.
- Logrieco A, Moretti A. and Solfrizzo M. (2009).** *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin and occurrence. *World Mycotoxin Journal*, pp. 129–140
- Lohmann, C.P., Heeb, M., Linde, H.J. et al (1998).** Diagnosis of infectious endophthalmitis after cataract surgery by polymerase chain reaction. *J Cataract Refract Surg* 24:821–826.
- Lucas, G. B. (1975).** Diseases of Tobacco. 3rd ed. Biological Consulting Association. Raleigh. Pp. 267-295.

- Magan, N., Cayley, G. and Lacey, J. (1984).** Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 47 : 1113–1117.
- Mancini, N., Perotti M., Ossi C., Cavallero, A., Matuska S., Paganoni G., Burioni R., Rama P. and Clementi M. (2006).** Rapid molecular identification of fungal pathogens in corneal samples from suspected keratomycosis cases. *Journal of Medical Microbiology*. 55: 1505–1509.
- Martin A. H., Rosemarie C. R., and Robert V. T. (1977)** Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays *Environmental Science & Technology*. (7) 11: 714-719
- Mazzonetto, F., Menten, J. O. M., Paradela, A. L. and Galli, M. A. (1996)** Effect of culture media on mycelial growth and conidial production of *Alternaria* spp. In beans. *Ecossistema*, 21: 59-61
- Miller, J. D. and Trenholm, (1994).** Mycotoxin in grain eagam press. St. Poul. Minesota. USA pp. 552.
- Mmbaga, M.T., Shi, A. and Kim, M. (2011).** Identification of *Alternaria alternata* as a causal agent for Leaf Blight in *Syringa* Species, *Plant Pathol. J.*, 27(2): 120-127.
- Mohapatra, A., Mohanty, A. K. and Mohanty, N. N. (1977).** Studies on physiology of the sesame leaf blight pathogen, *Alternaria sesame*. *Indian Phytotopathology*, 30: 332-334.
- Montemurro, N. and Visconti, A. (1992).** *Alternaria* metabolites, chemical and biological data. In: Chelkowski, J., Visconti, A. (eds). *Alternaria* :Biology, plant diseases and metabolites. Elsevier, Amsterdam, pp. 449-455.

- Morace G., Sanguinetti M., Posteraro G., Cascio and Fadda G.(1997).** Identification of various medically important *Candida* species clinical specimens by PCR restriction enzyme .J. Clin. Microbiol. 35: 667-672.
- Morra, M. J. (1997).** Assessment of extracellular enzymatic activity in soil. In: Hurst CI, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD and Walter MV (eds.) Manual of environmental microbiology. ASM Press, Washington, DC, pp. 459–465.
- Motta, D. S. and Valente Soares L. M. (2000) .** A method for the determination of two *alternaria* toxin, alternariol and alternariol monomethyl ether in tomato. Braz. J. of Microbiol. 31:315-320.
- Moubasher, A. H. (1993).** Soil Fungi in Qatar and other Arab Countries. The Center of Scientific and Applied Research. University of Qatar, Doha, Qatar. pp. 32-37.
- Muhsin, T.M . (1985).** Studies of fungi associated with island salt marsh halophytes at Delta Marsh, Canada . Ph. D. thesis , Unvi. Of Manitoba , Canada . pp. 318.
- Nadder, T. S. and Langley, M. R. (2001).** The new millennium laboratory: molecular diagnostics goes clinical. Clin. Lab. Sci., 14: 252–259
- Neergaard P. (1979).** Seed Pathology. Volumes 1 and 2, Revised Edition. London: MacMillan Press.
- Nguefack J. Leth V. Amvam P.H. and Mathur S.B. (2004).** Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi International Journal of Food Microbiology Volume 94, Issue 3, Pages 329–334.

- Nguyen, H. V., Gaillardin, C., and Neuveglise, C. (2009).** Differentiation Of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D.hansenii*, *C. famata*, *D.fabryii*, *C.fareri* *D.subglobosus*) and *D.prosopidis*: Description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*. Fems Yeast Res., 9: 641- 662.
- Nilsson R. H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N. and Larsson K. (2008).** Intraspecific *ITS* Variability in the Kingdom *Fungi* as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification, *Evol Bioinform Online* 4: 193–201.
- Nishimura, S. (1980).** Host specific toxins from *Alternaria alternata*. *Proc. Jpn. Acad.* 56: 362-366.
- Nishimura, S., and Kohmoto K. (1983).** Host-Specific Toxins and Chemical Structures from *Alternaria* Species *Annual Review of Phytopathology* Vol. 21: 87-116.
- Obrecht-Pflumio, S. and Dirheimer, G. (2000).** In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by Ochratoxin A. *Chem. Biol. Interact.* 127: 29-44.
- Ojiambo, P. J. (1997).** Cultural studies and epidemiology of *Alternaria* sesame and effect of seed transmission and plant age on *Alternaria* leaf spot severity of *ssamum indicum* L. M.Sc. Thesis. University of Nairobi, Kenya. Pp. 75-77.
- Ortize G.G., Reiter R.J., Zuniga G., Melchiorri D., Sewerynek E., Pablos M.I., Oh C.S., Garcia J.J. and Bitzer Quintero O.K. (2000).** Genotoxicity of paraquat: micronuclei induced in bone marrow and peripheral blood are inhibited by melatonin, *Mutat. Res.* 464: 239–245.

- Ozcelik S., Ozcelik N., and Beuchat L.R. (1990).** Toxin production by *Alternaria alternata* in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography International Journal of Food Microbiology, 11 : 187–194.
- Pero, R.W., Posner H., Blois M, Harvan D. and Spalding J.W. (1973).** Toxicity of metabolites produced by the “*Alternaria*”. Environmental Health Perspectives. 4: 87-94.
- Pestka, J. J., and Bondy, G. S. (1990) .** Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. Con.J. physiol. Pharmacol. pp. 68-125.
- Pfeiffer, E., Eschbach, S., and Metzler, M., (2007).** *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells in vitro. Mycotoxin Research 23:152-157.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997).** Fungi and Food Spoilage, 2nd ed. Gaithersburg, Maryland. pp 593.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko V., Pardo A. and Fernández V. P. (2009).** Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium International Journal of Food Microbiology, 135 : 60–63.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko V., Pardo, A. and Fernández V. P. (2010).** Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. International Journal of Food Microbiology Volume 142 (3) : 348–353.
- Pru, S.; Fetzner, K.; Seither, K.; Herr, A.; Pfeiffer, E.; Metzler, M.; Lawrence,C. and Fischer, R.(2014)** Role of the *Alternaria*

- alternata Blue-Light Receptor LreA (White-Collar 1) in Spore Formation and Secondary Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(8): 2582-2591.
- Pryor, B. M., Davis, R. M. and Gilbertson, R. L. (1998).** Detection of soilborne *Alternaria radicina* and its seed. *Plant Dis.*, 85: 18-23
- Pryor, B.M. and Gilbertson, R.L. (2000).** Molecular phylogenetic relationships among *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and rDNA sequences. *mtSSU Mycol. Res.* 104 (11): 1312-1321.
- Pryor, B. M. and Michailides, T. J. (2002).** Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92: 406-416.
- Raghubir, P. S. and Datajira, K.S.(1991).** Mycotoxin and phytotoxin. CRC press.INC.
- Raistrick, H.; Sticking, E. and Thomas, R. (1953).** Alternariol and Alternariol monomethyl ether metabolic produce of *Alternaria tenuis* *Biochem J.* (55) 3: 421–433.
- Robbiano, L., Baroni, D., Carrozzino, R., Mereto, E. and Brambilla, G. (2004).** DNA damage and micronuclei induced in rat and human kidney cells by six chemicals carcinogenic to the rat kidney. *Toxicol.*, 204: 187-195.
- Saha, D.; Fetzner, R.; Burkhardt, B.; Podlech, J.; Metzler, M.; Dang, H.; Lawrence, C. and Fischer, R. (2012).** Identification of a Polyketide Synthase Required for Alternariol (AOH) and Alternariol-9- Methyl Ether (AME) Formation in *Alternaria alternate*. *PLoS ONE* 7(7) : 1310-1371

- Saha A, Mandal P, Dasgupta S. and Saha D (2008).** Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl . J. Environ. Biol., 29(3): 407-410.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
- Samir, A. N., Fawzya A. , Ahmed, M. H ,Mohamed, N. M .and Asmaa, S. H. (2012).** Cytogenetic, histological and histochemical studies on the effect of gibberllin A3 in albino rats. J. American Sci., 8(1): 608-622.
- Samuel, G. S. and Govindaswamy C. V. (1972).** Effect of vitamins and levels of pH on the growth and sporualtion of *Alternaria solani*, the causal agent of the leaf blight disease of sesame(*Sesamum indicum*). Indian Journal of Mycological Plant Pathology, 2: 185-186.
- Sauer, D.B, Seitz, L.M, Burroughs, R., Mohr, H.E., West, J.L, Milleret, R. J. and Anthony, H.D.(1978).** Toxicity of Alternaria metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26, 1380-1383.
- Schell, W. A., Salkin, I. F. and McGinnis, M. R. (2003).** Bipolaris, Exophiala, Scedosporium, Sporothrix, and other dematiaceous fungi. In: Murray P. R., *et al.* (eds.). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM Press. Washington. pp. 1820-1847.
- Schmid, W. (1976).** The Cell Micronucleus Test for Cytogenes Analysis. In “ Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection” Ed.A. Hollander, Vol.4 Plenum Press: New York.

- Schrader, T.J. Cherry, W. Soper, K. and Langlois, I. (2006).** Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity *in vitro*. *Mutation Research*, 606: 61-71.
- Schreck, I., Deigendesch, U., Burkhardt, B., Marko, D. and Weiss, C., (2012).** The *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether induce cytochrome P450 1A1 and apoptosis in murine hepatoma cells dependent on the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of toxicology* 86: 625-632.
- Scott, P.M., and Stoltz, D.R. (1980),** Mutagens produced by *Alternaria alternata*. *Mutation Res.* 78: 33-40.
- Scott, P. M. (2004).** Other mycotoxins N. Magan, M. Olsen (Eds.), *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK . pp. 406–440.
- Seitz, L.M., Sauer, D.B., Mohr, H.E. and Burroughs, R. (1975).** Weathered grain sorghum: natural occurrence of alternariols and storability of the grain. *Phytopathology*, 65: 1259-1263.
- Shahin, E. A. and Shepard, J. F. (1979).** An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. *Phytopathology*, 69: 618-620.
- Shubber, E. K., Jaffer, Z., Nada, S. M. and Karm, A. J. (1998).** The *Nucleus*, 41: 120-127.
- Shukla ,L. , Adhikary, R., Pazdro, D. and Sevilla, M.(2004).** .Formation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine-radicals in γ -irradiated DNA by multiple one-electron oxidations). *Nucleic Acids Res.*, 32(22): 6565-6574.
- Simmons, E. G. (1992).** *Alternaria* taxonomy: Current status, view point, challenge. in: *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites. J. Chelkowski and A. Visconti, eds. Elsevier Science

- Publishers, Amsterdam pp. 1-35.
- Simmons, E. G. (2007).** *Alternaria: An Identification Manual*. CBS fungal Biodiversity centre. The Netherlands.
- Slavov, F.C., Mayama, S., and Atanassov, A. (2004).** Some aspects of epidemiology of *Alternaria alternata* Tobacco pathotype. *Biotechnol. and Biotechnol. Eq.* pp. 85-89.
- Solhaug, A. Vines, L.L. Ivanova, L. Spilsberg, B. Holme, J.A. et al. (2012).** Mechanisms involved in alternariol-induced cell cycle arrest. *Mutat Res* 738-739: 1-11
- Solhaug A. , Holme J. A., Haglund K., Dendele B., Sergent, O. Pestka J., Lagadic D. and Eriksen G. S. (2013).** Alternariol induces abnormal nuclear morphology and cell cycle arrest in murine RAW 264.7 macrophages. *Toxicology Letters*. 219(1):8-17.
- Sommer, N. F. (1985).** Strategies for control of post-harvest disease of selected commodities. In: *Post-harvest Technology of Horticultural Crops*. University of California Press. pp. 83-98 .
- Stavely, J. R. and Main C. E. (1970).** Influence of temperature and other factors on initiation of tobacco brown spot. *Phytopathology*, 60: 1591-1596.
- Stavely, J. R. and Slana L. J. (1971).** Relation of leaf age to the reaction of tobacco to *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 61: 73-78.
- Stich, H. and San, C. (1981).** Topics environmental phsology and medecine in (Short-Term Test For Chemecal Carcinogen), Springer Veriag. New York pp. 187-199.
- Stinson, E. E. ; Bills, D. D.; Osman, S. F.; Siciliano, J.; Ceponis, M. J. and Heisler E. G. (1980).** Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries *J. Agric. Food*

*Chem.*28 (5): pp 960–963.

Streets, R.B. (1975). The Diagnosis of Plant Diseases. The University of Arizona Press. pp. 7-21.

Streffer C, M., Iler W.U., Kryscio A. B. and Cker W. (1998). Micronuclei - biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation. *Mutation research.* 404 (2) : 101-105.

Tanner, R. S. (1997). Cultivation of bacteria and fungi. In: Manual of environmental microbiology. In Hurs, C. J., Knudsen, G. R., McInerney M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. (eds.). American Society for Microbiology. Washington. pp. 52-60.

Theumera, M., Cánepaa, M., Lópezb, A. Marya, V ,Dambolenac, J. and Rubinstein H. (2010). Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats :Assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B1, and oxidative stress biomarkers status. *Toxicology.* 268:104–110.

Tice, R. R., Erexson, G. L. and Hilliard, C. J. (1990). Effects of treatment protocol and sampling time on the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow and peripheral blood. *Mutagenesis.* 5:313–321.

Thomma, B.P.H.J. (2003). Pathogen profile, *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathol.*, 4 (4): 225-236.

Turenne, C.Y., Sanche, S.E., Hoban, D.J., Karlowsky, J.A., and Kabani, A.M. (1999). Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1846-1851.

Valdir, L. , Andrés M., Fernando G., Ignazio C., Luiz A. M., and Eduardo S. G. (2009). Molecular Diversity and Evolutionary Processes of

- Alternaria solani* in Brazil Inferred Using Genealogical and Coalescent Approaches The American Phytopathological Society Phyto. 99(6): 765-774.
- Van der Waals, J. E., Pitsi, B. E., Marais, C. and Wairuri, C.K. (2011).** First report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of potatoes in South Africa. Plant Disease, 95: 1-3.
- Verma, V. (1970).** Effect of temperature and hydrogen-ion concentration of three pathogenic fungi sydowia. 23: 164-168.
- Weile, J. and Knabbe, C. (2009).** Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. Anal. Bioanal. Chem., 394: 731–742
- Whiley, D. M. and Sloots, T. P. (2005).** Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. J. Clin. Virol., 34: 104-107.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Lavak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.
- Wogan , G.N., Ed. (1965) .** Experimental toxicity and carcinogenicity of aflatoxin. In "Mycotoxins in food stuffs". M.I.T., Press, Vcambridge, pp. 163.
- Yu, J.H., and Keller ,N. (2005)** Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. Ann Rev Phytopathol 43: 437–458.
- Zhao, J., Ma, J., Zhao J. and Yang H. (2009).** Acute cytotoxicity of alternariol on NIH/3T3 cells. Wei Sheng Yan Jiu. 38(2):133-135.

Zhou, G., Whong ,Z., Ong, T. and Chen, B. (2000). Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment *Molecular and Cellular Probes*. 14: 339–348.

Abstract

Isolates of *Alternaria alternata* fungi that had the potential to produce Alternariol (AOH) were morphologically characterized based on morphologic, microscopic and molecular aids by PCR and DNA Sequencing technique. The frequency and the appearance percentage of this fungi through the initial isolation from infected tomato fruit were determined. The responsible gene for Alternariol production was determined by using specific primer.

The study included the extraction and detection of AOH by using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The study also included the effect of different ecological conditions (i.e. temperature, pH, culture media, dark and light) on *A. alternata* growth and AOH production.

The lethal dose (LD₅₀) of AOH and its cytogenetic influences in bone marrow of mouse male which included the calculation of mitotic index ,chromosomal aberration and micronucleus formation percentage.

Results revealed a wide distribution of *A. alternata* in Karbala province where 23 isolates were obtained with the phenotypic characters at frequency 38% and 21.5% appearance .

The molecular test (diagnosis) showed a success with the pair AAF2,AAR3 primer in diagnosis of *A. alternata* by using PCR with a molecular weight of 340bp. Results of DNA sequencing by using NCBI BLAST ensuring the results of morphological identification and the success molecular test of pair primer AAF2,AAR3 in molecular test by using NCBI BLAST loci revealing that all isolations belonging to *A. alternata*. There are two different clades in Karbala first one was alignment 100% with China isolate , 99% with Saudi Arabia isolate . The second one alignment 100% with Turkey and Mexico isolate. Analysis of mega 6 divided these isolates into two groups G1(1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 22, 24). G2(4, 12, 18, 19, 21, 23).

PKSJ primer succeeded in the detection the gene that responsible of AOH production by PCR at 514bp.

Results showed the Rf of AOH was 0.43 by using methanol solvent and mobile phase (tuleun : athylacetate : formic acid) 6: 3: 1. The similar To the supplied (as standard) with extracted alternariol by HPLC.

Different environmental conditions affected in *A. alternata* growth and AOH production. 25°C is optimum temperature for growth where the colony diameter was 8.2 cm during the incubation period (7 days) comper 20, 30 and 35 °C , while the mean of growth was increase and decrease of temperature to 2.1 cm at 35C. at 30C achieved a maximum production 141.1 mg/ml whereas, the lowest value was 74.5mg/ml at 35C

The pH 6 was significantly superior compare with 5,7 and 8 treatment , where best growth 8.5 cm ,the growth mean was decrease with other pH reaching the lowest value 4.3 at pH 8. the production AOH was also influenced by the acidity pH wasgose the highest value 116.1mg/ml, reaching the lowest 57.8mg/ml at pH 8. PSA is the best culture media for *A.alternata* growth and AOH production with significant differences of other media types 8.2cm diameter of colony, 112.8mg/ml for AOH production . dark is increase significant of light treatment 8.2cm colony diameter at dark wile 6.5cm at light, so increase significant AOH production 182.8mg/ml at dark and 74.5mg/ml at light.

results showed that the dose 368mg/kg of AOH was the lethal dose LD₅₀. And this AOH affects different parameters of bone marrow. Mitotic index was decrease of the control by significant differences, 14.2% at control and 2.1% at 80mg/kg . Chromosomal aberration show with the increase AOH concentration with significant differences 3.55% at 80mg/kg of AOH while 0.10% in control. Micronucleus formation with AOH treatment differ by significant increase 16.2 at 80mg/kg and 3.7 at control.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Karbala
College of Education for Pure Sciences



Characterization of *Alternaria alternata* Isolates That Produce Alternariol in Tomato Fruits and Study It's Cytotoxic Effects

A thesis

Submitted to The Council of The Education for Pure Science
College/Karbala University in Partial Fulfillment of The
Requirements for The Degree of Doctor of Philosophy in
Biology/ mycology

By

Fadhil Sami Ezghair

Supervised By

**Prof. Dr.
Ban Taha Mohammed**

**Ass. Prof. Dr.
Saad Mohammed Nada**

/ 1436

May / 2015Rajab