جامعة كربلاء
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

تقييم كفاءة بعض العوامل الحيوية والمستخلصات النباتية وبعض المبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفطريات المرضية المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان *Punica granatum* في الحقل والمخزن ومدى انتاجها للسموم الفطرية

رسالة مقدمة الى مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في الزراعة/ وقاية النبات

من قبل
فاطمة حيدر عبد زيد الفتلاوي
بإشراف
أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري

2024 م 1446 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(وَأَلْقَيْتُ عَلَيْكَ مَحَبَّةً مِنِّي)

صَدَقَ اللَّهُ العَلِيُّ العَظِيمِ

سورة طه : الآية 39

الإهداء

بسم الذي علّم الأنسان ما لم يعلم .

إلى . . مدينة العلم الذي جاء بالحق بشيراً ونذيراً **رسولنا الأكرم محمد (ص)**

إلى .. من وضع بين أيدينا حكمة (الْعَامِلُ بِجَهْلٍ كَالسَّائِرِ عَلَى غَيْرِ طَرِيقٍ، فَلَا يُجْدِيهِ جِدُّهُ فِي السَّيْرِ إِلَّا بُعْداً عَنْ حَاجَتِهِ") . مبين أمة رسول الله وباب حكمته ، **سيد الفقهاء أمير المؤمنين علية السلام**

إلى . . رفيق هذه الرحلة الأنيس الذي أفاض ببركته عليّ **القائم المهدي (عج)**

إلى . . مَن اهداني ألوان الحياة ،وعلمني صُنع لوحةِ خاصتي **(أبي)**

إلى . . من أسبغت عليّ خطوات الوصول بالدعاء ، وشيّدت لي سماء تخصّني **(أمي)**

أهدي هذا الجهد المتواضع . . .

فاطمة حيدر

شكر وتقدير

الحمد لله والشكر له رب العالمين الخالق العظيم من بيده مجرى الامور وبه نستعين وعليه توكلي ومستجيب دعائي ورافع عني الهم والغم وصعاب الامور حمداً على نعمه التي لا يحصيها غيره، حمدا ابلغ به رضاه ، والصلاة والسلام على خاتم النبيين وسيد المرسلين وشفيع الامه حبيب اله العالمين نبي الرحمة محمد وعلى أله الطاهرين المنتجبين أئمة الهدى والرحمة.

اتقدم بالشكر الجزيل والثناء الجميل إلى استاذي ومشرفي الأستاذ الدكتور ياسر ناصر حسين الحميري بما قدمه من توجيهات وبذل جهد كبير في المتابعة والمراجعة وابداء ملاحظات ونصائح علمية قيمة دعمتني طول مدة عملي واغنت الرسالة في جوانبها المختلفة فكان ابأُ ناصحا وموجها حريصا فجزاه الله عني خير الجزاء ونسأل الله له التوفيق و دوام الصحة والعافية بحق محمد وأل محمد.

اتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية الزراعة منتسبيها كافة لما قدموه من تسهيلات لإتمام الرسالة . وأتقدم بخالص الشكر للسيد رئيس قسم وقاية النبات الدكتور علي عبد الحسين المحترم وجميع التدريسين والمنتسبين واخص بالذكر الدكتورة رجاء غازي والدكتور عبد الزهرة جبار علي والدكتور محسن عبد علي محسن والدكتور عدنان عبد الجليل لهوف والدكتور عقيل نزال والأستاذ علاء طالب والاستاذ بريـر كًماز والأستاذة نور كاظم لما قدموه من مساعدة ودعم خلال مدة الدراسة. كما أتقدم بوافر الشكر والامتنان إلى رئيس وأعضاء لجنة المناقشة لتفضلهم بقبول قراءة ومناقشة موضوع الرسالة. كما اشكر كل من الاستاذ علاء جدوع ، الاستاذ بشيرجابر، ست مياده محمود لمساعدتهم لي في مرحلة جمع العينات. والشكر الجزيل إلى جميع زملائي وزميلاتي اللذين هم بمثابة اخوتي الذين ساندوني خلال مدة الدراسة وخصوصاً ضحى عايد، أيمان عباس، سندس قحطان،شهب علي،نور الهدى محمود. نسأل الله لهم دوام الموفقية والصحة والسلامة. الشكر والثناء إلى اهلي والدتي واخوتي لما قدموه لي من سند بعد الله سند معنوي ومادي كانوا حاضرين في جميع مراحل دراستي وما احاطها من ظروف.

اقرار المشرف

أشهد بأن الرسالة الموسومة (تقييم كفاءة بعض العوامل الحيوية والمستخلصات النباتية وبعض المبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفطريات المرضية المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان *Punica granatum* في الحقل والمخزن ومدى انتاجها للسموم الفطرية) التي قدمتها الطالبة (فاطمة حيدر عبد زيد) قد تم اعدادها باشرافي في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية / وقاية النبات.

التوقيع

الاسم : أ. د. ياسر ناصر حسين الحميري

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية الزراعة

توصية رئيس القسم

بناءًا على توصية الاستاذ المشرف ، ارشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. علي عبد الحسين كريم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

اقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الرسالة والموسومة (تقييم كفاءة بعض العوامل الحيوية والمستخلصات النباتية وبعض المبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفطريات المرضية المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان *Punica granatum* في الحقل والمخزن ومدى انتاجها للسموم الفطرية) التي قدمتها الطالبة (فاطمة حيدر عبد زيد) وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية (وقاية النبات).

رئيس اللجنة

أ.د. عبد الزهرة جبار علي

كلية الزراعة/ جامعة كربلاء

عضواً

أ.م.د. أسامة عبد الكريم عبد المنعم

كلية الزراعة / جامعة الكوفة

عضواً

أ.م.د. محسن عبد علي محسن الموسوي

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

عضواً ومشرفاً

أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة – جامعة كربلاء

الدكتور

أ.د. صباح غازي شريف

عميد كلية الزراعة / جامعة كربلاء

الخلاصة

هدفت الدراسة الى التحري عن الفطريات المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان في محافظتي كربلاء وبابل، وتحديد اكثر الفطرية الممرضة التي تمتلك المقدرة على انتاج السموم الفطرية وتقييم تأثير بعض المستخلصات النباتية والمبيدات الزراعية والخميرة *Saccharomyces cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة الفطريات الممرضة في الحقل والمخزن.

بينت نتائج العزل والتشخيص تلوث جميع العينات المأخوذة من ثمار الرمان المصابة والتي تعود لخمسة مناطق مختلفة من محافظة كربلاء وثلاث مناطق من محافظة بابل، بعزلات فطرية مختلفة بنسبة تلوث 100%، اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 450 عزلة فطرية عائدة لعدة اجناس فطرية، كان أكثرها تلوثا هو جنس *Aspergillus* spp يليه جنس *Penicillium* spp وفي المرتبة الثالثة يأتي جنس *Alternaria* sp، وهي من الفطريات المنتجة للسموم الفطرية، كما أظهرت نتائج النسبة المئوية لتردد الأنواع الفطرية، اذ تفوق الفطر *Aspergillus niger* بنسبة تردد بلغت 21.35%، ليأتي بعده النوع *Aspergillus flavus* بنسبة 4.72%.ثم كان *Alternaria alternata* نسبة بلغت 3.37% متفوقاً على النوع *Aspergillus ochraceus* الذي الذي سجل نسبة بلغت 2.70% على التوالي، والتي أظهرت عدد منها ضراوة كبيرة في احداث المرض فقد تبين ظهور اربع عزلات فطرية كانت الاكثر ضراوة بنسبة إصابة 100% ضمن معاملة التخديش وهي 4 *Aspergillus niger* (*KTAN*) و*1 Aspergillus flavus* (*KHAF*) و2 *Aspergillus ochraceous* (*KRAO*) و *2 Alternaria alternata*(*KCAA*).

اكدت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي لـ لأربع عزلات فطرية، التي تم عزلها من حالات تعفن ثمار الرمان المختلفة والتي أظهرت ضراوة شديدة في احداث مرض تعفن ثمار الرمان تحت ظروف مسيطر عليها، تم تشخيصها تحت انواع متباينة، فقد اظهرت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي بان العزلات تعود الى الفطريات:*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* , *Aspergillus flavus* , *Aspergillus ochraceus* اذ تم تسجيل جميع العزلات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوي (NCBI) وتحت الرموز الخاصة (*PP467583.1* و*PQ034725.1* و*PQ034726.1* و*PQ034727.1*) على التوالي. اذ حققت التسلسلات النيوكليوتيدية الجزيئية اعلى نسبة تطابق تراوحت ما بين 99.82 – 98.65 % مع المنطقة الجينية ITS عند مقارنتها مع التسلسلات النيوكليوتيدية المكافئة المسترجعة من بنك الجينات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) بأستخدام برنامج الـ (BLAST) ولكل عزلة فطرية .

بينت نتائج التجربة الخزنية ان مستخلص الكزبرة قد تفوق وبفارق معنوي كبير بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة الى 8.06% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 25.88% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من شدة احداث الإصابة بلغ 68.85%، تلتها المعاملة بمستخلص نبات الميرمية بخفض النسبة المئوية لشدة حدوث الاصابة بمعدل 9.98% وبمعدل تثبيط بلغ 61.43%. في حين جاءت معاملتي المبيد ذو الأصل النباتي Palizin والعامل الحيوي (الخميرة *Saccharomyces cervisiae*) أخيرا، بمعدل خفض لنسبة شدة احداث الإصابة بلغت 10.04% و11.06% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 61.20% و57.26% مقارنة بمعاملة السيطرة.

بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة الكحولي أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وهذا ما سبب باختزال جزئي لمستويات انتاج السموم الفطرية. اذ خفضت المعاملة بمستخلص الكزبرة معدل انتاج *Alternariol* المنتج من الفطر*Alternaria alternata* الى 65.9 ميكروغرام / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 93.7 ميكروغرام/كغم. بينما خفضت معدل انتاج *Ochratoxin A* المنتج من الفطر *Aspergillus niger* بمعدل 57.8 ميكروغرام / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 62.10 ميكروغرام/كغم. في حين خفضت معدل انتاج *Ochratoxin A* المنتج من الفطر *Aspergillus ochrecaus* بمعدل 20.6 ميكروغرام / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 58.9 ميكروغرام/كغم. كذلك عملت على خفض معدل انتاج *Aflatoxin B1* المنتج من الفطر *Aspergillus flavus* بمعدل 32.5 ميكروغرام / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 69.8 ميكروغرام/كغم.

أكدت نتائج التجربة الحقلية ان المبيد ذو الأصل النباتي Palizin قد تفوق وبفارق معنوي كبير بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة الى 6.30% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 32.41% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من شدة احداث الإصابة بلغ 80.56%، تلتها المعاملة بمستخلص نبات الكزبرة بخفض النسبة المئوية لشدة الاصابة بمعدل 7.57 % وبمعدل تثبيط بلغ 76.64%. في حين جاءت معاملتي مستخلص الميرمية والعامل الحيوي (الخميرة *Saccharomyces cervisiae*) أخيرا، بمعدل خفض لنسبة شدة الإصابة بلغت 8.98 % و10.31% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 72.29% و68.18% مقارنة بمعاملة السيطرة.

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
-1	**المقدمة (Introduction)**	1
-2	**مراجعة المصادر (Litreature Review)**	4
1-2	الاهمية الاقتصادية لمحصول الرمان :	4
2-2	مرض تعفن ثمار الرمان	6
3-2	الاعراض المرضية و دورة مرض تعفن ثمار الرمان	8
4-2	السموم الفطرية (Mycotoxins) المصاحبة لفاكهة ثمار الرمان:	11
5-2	السموم الفطرية المنتجة من قبل الفطر *Alternaria* والفطر *Aspergillus* :	13
6-2	طرق مكافحة مرض تعفن ثمار الرمان	17
1-3-2	المكافحة الكيميائية	18
2-3-2	المكافحة الميكانيكية	18
3-6-2	المكافحة الحيوية:	18
7-2	تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطريات المدروسة	20
8-2	التطبيقات الزراعية للسيطرة على مرض تعفن ثمار الرمان	21
1-8-2	تطبيقات ما قبل الحصاد	21
2-8-2	تطبيقات بعد الحصاد	22
9-2	طرق تخزين ثمار الرمان وطرق المكافحة بالمخزن للسيطرة من امراض تعفن الثمار	23
10-2	الكشف عن السموم الفطرية بطريقة الكروماتوغرافي السائل عالي الاداء High performance Liquid chromatographic (HPLC)	24
3	**المواد وطرائق العمل Materials and Methods**	25
1-3	الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب .	25
2-3	تحضيرالأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات	27
1-2-3	وسط البطاطا سكروز اكار Potato Sucrose Agar (P.S.A) .	27
2-2-3	وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز .Potato Dextrose Agar P.D.A	27
3-2-3	وسط Nutrient Yeast Dextrose Broth	27
3-3	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لتعفن ثمار الرمان	28
1-3-3	جمع العينات	28
2-3-3	عزل الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان	29
3-3-3	تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة من ثمار الرمان.	29

4-3	حفظ العزلات الفطرية	30
5-3	اختبار المقدرة الامراضية للعزلات الفطريات المعزولة من ثمار الرمان	30
1-5-3	تحضير لقاح الفطريات .(العالق الفطري)	30
2-5-3	اختبار المقدرة الامراضية	30
3-5-3	حساب النسبة المئوية للإصابة وشدة الاصابة لثمار الرمان	31
6-3	التشخيص الجزيئي Molecular identification	32
	أولا: استخلاص و تنقية الـ DNA DNA extraction and purification	32
	ثانياً: تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)	34
	ثالثاً: تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية	35
7-3	تحضير المستخلصات النباتية الكحولية لبعض النباتات المنتخبة	35
8-3	تقييم كفاءة عدد من المستخلصات النباتية والمبيدات الكيميائية والعامل الاحيائي (الخميرة *S.cervisiae*) ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.	36
1-8-3	تنشيط الخميرة *S.cervisiae* واختبار فاعليتها في تثبيط نمو العزلات الفطرية	36
2-8-3	أختبار تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	37
3-8-3	اختبار كفاءة بعض المبيدات ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	37
9-3	أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في المخزن	38
9-3	الكشف عن قابلية العزلات الفطرية الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان	40
1-9-3	استخلاص السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A	40
2-9-3	استخلاص السم الفطري Alternariol (AOH)	41
3-9-3	الكشف النوعي والتقدير الكمي للسموم الفطرية Aflatoxin B1 و Ochratoxin A و Alternariol (AOH) بتقانة HPLC للعزلات الفطرية	42
10-3	أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في الحقل	43
10-3	التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية	45
-4	**النتائج والمناقشة (Results and Discussion)**	46
1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان	46
2-4	الوصف المظهري لاهم العزلات الفطرية المرافقة لعينات الدراسة	49
3-4	المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المدروسة	52
4-4	تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطريات المعزولة	55

1-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.alternata Isolate Fatima-1* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	56
2-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.flavus . Y.n.190.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	57
3-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.niger . Y.n.191.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	59
2-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	60
5-4	تقييم كفاءة عدد من المستخلصات النباتية والمبيدات الكيميائية والعامل الاحيائي (الخميرة *S.cervisiae*) ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.	63
1-5-4	تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	63
2-5-4	اختبار كفاءة بعض المبيدات ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	64
6-4	أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في المخزن	68
7-4	الكشف عن قابلية الفطريات الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان ودور عامل المكافحة في السيطرة على انتاجها في المخزن	75
1-7-4	الكشف عن قابلية الفطر *A.alternate* على انتاج السم الفطري *Alternariol* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن	76
2-7-4	الكشف عن قابلية الفطر *A.niger* على انتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن	79
3-7-4	الكشف عن قابلية الفطر *A.ochrecaus* على انتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن	81
4-7-4	الكشف عن قابلية الفطر *A.flavus* على انتاج السم الفطري *Aflatoxin* B1 في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن	83
8-4	أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد	86

	(*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في الحقل	
5-	**الاستنتاجات والتوصيات**	**94**
5-1	الاستنتاجات	**94**
5-2	التوصيات	**95**
6-	**المصادر**	**96**
6-1	المصادر العربية	**96**
6-2	المصادر الأجنبية	**98**
7	**الملاحق**	**121**

رقم الجدول	الموضوع	رقم الصفحة
1	الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب .	**25**
2	المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة	**26**
3	الفطريات الممرضة المستخدمة بالدراسة	**26**
4	نوع العينات وترميزها ومكان وتاريخ جمعها	**28**
5	الدليل المرضي المستخدم في حساب النسبة المئوية لشدة الإصابة لتعفن ثمار الرمان	**31**
6	البوادئ المستخدمة في تقنية Polymerase chain reaction (PCR)	**34**
7	أسماء النباتات المنتخبة لعمل المستخلصات النباتية منها واهم المواد الفعالة بها	**36**
8	المعاملات المطبقة على ثمار الرمان الملوثة بالفطريات الممرضة	**39**
9	المعاملات المطبقة على ازهار الرمان الملوثة بالفطريات الممرضة بالحقل	**43**
10	الفطريات المعزولة من ثمار الرمان المصابة بمرض تعفن الثمار	**46**
11	النسبة المئوية لظهور وتردد الفطريات المعزولة من ثمار الرمان	**47**
12	النسبة المئوية للإصابة في اختبار المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المنتخبة	**53**
13	النسبة المئوية لشدة الإصابة في اختبار الامراضية للعزلات الفطرية المنتخبة	**54**
14	التشخيص الجزيئ لعزلات الفطريات المعزولة باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و GenBank Accession Number	**55**
15	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة	**56**

	الفطر *A.alternata Isolate Fatima-1* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	
16	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.flavus . Y.n.190.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	58
17	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.niger . Y.n.191.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	59
18	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	61
19	تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	63
20	اختبار كفاءة المبيدين Palizin و Tondexir ضد نمو العزلات الفطرية مختبريا	65
21	اختبار كفاءة الخميرة *S. cervisiae* ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	66
22	تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن	69
23	تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لشدة الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن	70
24	قابلية الفطريات الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان ودور عامل المكافحة (مستخلص الكزبرة) في السيطرة على انتاجها في المخزن	86
25	تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في الحقل	87
26	تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لشدة الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن	89

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	مراحل تنفيذ التجربة الخزنية لتقييم كفاءة المعاملات في تثبيط المسببات المرضية	39
2	مراحل تنفيذ التجربة الحقلية على أشجار الرمان	44
3	نماذج من مستعمرات اهم الفطريات المعزولة	51
4	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.alternata Isolate Fatima-1*	57
5	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.flavus . Y.n.190.Fatima*	58
6	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.niger . Y.n.191.Fatima*	60
7	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima*	61
8	نماذج لأفضل معاملات التضاد المستخدمة ضد *Alternaria sp* و *Aspergillus sp* مختبريا	67
9	انماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.alternate* في المخزن	72
10	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.niger* في المخزن	73
11	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.flavus* في المخزن	74
12	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.ochraceus* في المخزن	75
13	تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.alternate* في انتاج سم *Alternariol*	77
14	الكشف عن قابلية الفطر *A.alternate* على انتاج السم الفطري *Alternariol*	78
15	تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.niger* في انتاج سم *Ochratoxin A*	79
16	الكشف عن قابلية الفطر *A.niger* على انتاج السم الفطري Ochratoxin A	80
17	تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.ochrecaus* في انتاج سم *OchratoxinA*	81
18	الكشف عن قابلية الفطر *A.ochraceous* على انتاج السم الفطري Ochratoxin A	82
19	تاثير مستخلص الكزبرة في *A.flavus* على انتاج السم Aflatoxin B1	84
20	الكشف عن قابلية الفطر *A.flavus* على انتاج السم الفطري Aflatoxin B1	85
21	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.alternate* في	90

	الحقل	
22	ا نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.niger* في الحقل	91
23	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.flavus* في الحقل	92
24	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.ochraceus* في الحقل	93

1- المقدمة

يعد الرمان *Punica granatum* L أحدى أقدم الثمار التي عرفها الانسان، وأدرك قيمتها الغذائية والعلاجية مبكراً واهتم بزراعتها لفوائده الغذائية والصحية، فهو صيدلية متكاملة لعلاج الامراض والوقاية منها (Ge واخرون،2021) وذلك لما يحتويه من المركبات النشطة بيولوجيا مثل المعادن والفلافونويدات والفيتامينات، وكذلك العناصر الغذائية فهو يحتوي على كميات كبيرة من السكر تبلغ 16% بالإضافة الى البروتينات حوالي 9% ومواد دهنية تصل الى 7% كما يحتوي العصير على حمض الستريك وبعض الاملاح المعدنية وخاصة الحديد (أبو النجا وسكر، 2022). ويعتبر محصول فاكهة ذو أهمية اقتصادية كبيرة للمناطق الاستوائية وشبه الاستوائية في العالم. ولقد حدثت زيادة هائلة في المساحة والإنتاج والتصدير في جميع أنحاء العالم على مدى العقود الماضية (Singh واخرون، 2020).

تتعرض ثمار الرمان الى المهاجمة من مسببات الامراض المختلفة في مرحلة ما قبل او بعد الحصاد، حيث له تأثير كبير على جودة الفاكهة وعمر التخزين مما يؤدي الى تلف الانسجة ويجعل الفاكهة غير قابلة للبيع , اذ تهاجم العديد من مسببات الامراض الفطرية محدثة العديد من الامراض اهمها مرض تعفن ثمار الرمان ولعل من اهم هذه المسببات هي أنواع الفطر *Alternaria* spp وأنواع الفطر *Aspergillus* spp (Munhuweyi واخرون، 2016).

يعد الفطر *Alternaria alternata* المسبب الرئيسي لمرض تعفن ثمار الرمان إذ يصيب الرمان في مرحلة مبكرة من النضج، وينمو وينتشر داخل الثمرة أثناء نموها. فان أبواغ الممرض التي تكون محمولة جواً تحدث عدوى الازهار قبل ظهور الثمار، يمكن أن تظل العدوى كامنة لمعظم موسم النمو حتى تهيئة الظروف الملائمة (Aloi واخرون، 2021). يهاجم الثمرة عن طريق إنتاج إنزيمات محللة للبشرة والجدار الخلوي، يؤدي التفاعل بين الممرض والمضيف إلى حدوث تغييرات في العمليات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية نظرًا لأن مسبب مرض القلب الأسود ينمو داخل الثمرة دون التأثير على القشرة الخارجية للثمرة، فإن الفحص البصري لا يكون عادةً فعالاً في التعرف عليه. (Nouri واخرون، 2020).

بعض أنواع الفطر *Alternaria* قادرة على إنتاج العديد من مركبات الايض الثانوية السامة، المعروفة باسم السموم الفطرية، التي تلوث السلع الغذائية المخزنة (Andersenواخرون، 2006) ومنها هي سموم *Alternariol* وهي من السموم الرئيسية والاكثر انتشاراً في ثمار الرمان ذات تـأثيرات مهمة وسلبية على الانسان عند تناول الفاكهة او الغذاء الملوث بها (Bacha واخرون، 2023).

بينما تعد أنواع الفطر *Aspergillus* spp من الفطريات المهمة الموجودة في جميع أنحاء العالم وفي جميع الأنظمة البيئية ومن مسببات مرض تعفن ثمار الرمان الذي يصيب الثمار ويسبب تلفها ويصيب الازهار وبالتالي لا يمكن للمزارع خلال موسم النمو تميزه. وغالباً القشرة الخارجية سليمة ولكن محتواها الداخلي اجوف وتالف (khan واخرون،2021 وNirmal واخرون،2023). تشير الدراسات إلى أن أنواع *Aspergillus* spp وخاصة الأنواع المنتجة للسموم الفطرية مثل الافلاتوكسينات والاوكراتوكسينات لا تشكل فقط مجموعة من الفطريات المرتبطة بمرض تعفن ثمار الرمان المسؤولة عن تدهور الفاكهة، ولكنها تشكل أيضًا عامل خطر صحي لمستهلكي الثمار او المنتجات المصنعه من الرمان (Kanetis واخرون، 2015).

ولتقليل الخسائر الاقتصادية الكبيره المتسببة عنها المسببات المرضية لذا تم اللجوء الى استخدام الطرق الحيوية والمستحدثة في المكافحة على الرغم من فعالية المبيدات إلا ان هذا الاتجاه لا ينسجم مع الاستراتيجيات الحديثة التي تعمل على تقليل استخدام المبيدات لما لها من آثار سلبية على البيئة والأحياء غير المستهدفة وصحة الأنسان فضلاً عن ظهور السلالة المقاومة لفعلها ، لهذا ركزت معظم الدراسات على الكشف عن طرائق بديلة تمتاز بكفاءتها والمحافظة على النظام البيئي ومنها اللجوء الى الأحياء المضادة للمسببات المرضية والعمل على تطوير كفاءتها كاستراتيجية بديلة وقد تركزت معظم الدراسات الى استحداث دور الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* في مقاومة هذه الأمراض واظهرت هذه العوامل كفاءتها العالية ضد الاحياء الممرضة تحت الظروف المختبرية و الحد من تأثير المسببات المرضية تحت ظروف الحقل والمخزن (Naher واخرون، 2014).

ومن طرائق المكافحة الأخرى التي تستخدم حاليا في مقاومة المسببات المرضية لأمراض ما بعد الحصاد هي المستخلصات النباتية بوصفها بدائل واعدة عن طرائق المقاومة الكيميائية إذ اثبت العديد منها فاعلية في مقاومة المسببات الفطرية والبكتيرية وغيرها لكونها رخيصة الثمن وآمنة الاستخدام ولا تترك أية متبقيات سمية على النبات والثمار بالإضافة إلى سهولة الحصول عليها لتوفرها بكثرة في الطبيعة (كاظم واخرون، 2015).

ضمن المحاور الاتية :

- عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لمرض تعفن الثمار بالاعتماد على التشخيص المظهري
- تحديد اهم العزلات الفطرية المسببة للمرض والتي كانت أكثر ضراوة في احداث مرض تعفن ثمار الرمان، لاستخدامها في التجارب
- تحديد اكثر العزلات الفطرية انتاجا للسموم الفطرية وحفظها وتنميتها لإنتاج السموم .
- التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان. بطريقة الكشف عن تتابع القواعد النتروجينية لهذه العزلات ومقارنة تسلسلاتها مع تسلسلات العزلات العالمية باستعمال برنامج BLAST .
- تقييم كفاءة بعض العوامل الاحيائية والمبيدات ذات الأصل النباتي والمستخلصات النباتية ضد مهاجمة مسببات مرض تعفن ثمار الرمان (بالمختبر والحقل والمخزن)

2- مراجعة المصادر

2 -1: الاهمية الاقتصادية لمحصول الرمان :

يُعد الرمان احدى أقدم الثمار التي عرفها الانسان، وأدرك قيمتها الغذائية والعلاجية مبكراً، وقد ورد ذكره في القرآن الكريم في اكثر من سورة فذُكر في سورة الأنعام **((وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّاتٍ مَعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أُكُلُهُ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُتَشَابِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۚ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَآتُوا حَقَّهُ يَوْمَ حَصَادِهِ ۖ وَلَا تُسْرِفُوا ۚ إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ))** ﴿١٤١﴾ قال تعالى في سورة الرحمن **((فِيهِمَا فَاكِهَةٌ وَنَخْلٌ وَرُمَّانٌ))** ﴿٦٨﴾ على انه فاكهة اهل الجنة لفوائده الغذائية والصحية(المفلحي والزمير، 2016).

الاسم الإنكليزي لنبات الرمان هو Pomegranate ويسمى علميا *Punica granatum* وينتمي الى العائلة الرمانية *Punicaceae* , تضم جنساً واحداً وهو *Punica* ونوعين .هما *P.granatum* وهو النوع الذي يعطي ثماراً صالحة للأكل والنوع *P.protopunica* وهو النوع الذي يزرع كأشجار زينة نظراً لجمال أزهاره المتعددة البتلات ذات اللون الأحمر الزاهي (Pantiora واخرون،2023). والموطن الأصلي له إيران، ومنها انتقل الى الجزيرة العربية ثم باقي الدول العربية فإسبانيا ثم أمريكا (Zahedi واخرون، 2023). يزرع الرمان حالياً باليمن ومصر والعراق ولبنان والسعودية وسوريا وفلسطين، ويلائم انتاج الثمار شتاء ملائم للبرودة وصيف حار(العواضي، 2018).

زاد انتشار الرمان بشكل ملحوظ، خاصة بعد أن اثبت أن له خصائص مضادة للميكروبات والفيروسات. وله خصائص مضادة للسرطان ومضادات الأكسدة القوية ومقاومة الطفرات، تتكون ثمرة الرمان من ثلاثة أجزاء: البذرة والعصير والقشر, على وجه الخصوص يُستخدم القشر تقليديًا كعلاج طبيعي للأمراض المعدية (Jurenka، 2008).

يبلغ اجمالي انتاج الرمان في جميع انحاء العالم حوالي 8.1 مليون طن والمنتجون الرئيسيون هم الهند والصين وايران الذين يمثلون 70% من التجارة العالمية (Mincuzzi واخرون، 2022) قدر انتاج الرمان241671 طن في العراق للموسم الصيفي 2020 بأرتفاع قُدر نسبته 9.94%، عن انتاج العام الذي قبله حيث قدر انتاج العام 2019 بمقدار 219822 طن.(الجهاز المركزي للإحصاء ، وزارة الزراعة ،2021).

وهنالك أهمية طبية كبيرة لاشجار وثمار الرمان، فقد تبين أن أجزاء مختلفة من النبات مثل اللحاء والأوراق والفاكهة ومستخلص الفاكهة أو العصير وقشرة الفاكهة تظهر أنشطة طبية مختلفة (Al-MuammarوKhan، 2012). تستخدم أجزاء النبات لعلاج الأمراض والاضطرابات المختلفة، على سبيل المثال: من القرحة، لدغات الأفاعي، تلف الكبد، الزحار، الإسهال، داء الديدان الطفيلية، الحماض، النزف ومشاكل الجهاز التنفسي (Lansky و Newman، 2007). يتم استخدام البراعم المجففة والمسحوقة لعلاج أمراض الجهاز الهضمي, كما يُستخدم رماد نبات الرمان كوسيلة وقائية ضد العدوى الجلدية. ويستخدم المسحوق المحضر من قشرته كمسحوق للأسنان ويستخدم أيضًا في الصناعات التجميلية. يُظهر المستخلص المائي لقشر ثمار الرمان نشاطًا في التئام الجروح. يحتوي عصير الفاكهة أيضًا على خاصية غنية لمنع البروتين الدهني منخفض الكثافة (Jurenka، 2008). تُظهر المكونات النباتية الموجودة في الرمان أنشطة مضادة للأكسدة، ومضادة للطفيليات، ومضادة للبلهارزيا، ومضادة لمرض السكر، ومضادة للفيروسات، ومضادة للبكتيريا، ومضادة للالتهابات ومضادة للسرطان (Dassprakash واخرون، 2012)

2-2-: مرض تعفن ثمار الرمان

تتعرض ثمار الرمان لخطر المهاجمة من قبل العديد من الفطريات الممرضة مسببة الكثير من الامراض عند التخزين لفترات طويلة. يتعرض الرمان الى المهاجمة من مسببات الامراض المختلفة في مرحلة ما قبل او بعد الحصاد، مما له تأثير كبير على جودة الفاكهة وعمر التخزين مما يؤدي الى تلف الانسجة وذلك يجعل الفاكهة غير قابلة للبيع (Munhuweyi واخرون، 2016). من اهم هذه المسببات المرضية هي *Alternaria.alternata*، وأنواع عديدة من الجنس *Aspergellus* spp اذ تسبب امراض مختلفة على ثمار الرمان في جميع انحاء العالم ومن اهم هذه الامراض هو مرض العفن الاسود في الرمان (القلب الاسود) (Mincuzzi واخرون، 2022).

تصيب مسببات الأمراض الكامنة الفاكهة المستقبلية خلال مرحلة الإزهار وتبقى كامنة حتى تسمح لها الظروف البيئية والفسيولوجية المثلى بالتطور عادة، يحدث هذا خلال مراحل ما بعد الحصاد. ومن الأمراض الرئيسية التي تنسب إلى هذه المجموعة هي، القلب الأسود والعفن الأسود، والتي تمثل حوالي 65٪ من إجمالي الإصابات. تنتمي النسبة المتبقية إلى مسببات أمراض الجروح التي تخترق قشر الرمان وتصيب الفاكهة بعد الأحداث الناجمة عن سوء التعامل (Mincuzz واخرون، 2023).

كشفت الدراسات المسحية عن تسجيل الأمراض التي تصيب بساتين الرمان في الفترة من 2014 إلى 2016 في جنوب شرق الولايات المتحدة أن العديد من الأنواع الفطرية كانت مرتبطة بأمراض تعفن ثمار الرمان (Xavier واخرون، 2020). بينما سجل حالات مختلفة لامراض تعفن ثمار الرمان في كاليفورنيا والهند والعديد من دول البحر الأبيض المتوسط، بما في ذلك قبرص واليونان ومصر وإيطاليا، واشار التقدير الاولي للخسائر الناجمة سنويًا عن تعفن ثمار الرمان في إيطاليا. وبحسب التقرير الأولي للمرض في إيطاليا فإن نسبة الإصابة به في البساتين التجارية تتراوح من 1 إلى 9% من الفواكه (Aloi واخرون، 2021).

ان مـرض تعفـن القلـب الاسـود فـي الرمـان، المتسـبب عنـه *Alternaria alternata* ، سـجل لأول مـرة فـي الولايـات المتحـدة الامريكيـة والمكسـيك، كمـرض مابعـد الحصـاد فـي اليونـان إذ يغـزو الثمـار خـلال موسـم التزهيـر ويتبعهـا نمـو الفطريـات وايضـاً عنـد عقـد الثمـار (yehia واخـرون، 2013) وهـو أحـد أمـراض الرمـان الرئيسـية المهمـة التـي تنـتج فـي جميـع أنحـاء العـالم، يـتم مهاجمـه معظـم الثمـار فـي البسـاتين بواسـطة الفطـر *A. alternata* ولكـن تظهـر الأعـراض علـى نسـبة صـغيرة فقـط مـن الثمـار المهاجمـة. لـوحظ أنـه داخـل بعـض البسـاتين كـان ظهـور أعـراض المـرض علـى ثمـار الرمـان مرتبطًـا بـالمظهر البصـري للأشـجار فالأشـجار التـي بـدت ضـعيفة بصـريًا تحمـل ثمـارًا مصـابة بـالمرض أكثـر مـن الأشـجار القويـة (Ezra واخـرون، 2019). ففـي دراسـة اجريـت فـي اوربـا تـم اختيـار 12 إلـى 22 شـجرة فـي كـل بسـتان، بنـاءً علـى مظهرهـا البصـري اعتبـرت الأشـجار القويـة مقاومـة مـن الناحيـة الفسـيولوجية لمـرض *A. alternata* والأشـجار الضـعيفة معرضـة مـن الناحيـة الفسـيولوجية للإصـابة. وبعـدها تـم جمـع فاكهـة الرمـان التـي يشـتبه فـي إصـابتها بعفـن القلـب (أي الفاكهـة المشـوهة ذات الـوزن الخفيـف) بـين عـامي 2008 و2013 فـي سـتة مراكـز تعبئـة الثمـار واجريـت التجربـة مختبريـا بتقطيـع الفاكهـة بسـكين معقـم، وتـم وضـع الحبـوب المصـابة علـى وسـط أجـار دكسـتروز البطاطـا (PDA) حضـنت الأطبـاق عنـد درجـة حـرارة 25 مئويـة. بعـد 3-5 ايـام نمـت الهايفـات مـن الفطريـات المعزولـة علـى PDA وتـم عـزل انـواع الفطـر *Alternaria* spp تـم تشخيصـها علـى أسـاس الخصـائص المورفولوجيـة والمجهريـة، وبـذلك تـم تحديـد حـدوث ظهـور أعـراض تعفـن القلـب علـى الأشـجار والجـذوع او الاشـجار المقاومـة مـن الناحيـة الفسـيولوجية فـي أربعـة بسـاتين تجاريـة للرمـان قبـل موسـم الحصـاد (Ezra واخـرون، 2019).

فـي يوليـو 2012 و2013 تـم اسـتخدام 12 عزلـة مـن *Alternaria* تمثـل مجموعـات مختلفـة مـن الفطـر الممـرض تـم حقـن المعلقـات الكونيديـة لهـا (5 مـل مـن 2 ×10^{-5} جـراثيم / مل/مـاء) بحقنـة لعمـق 2 سـم فـي منطقـة الكـأس لكـل ثمـرة وخمـس ثمـرات لكـل عزلـة. تـم التحقـق مـن أعـراض الاصـابة بـتعفن القلـب *Alternaria* عـن طريـق وجـود كونيـديا الممـرض أو عـن طريـق إعـادة عـزل الممـرض مـن جديـد والتأكـد مـن الخصـائص

المظهرية للفطريات المعزولة (Luo واخرون، 2017). وفي دراسة في ايطاليا لاختبارات الامراضية لعزلتين من الفطر *A.alternata* تم إجراء حقن معلق الفطر بتركيز 5×10^{-4} /بوغ مل (0.5 مل / ثمرة) في منطقة الكأس وتم تلقيح عشر ثمار سيطرة بـ SDW. وبعد 12 يومًا عند درجة حرارة 25 درجة مئوية، أظهرت جميع الفاكهة الملقحة بالفطر أعراضًا مشابهة لتلك التي لوحظت في الفاكهة المصابة طبيعيًا. فان كلا العزلتين احدثت تحلل الحبوب دون التأثير على أغشية القشرة. ولم تظهر على ثمار السيطرة أي أعراض للإصابة. تم إعادة عزل الفطر فقط من الثمار التي تظهر عليها الأعراض، مما يؤكد فرضيات كوخ (Thomidis، 2015) لذلك اعتبر هذا المرض إيطاليا مصدر قلق كبير لتوسع صناعة الرمان أيضا بسبب صعوبة فحص الفاكهة المصابة على أساس الأعراض الخارجية (Faedda واخرون، 2015).

3-2: الاعراض المرضية و دورة مرض تعفن ثمار الرمان

إن الاعراض المرضية لمرض تعفن ثمار الرمان تبدا بالانتشار من منطقة الكأس بينما تحتفظ القشرة الخارجية بمظهرها الطبيعي .أذ يمكن التعرف على الثمار المصابة بعفن القلب حسب لون قشرتها ووزنها الخفيف، عندما يتم ضرب هذه الثمار فإنها تصدر صوتاً أجوفا على عكس الصوت الباهت الصادر عن الثمار السليمة .في هذا الوقت لا توجد مراقبة فعالة في البساتين ،وفي كثير من الحالات تصاب الثمار ذات المظهر الصحي بالمرض اثناء التخزين (Ezra واخرون، 2015) يصاب الرمان في مرحلة مبكرة من النضج، وينمو وينتشر داخل الثمرة أثناء نموها. بعد اختراق الرمان، يهاجم الثمرة عن طريق إنتاج إنزيمات محللة للبشرة والجدار الخلوي ومركبات المقاومة لإزالة السموم الموجودة في انسجة جدار الثمار، يؤدي التفاعل المعزز بين العامل الممرض والمضيف إلى حدوث تغييرات في العمليات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية نظرًا لأن مرض القلب الأسود الفطري ينمو داخل الثمرة دون التأثير على القشرة الخارجية للثمرة، فإن الفحص البصري لا يكون عادةً فعالاً في التعرف عليه (Nouri واخرون، 2020).

خلال عمليات المسح البايولوجي في مناطق إنتاج الرمان والحمضيات الرئيسية في ألبانيا، لوحظت أعراض مميزة لمرض تعفن ثمار الرمان. اذ تميزت ثمار الرمان المصابة بالعفن البني إلى الأسود الناعم مع جفاف الثمار، ويمكن رؤيته عند قطع الثمرة. عادةً، كان التعفن محصوراً في بعض الانسجة الداخلية ولم يؤثر على القشرة والحواجز. في حين أظهر القشر الخارجي أعراضًا غير محددة تتوافق مع التعفن الداخلي، مثل تغير اللون إلى اللون الأحمر الداكن والتجاعيد. وكانت الثمار المتضررة بشدة غير متماثلة وأخف وزنا (Cara واخرون، 2022).

ان لخسائر الرمان اهمية اقتصادية كبيرة قد قدرت نسبة الخسائر المتسببة عن الامراض ومنها مرض تعفن القلب الاسود في الهند. اذ تم تقدير خسائر الانتاج بنسبة 35% في الحقل اما بعد الحصاد 10% وفي دراسة احدث اعطت نتائج مماثلة بشأن خسائر بعد الحصاد، وفي جنوب افريقيا كانت النسبة 18% من خسائر الرمان عند الحصاد بشكل رئيسي بسبب الاضرار غير الحيوية في حين حدثت بنسبة 23% ،21% من خسائر الرمان من الحصاد وحتى المرحلة الاولى من النقل ومن النقل الى التسويق على التوالي.بالرغم من ان العديد من العوامل الحيوية وغير الحيوية قد تؤثر على القدرة الامراضية للمسببات المرضية (Mincuzzi واخرون، 2022).

من انواع الفطريات المهمة التي تصيب الرمان هي *Alternaria* كعوامل مسببة لتعفن ثمار الرمان، وعلى أساس التشخيص المظهري لأبواغ الممرض التي تكون محمولة جواً تحدث عدوى الزهور قبل ظهور الفاكهة، يمكن أن تظل العدوى كامنة لمعظم موسم النمو حتى تهيئة الظروف الملائمة، نظرًا لأن الثمار المصابة أكثر عرضة للسقوط (Aloi واخرون، 2021).

ومن المسببات المرضية الأخرى لمرض تعفن ثمار الرمان هي الانواع العائدة الى جنس *Aspergillus* والذي يكون منتجًا للعديد من السموم الفطرية. وهو أحد العوامل الرئيسية المسؤولة عن التلوث الزراعي بالسموم الفطرية. يعد *A.flavus* و*A.parasiticus* من الأنواع الرئيسية المنتجة لسموم الأفلاتوكسين، بينما يرتبط إنتاج الأوكراتوكسين *A* بشكل رئيسي بأنواع *A.niger* و *A.carbonarius* و

A.ochraceus فقد أشار Neamah واخرون (2020) بان أشجار الرمان تصاب بالعديد من مسببات الأمراض الفطرية مثل فطر *Aspergillus niger* الذي يعد من الفطريات المهمة الموجودة في جميع أنحاء العالم والموجودة في جميع الأنظمة البيئية. هناك أنواع مختلفة من *Aspergillus* تسبب امراض لثمار الرمان، على سبيل المثال. من المعروف أن *A.flavus* و*A.niger* و*A.terreus* و*A.fumigatus* و*A.ochraceus* معروفة كمنتجي للسموم الفطرية. ولذلك، فإن التشخيص الدقيق والصحيح لهذه الأنواع أمر مهم جداً لأن ذلك سيوفر دليلاً على أنواع السموم الفطرية المنتجة في الثمار.

يعتبر *A. niger* من بين اهم أنواع الفطر *Aspergillus* spp انتشارا وضررا فهو العامل الممرض الأكثر شيوعًا والمسؤول عن تلف ما بعد الحصاد في الفواكه والخضروات والعديد من المحاصيل ومن المعروف أيضًا أنه العامل المسبب للعفن الأسود لثمار الرمان (plascencia-Jatomea واخرون، 2014).

وكذلك ايضا أنواع *Alternaria* تعتبر من المسببات الرئيسة لمرض تعفن القلب الاسود في الرمان وبالتالي تسبب انخفاضات كبيرة في المحاصيل الزراعية ، وهذا يؤدي الى خسائر اقتصادية كبيرة ، ترجع أهمية هذا الجنس أيضًا إلى إنتاج أكثر من 70 نوعاً من مركبات الايض الثانوية والسموم الفطرية المسببة لإضرار بالغة على الانسان (Cara واخرون، 2022).

اشارات دراسة عدة ان *A.alternata* هو العامل الممرض الاكثر شيوعا وإمراضيه والمسبب عن تلف الرمان ماقبل وبعد الحصاد ، إن جميع العزلات التي تم اختبارها لكل من *A.alternata* و *A.arborescens* كانت مسببة للأمراض وتسببت في أعراض نموذجية لتعفن القلب في ثمار الرمان واكدت ان *A.alternata* و *A. arborescens* هما المسؤولان عن مرض تعفن القلب في الرمان في جنوب إيطاليا (Aloiواخرون، 2021).

وفي كاليفورنيا، زادت حالات الإصابة بعفن القلب الاسود مع زيادة الإنتاج في السنوات الأخيرة وقد تم وصف مسببات الامراض على انها *Alternaria*

A.arborescens E. G. Simmons, A. alternata (Fr.) Keissl. tenuissima (Kunze) Wiltshire, Alternaria sp *Alternaria* spp. *Similarly* في كاليفورنيا تم تشخيص *Alternaria alternate* على انه المسبب الرئيسي من خلال التشخيص المظهري بالاعتماد على حجم وشكل البوغ والسلاسل والتفرعات (Luo واخرون، 2017).

4-2: السموم الفطرية (Mycotoxins) المصاحبة لفاكهة ثمار الرمان:

هي مركبات أيض فطرية ثانوية ذات اوزان جزيئة منخفضة تمتاز بأنها شديدة الثابتية لدرجات الحرارة العالية وكذلك مقاومة للأشعة فوق البنفسجية. وهي منتجات ضارة لها تأثيرات اقتصادية كبيرة (Yunواخرون،2022) وتعتبر سموم طبيعية لها مخاطر على الصحة تنتجها أنواع مختلفة من الفطريات تحت ظروف بيئية معينة وهي مواد سمية ومسرطنة للكبد واغلب أعضاء الجسم .تنتج السموم الفطرية تحت درجات الحرارة والرطوبة المرتفعة تنقسم السموم الفطرية على نطاق واسع الى مجموعتين رئيسيتين على أساس الفطريات المنتجة للسموم الفطرية ،أي فطريات تغزو في الحقل قبل الحصاد والفطريات التي تغزو بعد الحصاد اثناء التخزين(Zahraواخرون،2019). ويمكن ان تدخل سلسلتنا الغذائية اما مباشرة من خلال المكونات الغذائية الملوثة بالسموم الفطرية او عن طريق التلوث غير المباشر من نمو الفطريات السامه على الغذاء (Alshannaq واخرون، 2017).

يعتمد تأثُّير السموم الفطرُّية Mycotoxins على نوع السم واستقلابه وتراكم السموم الفطرُّية وظروف التعرض والعمر والجنس والحالة الصحية للفرد المعرض، وإن وجودها فَّي طعام الإنسان وعلف الحيوانات تمثل مصدر قلق كبير، لُّيس فقط بسبب التأثُّير السلبَّي على صحة الانسان والحيوان، ولكن ايًضا للتأثُّير العميق لخسائر المحاصيل الملوثة على الاقتصاد العالمَّي(Lopez –Arceوآخرون, 2020).

تصاب فاكهة الرمان بالعديد من الفطريات قبل وبعد الحصاد والتي تكون لها القدرة على انتاج السموم الفطرية، فطريات ما بعد الحصاد والتخزين الشائعة للفواكه هي *Penicillium* spp ،*Fusarium* spp ،*Aspergillus* spp. ،*Alternaria* spp.

الفطريات الرئيسية المنتجة للسموم الفطرية ليست مسببات الأمراض العدوانية في النباتات ومع ذلك يتم إنتاج السموم الفطرية بواسطة عدة أجناس في النباتات خلال موسم النمو عندما تكون الظروف البيئية مناسبة، ويستمر إنتاجها أو البدء بها في منتجات ما بعد الحصاد والمخزن. يتم إنتاج غالبية هذه السموم عن طريق الفطريات من أجناس *Aspergillus* و*Penicillium* و*Fusarium*. غالبًا ما يتم تصنيف أنواع *Alternaria*و*Fusarium* السامة على أنها فطريات حقلية لأنها تتطلب محتوى رطوبة عاليًا للنمو وانتاج السموم الفطرية. كما تنمو فطريات التخزين، وخاصة أنواع *Aspergillus* ، و*Penicillium* بشكل جيد عند انخفاض نسبة الرطوبة (Ammar و El-Naggar، 2017).

اشارات دراسة في قبرص الى وجود انواع من السموم الفطرية وجدت في الرمان منها *Alternariol (AOH)*، *alternariol monomethyl-ether (AME)* ، *ochratoxin A (OTA) and fumonisin tentoxin (TEN)*

السموم الفطرية الأكثر شيوعًا التي تنتجها *Alternaria* spp. هي (AOH) (TEA) (TEN) (ALT) (AME)وقد تم اكتشافها في العديد من المواد الغذائية على الرغم من أن السمية الحادة للسموم الفطرية *Alternaria* تعتبر منخفضة في الثدييات، إلا أن هناك أدلة قوية على انها قد تكون مسببة للطفرات ومسرطنة (López واخرون، 2016) وكذلك سموم *Ochratoxin* الذي يكون المنتج الرئيسي لها هو *niger Aspergillus* والتي تعتبر من السموم الفطرية المهمة لكون لها تأثيرات سلبية على صحة الانسان من خلال تأثيراته على الجهاز المناعي والكبد والكلى وتشوية الجينات (Heperkan واخرون، 2023).

5-2 : السموم الفطرية المنتجة من قبل الفطر *Alternaria* والفطر *Aspergillus*

يعتبر *Alternaria* من اهم انواع الفطريات الممرضة للنباتات التي تصيب مدى واسع من المحاصيل المهمة والفواكه قبل الحصاد (بالحقل) وبعد الحصاد (اثناء التخزين) ولكنه يعيش أيضا في تكافل بدون أعراض باعتباره ينمو داخليًا للعديد من

النباتات ونظرًا لانتشار النمو الداخلي من المهم جدا السيطرة على التغييرات البيئية غير الحيوية التي قد تتسبب في تحول العدوى بدون أعراض إلى التطفل (DeMers،2022).

تعتبر بعض أنواع الفطر *Alternaria* قادرة على إنتاج العديد من مركبات الايض الثانوية السامة، المعروفة باسم السموم الفطرية التي تلوث السلع الغذائية المخزنة نظرًا لقدرتها على النمو وإنتاج السموم في درجات حرارة منخفضة، فإنها يمكن أن تكون ملوثات خطيرة للمواد الخام الزراعية أو المنتجات المصنعة والمحاصيل بعد الجني حتى في ظل ظروف التبريد (Andersen واخرون، 2006).

تعد سموم *Alternariol* من السموم الرئيسة والاكثر انتشاراً في ثمار الرمان وذات تأثيرات مهمة وسلبية محتملة على الانسان عند تناول الفاكهة او الغذاء الملوث والمنتج الرئيسي لها هو الفطر *Alternaria* هذه السموم يمكن ان تسبب مشاكل صحية حادة ومزمنة ويكون اكتشاف سموم *Alternariol* وتشخيصها امراً صعب بسبب تراكيزها واوزانها الجزيئية المنخفضة (Bachaواخرون، 2023).

قدرت تراكيز سموم الـ *Alternariol* في ثمار الرمان الملقحة صناعيًا بعزلات مختلفة من أنواع *Alternaria alternata* والمعروفة بإنتاج السموم الفطرية المستهدفة في المزارع النقية، وتم العثور على تركيزات *Alternariol* تتراوح من 0.3 إلى 50.5 ميكروغرام / غرام و*Alternariol Monomethyl ether* من 0.5 إلى 32.3 ميكروغرام / غرام (Myresiotis واخرون، 2015).

تعددت الدراسات حول الطفرات والسمية الجينية للألترايول وإيثر مونوميثيل الألترناريول. تم التعرف على Alternariol باعتباره قد يساهم في إضعاف سلامة الحمض النووي في خلايا سرطان القولون البشرية. تعتمد الطرق التحليلية لتحديد سموم *Alternaria* إلى حد كبير على الإجراءات التي تتضمن التنظيف عن طريق تقسيم المذيبات أو استخلاص الطور الصلب، تليها تقنيات الفصل الكروماتوغرافي بالاشتراك مع الأشعة فوق البنفسجية والفلورية والكشف الكهروكيميائي والطيف الكتلي. تم الإبلاغ عن وجود عدد كبير من مستقلبات الألترناريول بشكل طبيعي في

السـلع الغذائيـة (مثـل الفواكـه والخضـروات والحبـوب والنباتـات الزيتيـة) (Ostry، 2008).

بينمـا يعـد الفطـر *Aspergillus* مـن اهـم انـواع الفطريـات الممرضـة للنباتـات التـي تصـيب مـدى واسـع مـن المحاصـيل المهمـة والفواكـه قبـل الحصـاد وبعـد الحصـاد لـه أنـواع مختلفـة، علـى سـبيل المثـال. *A.flavus*، *A.niger* ، *A.terreus*، *A. fumigatus* هـم من منتجي السموم الفطرية المشهورين(Neamah واخرون، 2020).

العديـد مـن أنواعـه قـادرة علـى إنتـاج مجموعـة واسـعة مـن السـموم الفطريـة الضـارة بالبشـر والحيوانـات التـي تسـتهلكها. السـموم الفطريـة الرئيسـية المرتبطـة بـأنواع ا *Aspergillus* فـي الفواكـه والخضـروات هـي الأفلاتوكسـينات التـي تنـتج بشـكل رئيسـي عـن طريـق سـلالات *A.flavus* و A.parasiticus فـي التـين والتمـر، والأوكراتوكسـين A(OTA)الـذي تنتجـه *A.Carbonarius* وغيرهـا مـن *Aspergillus* المولـدة للسـموم فـي العنـب والكرمـة المجففـة والفواكـه والرمـان تعتبـر بعـض السـموم الفطريـة التـي تنتجهـا أنـواع *Aspergillus* خـلال مراحـل نموهـا فـي الفواكـه والخضـروات مـن أهـم السـموم الفطريـة المسـرطنة وهـي سـموم الأفلاتوكسـين والأوكراتوكسـين (Barkai,2008).

يعتبـر سـم OTA مـن أكثـر أنـواع *Ochratoxin* أنتشـارا وسـمية(Liu وWei،2022) غالبـاً مـا ّيـتم العثـور علّيـه فًـي العدّيـد مـن السـلع الغذائيـة بمـا فًـي ذلـك الحبـوب والمكسـرات والفواكـه المجففـة (Zhang واخـرون،2020) التـي تعـد مـن أهـم العوامـل المسـاهمة فًـي التعـرض الغـذائي المـزمن للاوكوتوكسـين(EFSA واخـرون، 2020) وبالتـالي فهـو جـزء مـن السـم الـذي يـتم تناولـه يوميـا ممـا جعـل التقيـيم الصـحيح للمخـاطر أمـرا ضـروريا (Schulz، 2020) فـان سـموم الأوكراتوكسـين تعتبـر ملوثـا طبيعيًـا للأغذيـة والأعـلاف المتعفنـة. تشـكل التـأثيرات السـامة المتعـددة لــ OTA تهديـدًا حقيقيًـا للإنسـان وصـحة الحيـوان. علـى سـبيل المثـال، يمكـن أن يسـبب OTA اضـرار علـى الانسـان او أن يصـاب البشـر المعرضـون لــ OTA (لا سـيما عـن طريـق الاستنشـاق فـي تطـور الفشـل الكلـوي الحـاد خـلال 24 سـاعة) بمجموعـة مـن الاضـطرابات المزمنـة مثـل

سرطان الظهارة البولية العلوي، كما يلعب OTA دورًا رئيسيًا في التسبب في بعض أمراض الكلى بما في ذلك اعتلال الكلية المتوطن في دول البلقان وأورام الكلى يحدث في بعض المناطق المستوطنة في شبه جزيرة البلقان، واعتلال الكلية الخلالي المزمن الذي يحدث في بلدان شمال أفريقيا ومن المحتمل أن يحدث في أجزاء أخرى من العالم. يؤدي OTA إلى تكوين مقارب الحمض النووي، وهو معروف بسميته الجينية وتسببه في السرطان (Malirواخرون، 2016).

في دراسة اجريت في قبرص واليونان لتحديد قدرة الفطريات على انتاج السموم الفطرية المرتبطة بعفن ثمار الرمان قبل وبعد الحصاد فقد تم فحص إمكاناتها في إنتاج السموم الفطرية، تم تقديرتراكيز الأوكراتوكسين A OTA والفومونيزين B2 FB2 داخل*Aspergillus* التي تم تحديدها بشكل عام أنتجت 89% من عزلات الإلترناريا AOH وAME في المختبر، في حين تم إنتاج TEN بنسبة 43.9% فقط. في الجسم الحي، تم تقييد إنتاج AOH وAME إلى 54.2% و31.6% فان الفطريات *Alternaria* و*Aspergillus* ذات السموم الفطرية لا تشكل فقط مجموعة من الفطريات المرتبطة بعفن ثمار الرمان المسؤولة عن تدهور الفاكهة، ولكنها تشكل أيضا عامل خطر صحي محتمل لمستهلكي المنتجات المعتمدة على الرمان (Kanetis واخرون، 2015).

بينما حضيت سموم الأفلاتوكسين باهتمام أكثر لما عرفت به من قابليتها المسرطنة للإنسان والحيوان، وأن أغلب حالات التسممات الحادة والمزمنة بهذه السموم ترجع إلى تلوث المنتجات الغذائية النباتية بالفطر *flavus*. *A* و *A.parasiticus* في الحقل أو خلال الحصاد والخزن وبخاصة عندما تكون هذه المنتجات مخزونة تحت ظروف رطبة (Kitigwa، 2023). ينتج الفطر *flavus*. *A* الأفلاتوكسينات B1 و B2 أما الفطر *A.parasiticus* فينتج أيضاً G1 و G2 والأفلاتوكسين B1 هو الأكثر خطورة إذ هو المسرطن والمسبب لتلف الكبد للإنسان والحيوان وعلى الرغم من أن عملية تكوين السموم الفطرية مسيطر عليها وراثياً إلا أنها تعتمد اعتماداً مباشراً على المواد الأولية المغذية وعلى العوامل البيئية Environmental factors ويبدو أن وجود

حلقة اللاكتون في جزيئة الأفلاتوكسين هي المسؤولة عن الثبات الكيميائي والحراري للجزيئة (Kitigwa، 2023).

وتعد كل من درجة الحرارة والرطوبة في الثمار المخزونة أهم عاملين يحددان نمو الفطر وإنتاج الأفلاتوكسين وتعتبر الرطوبة المناسبة 85% فأعلى أما أقل درجة حرارة ينمو فيها الفطر فهي 12م والمثلىْ27م وأعلى درجة كانت من 40-42ْم أن إنتاج الأفلاتوكسين يتم عند وجود رطوبة نسبية عالية ودرجات الحرارة تتراوح بين 25-30ْم ، ويمكن أن تنتج هذه السموم عند درجة حرارة 8-10ْم بكميات قليلة وبوقت أطول هذا وان حدوث التلوث بالافلاتوكسين لا يقتصر على المخزن فقط لكنه يحدث أيضاً في الحقل وعلى مدى واسع من النباتات (FAO/WHO،2002) وذهبت دراسات أخرى إلى أن التلوث بالأفلاتوكسين يحدث في الحقل وأثناء الحصاد والتجفيف والنقل والخزن وأثناء عملية تصنيع المنتجات الزراعية (Abdel-Sater واخرون،2017).

إن الحد المسموح بتواجد الأفلاتوكسين في الأغذية حسب توصيات المنظمات العالمية يجب إلا يزيد عن 10 مايكروغرام/كغم ، وهذا ما أدى إلى التفكير الجاد في البحث عن طرائق فعالة للسيطرة على انتاج الأفلاتوكسين والتخلص من آثاره في الأغذية والأعلاف وحماية الإنسان والحيوان من مخاطر هذه السموم فإن الإدارة الصحيحة للمنتجات الزراعية والمراقبة والإشراف الواسعين لا تمثل الحل الوحيد لمشكلة التلوث ، لذلك فان حماية الأغذية والأعلاف من التلوث بالأفلاتوكسين أصبح موضوعاً ملحاً وضرورياً وكان لابد من تطوير آليات مفيدة وفعالة لتحطيم الأفلاتوكسين وتضمنت هذه الآليات المعالجات الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية (FAO/WHO،2002).

6-2 : طرق مكافحة مرض تعفن ثمار الرمان

تسبب أمراض النبات خسائر فادحة في الإنتاج الزراعي وتؤثر بشكل مباشر على اقتصاد العديد من البلدان اذ انخفض انتاج المحاصيل والفواكه بشكل كبير متأثرة بمسببات الأمراض (Asad،2022) لا يزال الرمان يعتبر محصولًا ثانويًا لذا فإن

مبيدات الفطريات التقليدية والبديلة المسجلة لهذا المحصول تكون نادرة. هذا له عائد مهم بعد الحصاد وخسائر اقتصادية تتعلق بشكل رئيسي بالأمراض الفطرية. الخسائر تكون واضحة في مرحلة ما بعد الحصاد إلا أن معظم الإصابات تبدأ في الحقل خلال مرحلة الإزهار لذلك هناك حاجة إلى ادارة متكاملة ما قبل الحصاد للسيطرة عليها. تحدث العدوى المتبقية بسبب مسببات أمراض الجروح التي تهاجم الفاكهة من خلال الإصابات إن آثار الممارسات الزراعية الجيدة، ومعاملات ما قبل الحصاد خلال مرحلة الإزهار وفرز الفاكهة على طول سلسلة الإنتاج وظروف التخزين المثالية وظروف النظافة الجيدة تقلل من حدوث تعفن الرمان بعد الحصاد وتزيد من توافر الرمان التجاري تعني المكافحة البديلة مهمة جدا للحد من حالات الإصابة بمرض الرمان بعد الحصاد والدفاع عن صحة الإنسان والحيوان من خلال بقايا مبيدات الفطريات والسموم الفطرية وضمان اتباع نهج الصحة الواحدة لتوفير إنتاج الطعام (Mincuzzi واخرون، 2023).

أشارت دراسة أخرى أنه يمكن أن يكون تطبيق ما بعد الحصاد فعالاً في الحد من الإصابات الأولية التي تسببها مسببات أمراض الجروح والإصابات الثانوية. تم تسليط الضوء على أهمية توقيت التطبيق وفقا لمسببات الأمراض المستهدفة من قبل (Pala واخرون، 2009) الذين قاموا بتقييم، لمدة عامين متتاليين، لمبيدات الفطريات نفسها في برنامجين مختلفين مجدولين، لا سيما أن رش الرمان بشكل رئيسي خلال مرحلة الإزهار كان أكثر فعالية في السيطرة على الفطر *Alternaria* وغيرها من مسببات الامراض (Mincuzzi واخرون، 2023).

2-6-1: المكافحة الكيميائية

وهي طريقة فعالة وعملية، لكن نظرًا للآثار السلبية لمبيدات الفطريات على البيئة وصحة الإنسان ومشاكل متبقياتها على المخلفات وبالتالي تؤثر على الحيوان، أصبح البحث عن طرق مكافحة بديلة امنة إلزاميًا في السنوات الأخيرة، أصبحت هناك إمكانية كبيرة استخدام المضادات الميكروبية، الصديقة للبيئة وصحة الإنسان والمستخلصات النباتية أو المضادات الحيوية، والمواد الشبيهة بالإنزيمات التي تنتجها،

والتي قد تكون بديلاً للمكافحة الكيميائية مع عدم ترك متبقيات في التربة ولا خطر على الدوام (Tekinerواخرون، 2020).

2-6-2: المكافحة الميكانيكية

احدى طرق الممارسات الزراعية الوقائية هي هز الأشجار قبل الحصاد. يعد التحديد الدقيق للعامل المسبب لتعفن ثمار الرمان أمرًا بالغ الأهمية لجميع الجوانب المتعلقة بعلم الأوبئة وإدارة المرض. لسوء الحظ، فإن تصنيف الفطر *Alternaria* يمثل مشكلة وقد خضع لعدة مراجعات وترتبط الصعوبات في تحديد هذا الجنس على مستوى الأنواع بالطرق المورفولوجيا لمعظم أنواعها (Aloi واخرون، 2021).

3-6-2: المكافحة الحيوية:

تم تطوير المكافحة البيولوجية في الآونة الاخيرة كبديل لمبيدات الفطريات الكيميائية وتم تحقيق نجاح كبير من خلال استخدام الكائنات الحية الدقيقة المضادة للسيطرة على أمراض ما بعد الحصاد (Gholamnejad واخرون، 2009). وعلى الرغم من فعالية المبيدات إلا ان هذا الاتجاه لا ينسجم مع الاستراتيجيات الحديثة التي تعمل على تقليل استخدام المبيدات لما لها من آثار سلبية على البيئة والأحياء غير المستهدفة وصحة الأنسان فضلاً عن ظهور السلالة المقاومة لفعلها ، لهذا ركزت معظم الدراسات على الكشف عن طرائق بديلة تمتاز بكفاءتها والمحافظة على النظام البيئي ومنها اللجوء الى الأحياء المضادة للمسببات المرضية والعمل على تطوير كفاءتها كاستراتيجية بديلة وقد تركزت معظم الدراسات على انواع الفطر . *Trichoderma* spp والذي شخصت انواع عدة منه مثل *T.harziau* و *T.Pseudokoningii* بالإضافة الى استحداث دور الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* في مقاومة هذه الأمراض واظهرت هذه العوامل كفاءتها العالية ضد احياء التربة الممرضة تحت الظروف المختبرية و الحد من تأثير المسببات المرضية تحت ظروف البيت الزجاجي والحقل (Naher واخرون، 2014).

استعملت خميرة *S. cerevisiae* في العديد من البحوث لسهولة التعامل معها وقدرتها على النمو في رقم هيدروجيني واسع المدى وكذلك تنمو في الظروف الهوائية واللاهوائية إلا إن النمو في الظروف اللاهوائية اقل سرعة منه في الظروف الهوائية (Persons واخرون، 2013) تنمو خميرة *S.cerevisiae* بصورة جيدة بدرجة حرارة 37ْم وتتراوح درجة الحرارة المثلى لها بين 25 – 30ْم للخميرة دور مهم في ايض السكريات إلى غاز ثنائي اوكسيد الكربون CO2 وماء H2O في الظروف الهوائية أما في الظروف اللاهوائية فتؤدي إلى إنتاج الكحول الاثيلي نتيجة تخمرات السكر وتكون الطاقة المنتجة في الظروف الهوائية أكثر من تلك المنتجة في الظروف اللاهوائية (El-Nady وShalaby ، 2008) .

إذ نالت المكافحة الحيوية للمسببات المرضية الكامنة في التربة اهتماما واسعا من العديد من الباحثين و من بين الكائنات الحية المستخدمة في مجال المكافحة الأحيائية التي حضت باهتمام خاص هي الخميرة ومن طرائق المكافحة الأخرى التي تستخدم حاليا في مقاومة المسببات المرضية هي المستخلصات النباتية بوصفها بدائل واعدة عن طرائق المقاومة الكيميائية إذ اثبت العديد منها فاعلية في مقاومة المسببات الفطرية والبكتيرية وغيرها لكونها رخيصة الثمن وآمنة الاستخدام ولا تترك أية متبقيات سمية على النبات بالإضافة إلى سهولة الحصول عليها لتوفرها بكثرة في الطبيعة (كاظم واخرون، 2015).

2-7: تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطريات الممرضة

تعد النباتات الطبية مصدراً مهماً للمركبات الحيوية الفعالة ذات القيمة العلاجية للعديد من الأمراض استخدمت النباتات الطبية ومنذ العصور القديمة كمواد حافظه للمواد الغذائية لما تمتلكه من خصائص ضد التلوث فضلا عن أنها مطهرة(Al- Niaame وAziz،2013) تحتوي النباتات الطبية والعطرية على مركبات عديدة مثل الفينولات والفلافونويدات والقلويدات والبروتينات ومشتقات استبدال الأوكسجين (Cowan، 1999) تعود فاعلية المستخلصات النباتية للنباتات الطبية والعطرية لاحتوائها على مواد فعالة تؤثر في نمو الميكروبات والفطريات والبكتريا المسببة للأمراض وهذه

المركبات الفعالة ناتجة عن عملية التمثيل الضوئي (Doughariواخرون،2008) في حين بينت نتائج دراسة أخرى أن المستخلصات النباتية لنبات الكزبرة ذات فعالية تثبيطيه عالية بلغت 78.16% تجاه الفطريات وحقق المستخلص الكحولي أكثر فاعلية في تثبيط نمو الفطريات الممرضة المدروسة مقارنة بالمستخلصات الإستونية والمائية وكان للتركيز 20 ميكرولتر/مل للمستخلصات الثالثة فعالية عالية في تثبيط نمو الفطريات. كما ظهر فطر *Aspergillus* أكثر حساسية للمستخلصات الإستونية والإيثانولية مقارنة بالفطرين *Fusarium* و *Penicillium* (محمد،2019).

لقد أُجريت العديد من الدراسات التي تشير الى فعالية المستخلصات النباتية تجاه نمو الفطرين *Aspergillus* و *Alternaria* وانتاج السموم فقد أشار Pundriو Jain(2010). إلى أنّ المستخلص الكحولي لنبات القرنفل يمتلك فعالية تثبيط تجاه نمو هايفات الفطر*A.flavus*. في حين اثبت تأثير عدة انواع من الزيوت الطيارة منها الزيت الطيار لنبات الدارسين والزعتروالكمون التي ثبطت نمو الفطر *A. parasiticus* والزيوت الطيارة لكل من الكزبرة والفلفل الاسود فعالة ايضا في تأثيرها على انتاج الافلاتوكسين وفعالة في تثبيط عملية تخليق الافلاتوكسين اكثر من فعاليتها ضد نمو الفطر, وقد وجد ان الزيوت المستخلصة من الزعتروالدارسين ثبطت نمو انواع من جنس *Aspergillus* (زعيط وابوالغيث، 2021).

تمت دراسة التأثير التثبيطي للمستخلصات الكحولية لنباتي الميرمية *Salvia officinalis* والنعناع *Mentha longifolia*. تم اختبار خمس تراكيز لكل نوع من هذه المستخلصات (5%، 10%، 15%، 20%، 25%) لتأثيرها في تثبيط النمو الفطري لأربعة أنواع من الفطريات الخيطية المعزولة من التربة *A.niger*، *P.chrysogenum*، *F.solani*، *A.alternata*على الوسط الغذائي SDA في المختبر، أظهرت النتائج أن لمستخلصات الإيثانول من النباتين كلاهما تأثير مثبط لنمو الفطريات على الوسط الغذائي،حيث أعطى مستخلص نبات النعناع بتركيز 25% أعلى نسبة تثبيط للفطر *A. niger* إذ بلغت 61.09%، كما أن التأثير التثبيطي لكلاهما المستخلصين النباتيين يزداد مع زيادة التركيز، وأظهرت اختبارات الكشف الكيميائي فعاليتهما. باحتوائها على مواد فعالة مضادة ومثبطه لنمو الفطريات مثل الفلافونويد،

والجليكوسيدات، والزيوت الطيارة جاءت التوصية باستخدام هذه المستخلصات النباتية كبديل لمبيدات الفطريات الكيميائية بسبب فعاليتها وانخفاض التكلفة، وتطبيقها الآمن، وعدم وجود آثار ضارة على البيئة (AhamdiوAbuaziza،2023).

2-8: التطبيقات الزراعية للسيطرة على مرض تعفن ثمار الرمان

2-8-1: تطبيقات ما قبل الحصاد

تبدأ العدوى في البستان. وبالتالي، فإن ممارسات إدارة مرض ما قبل الحصاد مهمة جدًا للسيطرة على أمراض ما بعد الحصاد على الرمان تعتبر أنظمة الري مهمة لتقليل الشقوق حتى الجروح الدقيقة، والتي يمكن أن تكون فرصا لعدوى مسببات أمراض الجروح. إذا تم إجراء التقليم المناسب في البستان فإنه يؤدي إلى تحسين التهوية مما يقلل من الرطوبة التي ثبت أنها تمنع العدوى عن طريق مسببات الأمراض الفطرية. يعد التسميد المتوازن لتجنب الإفراط في النيتروجين ممارسة معروفة لتقليل الأمراض التي تصيب العديد من المحاصيل ومع ذلك فإن التغذية بالكالسيوم لها أهمية كبيرة لعمر تخزيني طويل وصحي للرمان يُعد التطبيق المباشر لرش الكالسيوم على الأشجار خلال موسم النمو وسيلة فعالة لزيادة محتوى الكالسيوم في الفاكهة لتأخير تعفن الفاكهة المخزنة (Conway واخرون،2001) يؤدي رش مبيدات الفطريات في وقت التزهير إلى تقليل حالات العدوى الكامنة بواسطة *Botrytis.cinerea* و*Alternaria* spp. والتي قد تساعد في تقليل امراض ما بعد الحصاد. يتم رش مبيدات الفطريات لاحقًا قبل أسبوع إلى أسبوعين من الحصاد، مما يقلل من امراض ما بعد الحصاد (Kinayواخرون، 2012).

2-8-2: تطبيقات بعد الحصاد

يعد الرمان فاكهة غير مناخية، فيجب قطفه عندما ينضج تمامًا للحصول على أفضل نكهة Teksur(2015)ولإطالة عمر ثمار الرمان بعد الحصاد يتم بالفعل تطبيق بعض ممارسات ما بعد الحصاد بشكل شائع في بعض البلدان، يتم تخزين الرمان دون معالجات ما بعد الحصاد (الغسيل والتشميع ومبيدات الفطريات). يتم فرز الثمار

المحصودة بلطف وتنعيم الأجزاء التاجية في بعض المنشآت ثم تغليفها في أكياس مغطاة بالبولي إيثيلين أو وضعها في صناديق لتأخير فقدان الرطوبة والوزن، وبعد تبريدها تحفظ في درجات حرارة باردة. يتم التخلص بعناية من الفاكهة التي بها اضطرابات مثل القشور المحروقة بالشمس، أو الانقسامات، أو الشقوق، أو حرق القشور، لأنها يمكن أن تكون فرصًا للعدوى لمسببات الأمراض المتعفنة. من الأمور المهمة المتعلقة بتطبيقات ما بعد الحصاد الرطوبة، إذا تم غسل الفاكهة في غرف التعبئة لتطهير السطح، أن الأجزاء الزهرية من الفاكهة تصبح مبللة بسبب بنية الزهرة المفتوحة. إذا لم يتم تجفيفها بعد الغسيل، فإن الرطوبة تحفز العدوى أثناء التخزين اللاحق، وخاصة العفن الرمادي، وفي بعض الحالات قد تسبب التخمر داخل الفاكهة (Selcukو Erkan، 2014).

2-9: طرق تخزين ثمار الرمان وطرق المكافحة بالمخزن للسيطرة من امراض تعفن الثمار

أن فاكهة الرمان يتم إنتاجها في فترة قصيرة من العام، فإن اعتماد ظروف التخزين المثلى أمر أساسي: على سبيل المثال، يمكن وضع الفاكهة في كيس بلاستيكي مثقوب بشكل دقيق وتنظيمها في طبقة واحدة، ويفضل أن يكون ذلك في صناديق من الورق المقوى (Arendse، 2014). وعلاوة على ذلك، اعتمادا على الأصناف، فإن درجة الحرارة 7-8 درجة مئوية، والرطوبة النسبية 90-95٪ ينبغي أن تسمح بفترة تخزين تتراوح بين 4 و 6 أشهر. تعتبر هذه المرحلة الأخيرة حرجة حيث قد تحدث خسائر فادحة، ناجمة بشكل رئيسي عن مسببات الأمراض الفطرية (Selcukو Erkan، 2014).

في دراسة في ايران تم جمع الرمان من مزرعة في أصفهان وتم تخزينه على الفور في ظروف التبريد قبل التجارب. تم اختيار الثمار بشكل جيد وموحد الحجم وغسلها في محلول الكلور (200 ميكرولتر / لتر) لمدة عشر دقائق، ثم غسلها بالماء المقطر وأخيراً تجفيف الثمار بالهواء المضغوط. تم حفظ العينات بدون أي تغليف في مكان مظلم عند درجة حرارة 4 درجات مئوية ورطوبة نسبية 90٪ أثناء التخزين. ثم

تم توزيع الثمار بشكل عشوائي .فأدى الى منعها من مسببات تعفن الثمار بشكل كامل (Lotfi واخرون،2022).

استخدام المعالجات الحرارية بعد الحصاد للسيطرة على التحلل الفطري بعد الحصاد له أهمية متزايدة كبديل لمبيدات الفطريات التقليدية. اذ يتم تطبيق الحرارة عن طريق الهواء الدافئ أو يتم استخدام الماء الساخن. بشكل عام، للسيطرة على التحلل الفطري , يتم تطبيق الماء الساخن على الفواكه والخضروات عن طريق غمسها في الماء الساخن , وبالفعل طبقت المعالجة الحرارية على ثمار الرمان بعد الحصاد في بعض الدراسات بالاشتراك مع مبيدات الفطريات أو أملاح البيكربونات وكانت النتائج تشير الى فعالية هذه الأساليب ضد الفطريات المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان (Selcuk وErkan ، 2014).

تظهر ظروف التخزين المثالية لفاكهة الرمان اختلافات طفيفة باختلاف الأصناف،حيث ظروف التخزين الموصى بها لـ Mollar و"Wonderful" هي تخزين حوالي 2-3 أشهر،(Küpper واخرون, 1994) بينما بالنسبة لـ "Hicaznar" يوصى بدرجة حرارة 6 درجات مئوية مع رطوبة نسبية تبلغ حوالي 90-95٪ لتقليل فقدان الوزن للتخزين طويل المدى لمدة تصل إلى 5 أشهر (Artés واخرون , 2000).

2-10: الكشف عن السموم الفطرية بطريقة الكروماتوغرافي السائل عالي الاداء (HPLC) High performance Liquid chromatographic

هي عبارة عن اداة تحليلية جديدة للسموم الفطرية تعتمد على التركيب الكيميائي والتركيب الفيزياوي لتلك السموم ويتم الفصل والتقنية على اساس الاقطاب تتم باستخدام نوعين من الاعمدة تستخدم الاعمدة الصغيرة للعينات اما الكبيرة تستخدم لمستخلصات السموم الفطرية .وتعتمد هذه الطريقة على نشر العينة المراد فحصها بين طورين احدهما متغير ويكون سائلاً او صلباً. وتعد من الطرق ذات الحساسية والدقة العالية للتشخيص النوعي والتقدير الكمي للسم . تتطلب هذه الطريقة معدات مكلفة بالاضافة الى عمليات التنظيف المستمرة ولقد استعملت هذه الطريقة في العديد من

الابحـاث مثـل تحليـل التواجـد الطبيعـي للسـموم HPLC وكانـت مسـتويات هـذه السـموم لجميـع السـنوات المدروسـة يتـراوح بـين 2525-4528 ميكروغـرام\كغم (Garrido واخرون، 2012).

3: المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1: الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب .

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من الأجهزة والأدوات المختلفة الخاصة بهذه الدراسة والمواد الكيميائية لتنفيذ الدراسة المختبرية

الجدول (1) الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب .

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	جهاز التعقيم البخاري Autoclave	LabTech	Japan
2	الحاضنة Incupoubator	Memmert	Germany
3	مجهر ضوئي مركب Compund light microscope	Olympus	Japan
4	فرن كهربائي Electrical oven	Memmert	Germany
5	ثلاجة Refrigerater	L.G	Korea
6	اطباق بتري Petri Dishes	Afco	Jordan
7	ميزان حساس Sensitive Balance	Sartorius	U.K.
8	الرجاج VORTEX	Memmert	Germany
9	أوراق ترشيح Filter paper	BioBasic Inc.	Korea
10	مطحنة كهربائية Electric grinder	Mammanlex	China
11	Millipore Fillter	Sartorius Stedim	Germany
12	Loop	----	----
13	أسطوانة Cylider	Lap	Germany
14	محقنة طبية Medical Syringe		England
15	Slider and cover slide	Whatman 4	England
16	دوارق زجاجية مختلفة الاحجام Flasks	Unisonic LTD	England
17	غرفة العزل Hood	Tianjin Taisite	China
18	ثاقب فلين Cork Borer	-	China
19	Glass Beaker	-	Germany

الجدول (2) المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة

ت	المادة الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Antibiotics	Samarra	Iraq
2	Ethyl alcohol	-	Iraq
3	Sodium hupochlorite	Glorox Original	India
4	Chloroform ($CHCL_3$)	SRL	India
5	Formalin	-	India
6	Methanol (CH_4O)	Sigma Aldrich	Germany
7	Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$	Thomas Baker	India
8	Potassium Chloride (KCL)	CDH	India
9	Sillica gel	-	Germany
10	Tri-chloroacetic acid (TCA)	Sigma-Aldrich	Germany
11	Ellman's reagent (DTNB)	MedChemExpress	China
12	AST Kit	Sanymed	Italia
13	ALT Kit	Sanymed	Italia
14	Alternariol Standard	Sigma-Aldrich	Germany
15	Aflatoxin B1 Standard	Sigma-Aldrich	Germany
16	Ochratoxin A Standard	Sigma-Aldrich	Germany

الجدول (3) الفطريات الممرضة المستخدمة بالدراسة

ت	الفطريات	مكان العزل او مكان الحصول علية
1	*Alternaria alternata*	ثمار الرمان
2	*Aspergillus flavus*	ثمار الرمان
3	*Aspergillus niger*	ثمار الرمان
4	*Aspergillus ochraceous*	ثمار الرمان

2-3: تحضير الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات .

استخدمت في هذه الدراسة أوساط زرعيه مختلفة . لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها وكذلك لغرض أجراء التجارب الخاصة بها وكما يأتي :

3-2-1: وسط البطاطا سكروز اكار(P.S.A)Potato Sucrose Agar

حضر الوسط بأخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة والمقطعة إلى قطع صغيرة وغليها بالماء المقطر بحجم 500 مل لمدة 20 -30 دقيقة في دورق زجاجي وبعد إنتهاء مدّة الغليان رشح الخليط في دورق زجاجي بقطعة من الشاش للحصول على الراشح , اذيب 10 غم من سكر السكروز و17 غم من الاكار في 500 مل اخرى ثم اضيف إليها راشح البطاطا واكمل الحجم إلى واحد لتر, وزع الوسط في دوارق زجاجية بحسب الحاجة واغلقت فوهاتها بسدادات من القطن وعقمت بجهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق قبل وصول درجة الحرارة 45 مْ، ثم اضيف 250 ملغم / 1لتر من المضاد الحيوي Tetracyclin، وقبل التصلب تم صب الوسط في اطباق بتري حسب التجربة المطلوبة او حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال

3-2-2: وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز(P.D.A) Potato Dextrose Agar

حضر بإذابة 39 غم في واحد لتر من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب اضيف إليه المضاد الحيوي Tetracycline, ثم صب الوسط في اطباق بتري حسب التجربة المطلوبة أو حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

3-2-3: وسط Nutrient Yeast Dextrose Broth

حضر هذا الوسط لتنشيط وتنمية الخميرة *S.cervisiae* . اذ أذيبت 50 غم مكونات الوسط في 1000 مل الماء المقطر ، وعقمت بالمؤصدة على درجة 121م وضغط 1.5 كغم / سم لمدة 20 دقيقة لقحت الدوارق بالخميرة *S.cervisiae* وتحضنت في درجة حراره 25م 2 لمدة يومين .

3-3 : عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لتعفن ثمار الرمان

1-3-3 : جمع العينات

جُمعت عينات ثمار الرمان(جدول 4) من ثمان مواقع جغرافية مختلفة جمعت ثمار الرمان المحلية بصورة عشوائية من عدد من بساتين الفاكهة بينما جمعت الثمار المستوردة من بعض الأسواق المحلية المختصة ببيع الفاكهة والخضار تمت تغطية مساحة واسعة من المواقع الزراعية شملت محافظتي كربلاء وبابل للتأكد من ان المسح يمثل جميع حالات تعفن الثمار في الرمان اذ تضمن المسح خمسة مواقع من محافظة كربلاء وهي قضاء الحسينية وقضاء المركز والحر والهندية وعين التمر بينما تضمنت محافظة بابل قضاء المسيب وناحية سدة الهندية والمشروع لشهري أيلول وتشرين الأول 2023 بواقع ثلاث عينات فرعية لِكُل موقع وبمعدل 3-2 كغم للعينة وضعت في أكياس سُجل عليها : رمز العينة , الموقع المأخوذ منه العينة وتاريخ الجمع نقلت إلى مختبر الأمراض والسموم الفطرية في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة كربلاء

الجدول(4): نوع العينات وترميزها ومكان وتاريخ جمعها

ت	رمز العينة	تاريخ الجمع	المحافظة	مكان الجمع	تفاصيل الجمع	نوع العينة
1	KH	2023/9/8	كربلاء	قضاء الحسينية	عدد من بساتين الحسينية وحقول كلية الزراعة جامعة كربلاء	ثمار محلية
2	KR	2023/10/1	كربلاء	قضاء الحر	عدد من بساتين قضاء الحر	ثمار محلية
3	KC	2023/10/4	كربلاء	قضاء المركز	احد بساتين البوبيات + الأسواق التجارية	ثمار محلية + ثمار مستوردة
4	KA	2023/10/7	كربلاء	قضاء عين التمر	عدد من بساتين قضاء عين التمر	ثمار محلية
5	KT	2023/10/9	كربلاء	قضاء الهندية	عدد من بساتين قضاء الهندية	ثمار محلية
6	BH	2023/10/12	بابل	ناحية سدة الهندية	احد بساتين سدة الهندية	ثمار محلية
7	BM	2023/10/16	بابل	قضاء المسيب	احد بساتين قضاء المسيب	ثمار محلية
8	BS	2023/10/22	بابل	المشروع	احد بساتين مشروع المسيب	ثمار محلية

3-3-2 عزل الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان

عزلت الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان المصابة اذ غسلت الحبوب المصابة جيدا, تم عقمت سطحيا باستخدام بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% لمدة دقيقة واحدة , بعدها غسلت جيدا بالماء المقطر المعقم لإزالة بقايا المحلول المعقم ثم ازيل الماء الزائد منها باستعمال ورق ترشيح معقم , بعدها نقلت الاجزاء المعقمة بواسطة ملقط معقم إلى اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي P.D.A . وبواقع خمس حبات لكل طبق وبواقع 100 حبة رمان للعينة , حضنت الاطباق في درجة حرارة 25±2 م ° وبعد اربعة ايام تم فحص المستعمرات الفطرية النامية وفحصت تحت المجهر لغرض تشخيصها وحفظها (Lacey وآخرون،1999).

تم حساب النسب المئوية للظهور Occurence ولتردد Frequency العزلات الفطرية Krebs (1978) وفقًا للمعادلات الاتية :

$$\text{النسبة المئوية لظهور العزلات الفطرية} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{العدد الكُلي للعينات}} \times 100$$

$$\text{النسبة المئوية لتردد عزلات الفطر} = \frac{\text{عدد عزلات الفطر الواحد}}{\text{عدد العزلات الكلية في العينات}} \times 100$$

3-3-3: تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة من ثمار الرمان.

بعد عزل الفطريات من ثمار الرمان, تم تنقيتها بطريقة البوغ المنفرد باستخدام طريقة التخطيط على عدد من الاطباق (Streak-plate method) او بطريقة طرف خيط الهايفه بواسطة أبره ذات حلقة دائرية (Loop) معقمة في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي PDA المعقم ورمزت ورقمت ثم حضنت الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25±2°م لمدة يومين بعدها تم اخذ المستعمرات النابتة منها ونقلت إلى اطباق جديدة حاوية على الوسط نفسه وحضنت لمدة خمسة أيام (Samson وآخرون، 2004) فحصت المستعمرات الفطرية التي ظهرت باستخدام المجهر الضوئي المركب ثم شخصت مظهرياً اعتمادا على الصفات المظهرية والمجهرية وبأتباع المفاتيح التصنيفية التي ذكرها كل Pandian وآخرون (2016) و-Dıaz Najerag وآخرون (2021)

3-4: حفظ العزلات الفطرية

حفظت العزلات الفطرية التي سجلت اعلى نسبة مئوية في الظهور والتردد . والتي كانت تابعة للأجناس الفطرية *Aspergillus* spp , *Alternaria* sp , على الوسط الزرعي P.D.A صب فِي انابيب زجاجية معقمة حجم (25 مل) وضعت بشكل مائل حتى التصلب ثم لقحت الانابيب بقرص قطر 0.5سم مأخوذ من العزلات الفطرية النقِّية المعزولة سابقاً بواقع ثلاث مكررات لِكل عزلة حضنت الانابيب في درجة حرارة 25 م° وحفظت فِي درجة حرارة 4- م° لحين الاستخدام مع تجديدها كلما دعت الحاجة لذلك.

3-5: اختبار المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المعزولة من ثمار الرمان

3-5-1: تحضير لقاح الفطريات. (العالق الفطري)

نفذت هذه التجربة بتنمية الفطريات على وسط PDA ولمدة سبعة ايام عند درجة حرارة 25 + 2 م ومن ثم حصدت الأبواغ الفطرية بإضافة 10 مل من الماء المقطر المعقم لكل طبق من الاطباق المنمى عليها الفطر ومن ثم مرر قضيب زجاجي معقم على سطح المستعمرات لتسهيل عملية فصل الأبواغ عن الحوامل الكونيدية بعد ذلك جمعت العوالق البوغية وتم حساب اعدادها باستعمال شريحة الهيموسايتوميتر وتم ضبط تركيز الابواغ لنوع الفطر عند (10^{6-} وحده تكوين مستعمرة/ مل/ ماء).

3-5-2: اختبار المقدرة الامراضية

تم اجراء اختبار المقدرة الامراضية على 18 عزلة فطرية تم انتخابها من ضمن الفطريات المعزولة بهذه الدراسة من ثمار الرمان وفقا الى النسبة المئوية للظهور والتردد وذلك لتقليل عددها واختيار الاكثر ضراوة منها وذلك لاستخدامها بالاختبارات والتجارب الحقلية اللاحقة اذ تم اجراء التجربة الامراضية في غرفة الخزن المبردة في كلية الزراعة جامعه كربلاء. آخذت ثمار رمان سليمة ووضعت في صواني من المعدن المغلفة بـ ورق الزبدة (البرشمان). والتي تعتبر وحدة تجريبية إذ تحوي كل وحدة تجريبية على خمسة ثمرات من الرمان السليم تم تعقيم الثمار لمدة ثلاث دقائق في محلول NaOCl 1% وشطفها في ماء مقطر معقم (SDW).

تم اجراء عملية التلقيح الصناعي لثمار الرمان بالعزلات الفطرية بطريقتين مختلفتين . الطريقة الأولى تضمنت حقن معلق كل عزلة فطرية بتركيز 5×10^{-4}بوغ / مل/ماء (0.5 مل / ثمرة) في الثمرة من منطقة الكأس بواقع ثلاثة مكررات باستخدام محقنة قياس 15 مل. والطريقة الثانية عن طريق تخديش الثمار ورش العالق الفطري (عمل جروح بسيطة بأغلفة الثمرة دون الوصول الى الحبوب) بواقع ثلاث مكررات وبمعدل خمسة ثمار للمكرر الواحد حيث تم تلقيح الثمار بالفطربرش 1مل لكل ثمره من العالق الفطري.تم حقن ورش ثلاث مكررات كمعاملة سيطرة بـ SDW. وبعد 21 يومًا عند درجة حرارة 22 درجة مئوية، تم حساب نتائج الاختبارين.

3-5-3: حساب النسبة المئوية للإصابة وشدة الاصابة لثمار الرمان

قدرت نسبة الاصابة بمرض تعفن ثمار الرمان وذلك عن طريق حساب عدد الثمار الظاهرة عليها اعراض الاصابة بعد اجراء اختبار المقدرة الامراضية في التجربة المخزنية إذ حسبت النسبة المئوية للإصابة وفق المعادلة الآتية

$$\text{النسبة المئوية للإصابة} = \frac{\text{عدد الثمار التي ظهرت عليها الاصابة}}{\text{عدد الثمار الكلي}} \times 100 \quad (\text{Tongdee، 1994})$$

وتم حساب شدة الاصابة للثمار المصابة عن طريق توزيع الثمار الموجودة في التجربة الى خمس درجات اصابة بالاعتماد على مظهر الاصابة وحسب الدليل المرضي الاتي جدول (5):

الجدول(5) الدليل المرضي المستخدم في حساب النسبة المئوية لشدة الإصابة لتعفن ثمار الرمان

الدرجة	المعيار	مظهر الاصابة
0	0 % تعفن	لا توجد اصابة
1	1-25 % تعفن	وتغير نسبي في لون حبات الرمان
2	25-50 % تعفن	وتغير لون ورائحة في حبات الرمان
3	50-75 % تعفن	ظهور تعفنات واضحة بالوان داكنة
4	75-100 % تعفن	تقريبا تعفن كامل الثمرة وفقدان الوزن

بالاعتماد على المعادلة الموضوعة من قبل Mckinny(1923) تم حساب النسبة المئوية لشدة الاصابة :

$$\text{شدة الاصابة} = \frac{(\text{عدد الثمار في الدرجة } 1\times1)+...+(\text{عدد الثمار في الدرجة} 5\times5)}{\text{عدد الثمار المفحوصة } \times5} \times 100\%$$

3-6: التشخيص الجزيئي Molecular identification

تم اجراء التشخيص الجزيئي وفحص (PCR) لأربع عزلات فطرية لغرض تأكيد التشخيص المظهري لها , والتي كانت ثلاث عزلات تابعة للجنس *Aspergillus* spp. وعزلة فطرية تابعة للجنس *Alternaria* sp. والمعزولة من من ثمار الرمان المصابة والتي أظهرت مقدرة امراضية عالية بإصابة ثمار الرمان اذ تم تشخيصها جزيئياً وكما يأتي:

أولا: استخلاص و تنقية الـ DNA extraction and DNA purification

جرت عملية استخلاص وتنقية للـDNA من مستعمرات الفطر النقية باستخدام العدة التجارية DNeasy Plant Kits المجهزة من شركة QIAGEN الألمانية ومن خلال اتباع الخطوات التالية:

1) جمعت 100-200 ملغم من المستعمرة النقية للفطر الممرض بعمر 10 أيام ونقلت الى أنبوب اختبار (Eppendrof tube) معقم سعة 1.5 مل واضيف اليها 400 مايكروليتر من المحلول الدارئ AP1 بعدها سحقت العينة باستخدام المدقة البلاستيكية الصغيرة (Micropestle) المعقمة مع رج العينة عدة مرات باستخدام جهاز الهزاز (Vortex) والتأكد من سحق العينة بصور جيدة. لقد كان الغرض من هذه الخطوة هو تحطيم الخلايا الفطرية.
2) حضنت الانبوبة الحاوية على الخليط في حمام مائي بدرجة حرارة 65 م° لمدة 10 دقائق مع الحرص على رج الانبوبة يدويا 2-3 مرات اثناء فترة التحضين وكانت هذه الخطوة لغرض تحليل الخلايا الفطرية.

3) إضيف 130 ميكرولتر من المحلول الدارئ P3 إلى الانبوبة الحاوية على الخليط ثم مزجت المحتويات بصورة جيدة باستخدام جهاز الهزاز وحضنت بعدها لمدة 5 دقائق على الثلج. ان هذه الخطوة تترسب فيها المنظفات الخاصة بالمحاليل الدارئ والبروتينات والسكريات المتعددة الخاصة بالفطر.
4) أجريت عملية طرد مركزي للأنبوبة بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ثم نقل المحلول الطافي الى انبوبة نوع QIAshredder Mini spin column ذات اللون الارجواني التي تحوي على مرشح خاص وأيضا أجريت لها عملية طرد مركزي بالسرعة نفسها المذكورة أنفاً ولكن لمدة دقيتين. ويعمل مرشح هذه الانبوبة على إزالة معظم الرواسب وحطام الخلايا الفطرية.
5) نقل الراشح إلى أنبوب اختبار جديدة معقمة سعة 2 مل واضيف اليه 700 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW1 ومزجت المحتويات مباشرة بواسطة الماصة الصغيرة.
6) نقل بعدها 650 ميكرو لتر من الخليط بواسطة الماصة الصغيرة الى انبوبة نوع DNeasy Mini spin column ذات الون الأبيض والتي تحوي أيضا على مرشح خاص لغرض تنقية الـDNA وأجريت للأنبوبة عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة، تم التخلص بعدها من الراشح ونقل المتبقي من الخليط الى الانبوبة نفسها وأجريت عملية طرد مركزي بالسرعة نفسها والفترة الزمنية مع التخلص من الراشح أيضا.
7) أضيف 500 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW2 الى نفس الانبوبة أعلاه مع أجراء عملية طرد مركزي لها بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح ثم اضيف مرة أخرى لنفس الانبوبة 500 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW2 وأجريت لها عملية طرد مركزي بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين وأيضا تم التخلص من الراشح. أن الغرض من هذه الخطوة هو لتنقية الـDNA العالق بالمرشح.
8) وضعت الانبوبة DNeasy Mini spin column بداخل انبوبة اختبار معقمة سعة 2 مل واضيف الى غشاء مرشح الانبوبة مباشرة 100 ميكرو لتر من المحلول الدارئ TE وحضنت بعدها الانبوبة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة للحصول على الراشح الذي يحوي على الـ DNA الكلي. ان الغرض من هذه الخطوة هو إزالة الـ DNA العالق بغشاء مرشح الانبوبة ليكون مع الراشح.
9) حفظت الانبوبة الحاوية على الـDNA الكلي تحت درجة حرارة 20-م° لحين الاستخدام.

ثانياً: تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

استخدم الـDNA الذي تم استخلاصه من المسبب المرضي الذي عزل من ثمار الرمان المصابة كقالب في تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) القياسي الخاص بالكشف عن الفطريات باستخدام العدة Ready-To-Go PCR Beads المجهز من شركة/ GE Healthcare البريطانية. كان الحجم النهائي للتفاعل 25 مايكرو ليتر ويحتوي على المكونات الأساسية المتمثلة بـ 1 مايكرو ليتر من كل من البادئات ITS1 و ITS4 الموضحة أدناه (جدول 6) والتي تستهدف مضاعفة منطقة Internal transcribed spacer (ITS) التي تقع ضمن جينات الوحدة الصغيرة والوحدة الكبيرة المكونة للرايبوسومات في الكروموسومات الفطرية (White واخرون،1990) كما أضيف للتفاعل 2 مايكرو ليتر من الـ DNA الكلي المعزول من الفطريات أعلاه ومن كلى الطريقتين.

الجدول (6) البوادئ المستخدمة في تقنية Polymerase chain reaction (PCR)

Primer	Sequence 5⟶ 3		PCR product size
ITS1	F	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	500-800 bp
ITS4	R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

لقد كان برنامج التضاعف الخاص بالـ PCR يبدأ بخطوة التفكك Denaturation ، لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 95 مْ ثم 35 دورة تتكون من ثلاثة مراحل: تبدأ بالتفكك لمدة 40 ثانيه وبدرجة حرارة 95مْ ثم الالتصاق Annealing لمدة 40 ثانيه بدرجة حرارة 55مْ بعدها التمدد Extensionلمدة دقيقة بدرجة حرارة 72 مْ. بعدها تبدأ الخطوة الأخيرة للتفاعل المتمثلة بالتمدد النهائي Final extension لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 72 مْ. ناتج التفاعل رحل باستخدام الترحيل الكهربائي على وسط Agrose تركيز 1.5% بعد إضافة 5مايكرو ليتر من صبغة بروميد الاثيديوم وبعدها استخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية لغرض فحص نتائج التفاعل.

ثالثاً: تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية

بعد اجراء عملية التضاعف الـPCR أرسلت النواتج إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية لغرض تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لكل عينة فطرية، تم تقييم وتحليل البيانات المستلمة من الشركة بالاستعانة ببرنامج Chromas، ولغرض معرفة التشابه بين الفطر المدروس والفطريات المسجلة عالميا تم الاستعانة ببرنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) التابع لموقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية نتائج البحث National Center for Biotechnology Information (NCBI) تم رسم شجرة التحليل الوراثي (Phylogenetic trees analysis) بأستخدام برنامج MEGA X (Kumar واخرون، 2018).

3-7: تحضير المستخلصات النباتية الكحولية لبعض النباتات المنتخبة

حُضرت المستخلصات النباتية الكحولية(جدول 7) لعدة نباتات وهي الميرمية (*Salvia officinalis*) والدارسين(*Cinnamomum cassia*) والكزبرة (*sativum Coriandrum*) والزعتر(*Thymus vulgaris*) والقرنفل(*Syzygium aromaticum*) والسمسم (*Sesamum indicum*) بوزن 20 غم من المسحوق النباتي لكل من هذه النباتات بشكل منفرد في دورق زجاجي حجم 500 مل وأضيف إليه 200 مل من الكحول الأثيلي بتركيز 70%، ووضع بعدها المزيج في جهاز الهزاز لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 35م° بعدها رشح المزيج بواسطة ورق الترشيح نوع Whatman No.1 ، وضع المستخلص في بيكرات زجاجية قطر 10 سم وجفف الكحول في الفرن (oven) تحت درجة حرارة 40م° الى أن تبخر الكحول كليا وضع مسحوق المستخلص الكحول في أنابيب معتمة ومحكمة الغلق ظلت في المجمدة بدرجة حرارة - 18 م لحين الاستعمال . (Abu ghadeibو Shtayeh، 1999)

الجدول (7) أسماء النباتات المنتخبة لعمل المستخلصات النباتية منها واهم المواد الفعالة بها

النبات	الاسم العلمي	المادة الفعالة	الجزء المستخدم
القرفة	*Cinnamomum verum*	زيوت عطرية و الفينيل والبروبانوبدات	اللحاء النباتي
الكزبرة	*Coriandrum sativum*	القلويدات،الصابونينات، الفلافونويدات،الستيرويدات، ترايتيربينويدات، والجليكوسيدات.	البذور
الميرمية	*Salvia officinalis*	تربينويدات والبوليفينول	الاوراق
السمسم	*Sesamum Indicum*	البوليفينول،القلويدات، الفلافانويدات،التربينويدات، والجليكوسيدات.	البذور
القرنفل	*Syzygium aromaticum*	ترايتيربين فلافونيدات	البراعم الزهرية
الزعتر	*Thymus vulgaris*	زيت الزعتر 55% ومواد فينولية ومواد رارنجية	المجموع الخضري

3-8: تقييم كفاءة عدد من المستخلصات النباتية والمبيدات الكيميائية والعامل الاحيائي (الخميرة *S.cervisiae*) ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.

3-8-1: اختبار كفاءة بعض المبيدات ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

اختبرت فعالية المبيدين الزراعيين المبيد الكيميائي Palizin 65%SL ذو الاصل النباتي ، ومبيد مستخلص الفلفل الاحمرTondexir 80%EC ضد نمو العزلات الفطرية المدروسة الممرضة حضر الوسط الزرعي PDA في دوارق زجاجية بحجم 250 مل وعقم بجهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121م وضغط 15 باوند / إنج لمدة 20 دقيقة، بعد انتهاء التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45م وقبل التصلب اضيف المبيد بالتراكيز المقاربة للتركيز الموصى به من قبل الشركة المصنعة وهي 1 غم / لتر ، 2 غم / لتر و3غم / لتر لكل مبيد. رج الوسط جيداً وصب كل منهما في أطباق بتري. وبعد تصلب الوسط لقحت الأطباق بوضع قرص 0.5 ملم من العزلات الفطرية المستخدمة في الدراسة باستخدام ثاقب فليني في مركز الوسط الممزوج مع المبيد مع عمل مقارنة في طبق يحتوي على وسط زرعي بدون

اضافة أي مبيد. حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 25 مْ ولمدة اسبوع بالنسبة للعزلات الفطرية الممرضة وتم قياس معدل قطر المستعمرة النامية وحسبت نسبة التثبيط والتي على اساسها تم اختيار التركيز والمبيد الأكثر فعالية وتثبيط باستخراج النسبة المئوية للتثبيط (دخيل، 2021).

3-8-2 : أختبار تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

تم أختبار تأثير ست مستخلصات نباتية (الميرمية والكزبرة والدارسين والزعتر والسمسم والقرنفل) مختلفة ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة المعزولة من ثمار الرمان المتعفنة إذ تم مزج المستخلصات النباتية المحُضرة مسبقا (بعد اذابتها بـ 10 مل من الكحول الايثيلي) مع الوسط PDA المبرد إلى درجة حرارة 45 مْ بتركيز 2 مل / 100 مل وسط ، وبمعدل ثلاث مكررات وبعد تصلب الوسط الغذائي تم وضع قرص 0.5 ملم من العزلات الفطرية المستخدمة في الدراسة باستخدام ثاقب فليني في الوسط الممزوج مع المستخلص النباتي مع عمل مكررات معاملة السيطرة (بإضافة 2مل كحول اثيلي الى 100مل وسط الزرعي وصبه في اطباق , ولقحت بالفطريات) حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25±2 مْ ولمدة أسبوع (عند اكتمال نمو السيطرة) وتم قياس معدل قطر المستعمرة النامية وسجلت النتائج وحسبت النسبة المئوية للتثبيط والتي على اساسها اختيرت المستخلصات النباتية الاكثر فعالية وتثبيطا

3-8-3: : تنشيط الخميرة *S.cervisiae* واختبار فاعليتها في تثبيط نمو العزلات الفطرية

استعملت الخميرة *S. cervisiae* تركية المنشأ نميت على الوسط الزرعي Nutrient Yeast Dextrose Broth اذ تضمنت الطريقة اضافة واحد مل من عالق الخميرة المنماه على وسط NYDB السائل عمرثلاث أيام (من التخفيف السادس والثامن والعاشر) الى طبق بتري حاو على الوسط الزرعي PSA وتحريك الطبق بحركة رحوية لنشر عالق الخميرة ثم وضع قرص قطر 0.5 سم من مزرعة الفطر الممرض عمر سبعة ايام بمركز كل الطبق استعملت ثلاث اطباق لكل معاملة وتركت ثلاث أطباق من دون إضافة الخميرة كمقارنة. حضنت الأطباق (25±2 مº لمدة سبعة أيام) وتم حساب معدل نمو الفطريات الممرضة والنسبة المئوية للتثبيط. لاختيار افضل تركيز مثبط للفطريات (Al-Hamiri، 2016).

3-9 : أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (Palizin) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في المخزن

بعد إجراء الأختبارات المختبرية السابقة تم أنتخاب المبيد الأفضل تاثيراً من بين المبيدات ، وهو المبيد (Palizin) واكفأ مستخلصين نباتيين وهما ، مسخلص نبات الميرامية ومستخلص نبات الكزبرة والتخفيف السادس الفعال من الخميرة *S.cervisiae*. اختبر تأثير المستخلصين النباتين المستخدمة في الدراسة والخميرة S.cervisiae مع المبيد (Palizin) ضد نمو العزلات الفطرية وحماية ثمار الرمان من مهاجمتها، اذ تم تهيئة وتحضير العالق الفطري للعزلات الفطرية الأربعة وعالق الخميرة *S.cervisiae* والمستخلصات النباتية وتركيز المبيد الكيميائي كما مر بنا بالتجارب المختبرية السابقة. وبنفس الوقت تم تهيئة وتعقيم المخزن المبرد في كلية الزراعة/جامعه كربلاء، وتجهيزه بالوحدات التجريبية من الرمان السليم بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة وخمسة ثمار للمكرر الواحد. نفذت التجربة حسب المعاملات المذكورة في جدول (8) اذ تم تخديش (تجريح) ثمار الرمان ومعاملتها بجميع عوامل المكافحة كلا بشكل منفرد قبل عدوى ثمار الرمان بعالق العزلات الفطرية الممرضة بـ 24 ساعة ليتسنى لها الاستقرار على جميع سطح الثمار. وفي اليوم التالي تمت العدوى او التلقيح الصناعي لثمار الرمان بالعزلات الفطرية (واحد مل رشا من العالق الفطري/ ثمرة). اذ تركت ثلاث مكررات كمعاملة سيطرة بدون أي إضافة في كل مجموعة.

الجدول (8) المعاملات المطبقة على ثمار الرمان الملوثة بالفطريات الممرضة

ت	رمز المعاملة	وصف المعاملة المختبرة
1	Control	ثمار رمان مخدشه فقط بدون أي معاملة
2	(Path) only	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض فقط
3	(Path)+(ex.*S.o*)	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض + مستخلص الميرمية
4	(Path)+(ex.*C.s*)	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض + مستخلص الكزبرة
5	(Path)+(*Palizin*)	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض + المبيد الكيميائي (*Palizin*)
6	(Path)+(*S.cervi.*)	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض + (الخميرة *S.cervisiae*)

وبعد 21 يوم من تنفيذ التجربة حسبت النتائج , اذ تم حساب النسبة المئوية للإصابة والنسبة المئوية لشدة الإصابة لكل من العوامل المستخدمة ومقارنتها بمعاملة السيطرة والفطر الممرض فقط لتحديد افضل المعاملات المستخدمة .

مرحلة تخديش ثمار الرمان

مرحلة رش ثمار الرمان بعوامل التجربة

مرحلة إضافة اللقاح الفطري لكل من العزلات الأربع المنتخبة

الشكل(1):مراحل تنفيذ التجربة الخزنية لتقييم كفاءة المعاملات في تثبيط المسببات المرضية

3- 9: الكشف عن قابلية العزلات الفطرية الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان

بعد انتهاء التجربة الخزينة وتقييم دور عوامل المكافحة بالسيطرة على مهاجمة ثمار الرمان وتسببها بأمراض تعفن الثمار. اجري هذ الاختبار للكشف عن قابلية هذه العزلات المرضية على انتاج السموم الفطرية في معاملة الممرض فقط ومقارنتها مع دور عوامل المكافحة بالسيطرة على الممرضات وتثبيطها من انتاج السموم الفطرية بالمعاملات الأخرى .

3-9-1 : استخلاص السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A

سحقت حبوب ثمار الرمان بعد تجفيفها , والناتجة من معاملات التجربة الخزنية والمنمى عليها العزلات الفطرية الممرضة باستخدام مطحنة كهربائية للحصول على جزيئات دقيقة ومتجانسة ثم وزن 10 غم من مسحوق كُل عينة أُضيف إلى محلول الاستخلاص (ميثانول CH_4O : كلوريد البوتاسيوم KCL 4%) وبواقع (1:9) وبحجم 60 مل , يتجانس الخليط المتحصل عليه باستخدام هزاز كهربائي Shaker (45 دقيقة , 200 دورة في الدقيقة , بدرجة حرارة الغرفة) رشح الخليط بعد مرور 24 ساعة بورق ترشيح Watman no.2 (راشح أولي) أخذ منه 30 مل وخلط جيدًا مع 30 مل محلول كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ 30% , ثم رشح مرة أخرى بنفس الطريقة (Hackbart وآخرون،2012).

تمت تنقية المستخلص الاولي للسموم باستخدام عمود الكروماتوغرافي (50 cm × 12 mm) حُضر حسب الطريقة المتبعة من قبل (العكيلي، 2022) بتنشيط السليكا جل عن طريق التسخين في فرن كهربائي (130 °م , 45 دقيقة) وضعت في قاعدتهِ كرة من الصوف الزجاجي ثم أضيف 0.5 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) لإعطاء قاعدة متساوية لسيلكا جل بعد ذلك أضيف $CHCL_3$ حتى يصبح العمود نصف ممتلئ تقريبا ثم أضيف ببطء 2.0 غم سليكا جل مع غسل جوانب العمود بالكلوروفورم $CHCL_3$ حرك الخليط بقضيب زجاجي لإزالة فقاعات الهواء المتكونة ولِرص السليكا سُحب $CHCL_3$ إلى الأسفل وتركت مسافة 3 سم فوق السليكا جل لتفادي جفاف العمود بعد ذلك أضيف 0.5 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) وبهذا أصبح العمود جاهزًا للاستخدام.

أضيف المستخلص المُحضر سابقًا ووضع ببطء في العمود ثم جُمع الراشح الأخير في vials معتمة (25 mL) تم الفصل بإضافة 50 مل كلوروفورم $CHCL_3$ وضع المزيج في قمع الفصل ورج جيدًا مع مراعاة فتح الصمام بين فترة واخرى لتفريغ الغازات المتكونة وترك على الحامل ليتم الفصل أهملت الطبقة العليا وكررت العملية مرتين ثم مرر الراشح فوق 10 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4). تم تبخير المذيب بدرجة حرارة 50 °م وحفظ الراشح في Vilas معتمة (2.0 mL, بدرجة حرارة -20 °م) لحين اجراء الكشف النوعي والكمي (Hackbart وآخرون،2012).

2-9-3 : استخلاص السم الفطري (AOH) *Alternariol*

تم استخلاص السموم الفطرية للفطر *Alternariol Alternaria* في المختبر حسب الطريقة الموضحة من قبل Ntasiou واخرون (2015). اذ تم استخلاص السم الفطري (AOH) *Alternariol* من سحق 20 غم حبوب الرمان المتعفنة واستخلاصها بـ 100 مل من الأسيتونيتريل الذي يحتوي على 1٪ (حجم / حجم) حمض الأسيتيك و 7.5 مل من الماء البارد على التوالي. بواسطة هزاز لمدة اربعة دقائق. ، تمت إضافة لهذا المقدار 10 غرام من كلوريد الصوديوم، ثم تم رج الخليط لمدة ثلاث دقائق وطرد مركزي لمدة ستة دقائق عند 7500 دورة في الدقيقة. اخذ 40 مل من الطور العضوي العلوي إلى أنبوب يحتوي على اثنان غرام ethylamine (CH3CH2NH2) و ستة غم من مسحوق كبريتات المغنيسيوم اللامائي ، تم رج المستخلص لمدة دقيقتين ونبذ بالطرد المركزي عند 4000 دورة في الدقيقة لمدة خمسة دقائق. كان الحجم الناتج 25 مل من المادة الطافية يتركز حتى يجف باستخدام تيار النيتروجين عند درجة حرارة 30 درجة مئوية تم إعادة اذابتها في اثنان ملي لتر من الميثانول، وتم ترشيحها خلال 0.45 ميكرومتر (من مرشحات الملي بور) وأصبحت جاهزة لتحليلها بواسطة نظام HPLC

3-9-3 : الكشف النوعي والتقدير الكمي للسموم الفطرية *Aflatoxin* B1 و*Ochratoxin* A و*Alternariol* (AOH) بتقانة HPLC للعزلات الفطرية

أُجري التحليل الكروماتوغرافي في وزارة العلوم والتكنلوجيا / دائرة بحوث وتكنلوجيا البيئة والمياه باستخدام نظام كروموتوغرافي سائل عالي الأداء high performance liquid chromatographic (HPLC) (Germany,SYKAMN) مُقترن بـ RF-10A XL fluorescence detector , تم إجراء الفصل الكروماتوغرافي باستخدام عمود Phenomenex HPLC ذي الطور العكسي (C18,250mm x 4.6 mm, 5µm) مع الطور الناقل من الأسيتونيتريل : ماء : 2-بروبانول (30:65:5, v/v/v, ph 2.95) بمعدل جريان واحد1 مل/دقيقة -1 تم الاحتفاظ بدرجة حرارة العمود عند 25 درجة مئوية. كانت حالة الكشف عن التألق عند 330 nm للتوهج و500 nm للانبعاثات في تحليل Afla(Sari وآخرون،2020) أما ظروف تحليل OTA :باستخدام عمود طور المعكوس C18 (150mm × 4.6 mm, 3.5 µm) , كاشف الفلوريسنت : (FLD, exc=333 nm , em=460 nm ; gain=100) تمت تصفية العينة بمعدل الجريان 1 مل/دقيقة وكان حجم الحقن 10 ميكرولتر . الطور المتحرك عبارة عن خليط من أسيتونتريل/ماء/حامض أسيتيك (v/v/v , 2:99:99) وكانت درجة حرارة العمود 30 م˚ (Zou وآخرون,2022).

تم حساب التركيز من خلال المعادلة :

$$\text{C sam} = \frac{C\ st * A\ sam}{A\ st} * \frac{D.F}{Wt}$$

(تركيز العينة)*C sam = Concentration of sample

(تركيز المادة القياسية) C st = Concentration of standard

(مساحة العينة) A sam = sample area

(مساحة المادة القياسية) A st = standard area

(وزن العينة) Wt = weight of sample

(معامل التخفيف) D.F = dilution factor

3-10: أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في الحقل

بعد اجراء التجربة الخزنية لتقييم دور بعض عوامل المكافحة في السيطرة على المسببات المرضية من مهاجمة ثمار الرمان واصابتها بأمراض تعفن الثمار وتثبيط العزلات الفطرية من انتاج السموم الفطرية فيها تم تنفيذ التجربة الحقلية وهي تطابق جميع معاملات التجربة الخزنية (جدول 9) ولكن نفذت في احد حقول الرمان في قضاء الحسينية على أشجار الرمان بمراحل مبكرة من التزهير وعقد الثمار وعززت المعاملات بعد 14 يوم لضمان العدوى والمعاملات. وبعد ثلاثة اشهر سجلت النتائج بحساب النسبة المئوية للإصابة والنسبة المئوية لشدة الإصابة والنسبة المئوية للتثبيط.

الجدول (9) المعاملات المطبقة على ازهار الرمان الملوثة بالفطريات الممرضة بالحقل

ت	رمز المعاملة	وصف المعاملة المختبرة
1	Control	ازهار رمان فقط بدون أي معاملة
2	(Path) only	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض فقط
3	(Path)+(ex.*S.o*)	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض + مستخلص الميرمية(20%)
4	(Path)+(ex.*C.s*)	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض + مستخلص الكزبرة (20%)
5	(Path)+(*Palizin*)	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض + المبيد الكيميائي (*Palizin*)
6	(Path)+(*S.cervi.*)	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض + (الخميرة *S.cervisiae*)

الشكل (2): مراحل تنفيذ التجربة الحقلية على أشجار الرمان

3-10: التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية

استعمل التصميم تام التعشية Complete randomized design (CRD) لجميع التجارب التي اجريت تحت ظروف مسيطر عليها التجارب المختبرية وتجارب البيوت البلاستيكية، بينما تم تحليل التجارب الحقلية العاملية باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة وحللت البيانات Simple Randomized Compelete Block Design (RCBD) ببرنامج (Statistical Analysis System (SAS ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار اقل فرق معنوي .L.S.D. تحت مستوى معنوية 0.05.

4 :النتائج والمناقشة

4-1: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان

بينت نتائج العزل والتشخيص تلوث جميع العينات المأخوذة من ثمار الرمان المصابة (جدول 10) والتي تعود لخمسة مناطق مختلفة من محافظة كربلاء , وثلاث مناطق من محافظة بابل , بعزلات فطرية مختلفة بنسبة تلوث 100% اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 450 عزلة فطرية عائدة لعدد من لأجناس الفطرية كان أكثرها تلوثا هو الفطر*Aspergillus*.spp يليه الفطر *Penicillium* spp اما المرتبة الثالثة جاء الفطر *Alternaria* sp من الفطريات المنتجة للسموم الفطرية.

الجدول (10) الفطريات المعزولة من ثمار الرمان المصابة بمرض تعفن الثمار

ت	الفطريات المعزولة	محافظة كربلاء						محافظة بابل			مجموع العزلة الفطرية
		قضاء الحسينية	قضاء الهندية	عين التمر	قضاء المركز	قضاء الحر	سدة الهندية	المسيب	المشروع		
		KH	KT	KA	KC	KR	BH	BM	BS		
1	*Aspergillus.spp*	15	13	16	14	13	16	17	18		122
2	*A. niger*	12	14	12	0	15	14	12	16		95
3	*A. flavus*	2	4	0	0	5	9	0	1		21
4	*A.ochraceus*	2	0	3	1	3	3	0	0		12
5	*Aspergillus terreus*	2	0	0	2	0	1	0	0		5
6	*Alternaria.alternata*	3	0	2	8	0	0	2	0		15
7	*Penicillium spp*	13	12	7	12	12	9	11	8		84
8	*P.expansum*	1	0	3	0	0	2	0	0		6
9	*Botrytis* sp	0	0	2	2	0	6	0	2		12
10	*Rhizopus* sp	7	5	6	1	7	1	8	7		42
11	*Cladosporium*	3	3	1	1	0	3	0	0		11
12	*Fusarium* spp.	0	0	1	0	1	0	1	0		3
13	*Phoma* sp	0	0	0	1	0	0	1	0		2
14	*Colletotrichum*	0	0	2	2	0	0	1	0		5
15	*Mucor* spp	0	2	3	0	2	0	3	0		10
	المجموع	60	53	58	44	58	64	56	52		450

اتفقت هذه النتائج مع ما اشارااليه Munhuweyi واخرون (2016) بأن ثمار الرمان تتعرض لخطر المهاجمة من قبل العديد من الفطريات الممرضة مسببة الكثير من الامراض عند التخزين لفترات طويلة اذ يتعرض الرمان الى المهاجمة من مسببات الامراض المختلفة في مرحلة ما قبل او بعد الحصاد مما له تأثير كبير على جودة الفاكهة وعمر التخزين مما يؤدي الى تلف الانسجة وذلك يجعل الفاكهة غير قابلة للبيع . وفي دراسة أخرى اكد Ezra واخرون (2015) بان اهم المسببات التي تهاجم ثمار الرمان هي .*Aspergillus* spp، *A.alternata* ، *Penicillium* spp.، *Botrytis* spp، و*Rizopus* spp. وتم عزل أنواع فطرية أخرى في عينات قليلة فقط .في حين اشار Mincuzzi واخرون (2022) ان من اهم هذه المسببات هي *Alternaria alternata* ،وانواع من جنس *Aspergellus* اذ تسبب امراض مختلفة على ثمار الرمان في جميع انحاء العالم.من اهم هذه الامراض هو مرض التعفن الاسود في الرمان (القلب الاسود)

بينما أظهرت النتائج ان النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة (جدول 11) سجلت اعلى نسبة ظهور 100% بالنسبة للاجناس *Aspergillus*.sp و*Penicillium* spp بينما سجل النوع *A. niger* اعلى نسبة ظهور بلغت 87.5% تلاه النوعين *A. flavus* و*A.ochraceus* بلغت 62.5% لكليهم بينما بلغت النسبة المئوية لظهور الفطر*A. alternata* 50% بالنسبة للفطريات المنتجة للسموم الفطرية. في حين أظهرت نتائج النسبة المئوية لتردد الأنواع الفطرية تفوق النوع *A. niger* بنسبة تردد بلغت 21.35% تلاه النوع *A. flavus* بنسبة 4.72%. وتفوق النوع *Alternaria alternata* على الفطر *A.ochraceus* اذ بلغ 3.37% و2.70 على التوالي.

وقد اتفقت النتائج مع دراسة Kanetis واخرون (2015) إذ تم عزل وتشخيص 57 عزلة فطرية مختلفة مرتبطة بمرض تعفن ما قبل الحصاد لفاكهة الرمان في اليونان وقبرص، اذ كانت العوامل الرئيسية لعفن ما قبل الحصاد الفطر *Aspergillus* spp. تم عزله بنسبة تردد 36.8% و51% في اليونان وقبرص على التوالي، في حين تم عزل الفطر *Alternaria spp*. وبلغت نسبة التردد 29.5% و 38٪ على التوالي اما *Pilidiella. granati* و *Botrytis* spp. كانا المسببين الثالث والرابع الأكثر.

الجدول (11) النسبة المئوية لظهور وتردد الفطريات المعزولة من ثمار الرمان

ت	الفطريات المعزولة	مجموع العزلة الفطرية	النسبة المئوية للظهور	النسبة المئوية للتردد
1	*Aspergillus.spp*	122	100	27.42
2	*A. niger*	95	87.5	21.35
3	*A. flavus*	21	62.5	4.72
4	*A.ochraceus*	12	62.5	2.70
5	*Aspergillus terreus*	5	37.5	1.12
6	*Alternaria alternata*	15	50	3.37
7	*Penicillium spp*	84	100	18.88
8	*P.expansum*	6	37.5	1.35
9	*Botrytis spp*	12	50	2.70
10	*Rhizopus spp*	42	100	9.44
11	*Cladosporium spp*	11	62.5	2.47
12	*Fusarium spp.*	3	37.5	0.67
13	*Phoma spp*	2	25	0.45
14	*Colletotrichum spp*	5	37.5	1.12
15	*Mucor spp*	10	50	2.25

كما اكد Neamah واخرون (2020) ان المسببات المرضية الرئيسية لهذا المرض هي الانواع العائدة الى جنس *Aspergillus* والذي يعد من الفطريات المهمة الموجودة في جميع أنحاء العالم والموجودة في جميع الأنظمة البيئية. هناك أنواع مختلفة من *Aspergillus* تسبب امراض لثمار الرمان اهمها *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, , *Aspergillus* ochreacus إذ اشارات دراسة Jatoi واخرون (2020) بأن *Aspergillus niger* يسبب مرض تعفن ثمار الرمان ويعد أحد أهم أمراض ما بعد الحصاد والتي قد تسبب خسائر كبيرة في بعض الحالات تصل إلى 94٪ لمزارعي الرمان. في باكستان،

يظهر هذا المرض دائمًا كل عام في بساتين الرمان مما يتسبب في خسائر كبيرة في الإنتاج والجودة .

هناك دراسه تشير ان يتم مهاجمه معظم الثمار في البساتين بواسطة*A. alternata* وبسبب تلوث وتعفن الثمار هو أحد أمراض الرمان الرئيسية المهمة التي تنتج في جميع أنحاء العالم (yehia واخرون، 2013). بينما تم التاكيد بان *A.alternata* هو العامل الممرض الاكثر شيوعا وامراضية والمسبب عن تلف الرمان ماقبل وبعد الحصاد إذ تمت إحالة العزلات المعزولة من ثمار الرمان ذات الصفات المظهرية المختلفة والعائدة الى منطقتين إنتاجيتين رئيسيتين في جنوب إيطاليا، بوليا وصقلية، واضحت النتائج بأن على الرغم من التباين المورفولوجي والجيني لهذه العزلات ، فإن جميعها كانت مسببة للأمراض وتسببت في أعراض نموذجية لتعفن القلب في ثمار الرمان واكدت ان عزلات الفطر *A.alternata* المختلفة المسؤولة عن مرض تعفن القلب في الرمان في جنوب إيطاليا (Aloi واخرون، 2021).

2-4: الوصف المظهري لاهم العزلات الفطرية المرافقة لعينات الدراسة

بينت النتائج التشخيص المظهري للعزلات الفطرية المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان(الشكل3) استنادًا إلى الصفات المظهرية والمجهرية للمستعمرات الفطرية النامية على وسط PDA وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية والصفات المظهرية. اذ أظهرت العزلات وجود عدة فطريات مرافقة لثمار الرمان حيث شخصت عدة انواع تابعة للفطر *Aspergillus* spp والتي تمتلك صفات مظهرية مميزة ومتباينة بطبيعة نمو المستعمرات الفطرية ولون المستعمرة وكثافة الخيوط الفطرية النامية في الوسط الزرعي PDA وبدون إضافة المضادات الاحيائية ، اذ اظهرت نتائج التشخيص المظهري ظهور مستعمرات الفطر*A.niger* ناعمة أو صوفية قليلا كان النمو الأولي أبيض اللون وأصبح فيما بعد اسود أو بني داكن والكونيدات كروية خشنة مصبغة بشكل غامق الى الاسود .تكون الحوصلة كروية الشكل , بنية داكنة وخشنة الجدران اتفقت النتائج مع ما ذكره (Toma وآخرون، 2021)

تفيد أظهرت النتائج بأن الغزل الفطري لمجموعة من عزلات الفطر *A.flavus* كان سريع النمو بلون اخضر والذي يمثل كونيدات الفطر وحافة صفراء مخضرة تكون مسطحة اما في

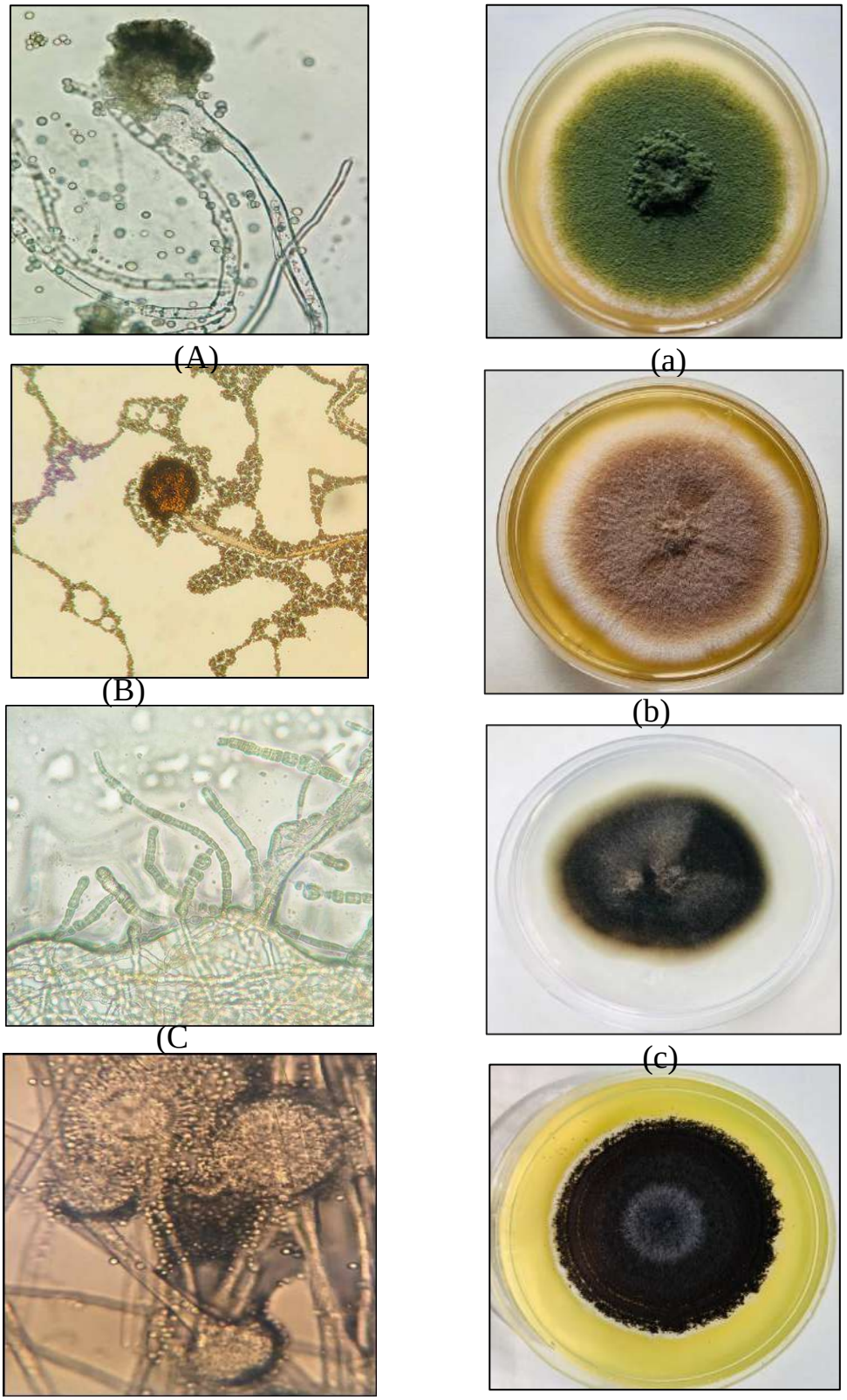
وسط المستعمرة يكون مرتفعا وبمرور الوقت تصبح المستعمرة داكنة (Amaike و Keller ،2011)

كان الغزل الفطري لعزلات الفطر *A.ochraceus* سريع النمو غالباً ما تبدو مستعمرة الفطر بلون اصفر ليموني إلى برتقالي واحيانا بلون وردي شاحب أو بنفسجي (Visagie واخرون ،2014)

وهذه النتائج تتفق مع العديد من الدراسات السابقة إذ اشار mateo وآخرون (2011) بأن انواعاً من فطر *Aspergillus* تنتشر وتنمو مستعمراتها بشكل سريع في المناطق الحارة أكثر من المناطق الباردة مثل الفطر *A.ochraceus* والفطر *A. flavus* وغيرها التي وتنمو بسرعة على الأوساط الغذائية الصناعية وتكون مستعمرات باشكال والوان مختلفة مميزة حسب النوع والتي على اساسها يسهل عملية تصنيفها الذي يعتمد به على الصفات المظهرية التي يمكن رؤيتها بالعين المجردة (samson وvarga، 2008).

كما ظهر الفطر *A.alternata* مستعمرة رمادية ومحاطة بحواف فاتحة والتي تتحول بتقدم العمر إلى مستعمرة ذات لون اسود او رمادي مسود وتحت المجهر يلاحظ تكون حوامل كونيدية قصيرة مقسمة بنية اللون تحمل الأبواغ الكونيدية كمثرية مقسمة طوليا وعرضيا بشكل مفرد أو سلاسل وتكون تصبغات سوداء بالجهة الخلفية للطبق . وقد يعزى اللون الأسود إلى افراز الفطر صبغة الميلانين ذات اللون الأسود(Kimura و Tsuge ،1993) وفي دراسة تم وصف شكل الجراثيم الكونيدية كمثري مع وجود تقسيمات عرضية وطولية والتقسيمات الطولية تكاد تتصل مع بعضها لتشكل خطأ عموديا متعرج قليلا(الحداد،2021). وتمتلك الجراثيم الكونيدية خلايا متعددة ذات انوية متعددة (Huang وآخرون،1996).

وتتوافق هذه النتائج مع دراسة أظهرت ان الفطر *A.alternata* عند الفحص المجهري وجد انه يكون مستعمرة رمادية فاتحة ومحاطة بحواف بيضاء التي تتحول بتقدم العمر إلى مستعمرة ذات لون أسود أو رمادي مسود، كون الفطر حوامل كونيدية قصيرة مقسمة بنية اللون تحمل الأبواغ الكونيدية بشكل مفرد أو سلاسل تتكون من 3-4 أبواغ في السلسلة، والأبواغ كبيرة الحجم عديدة الخلايا وقياس أبعادها 18.1-5.43×57.92-10.86 ميكرون فيها 0-3 حواجز طولية و1-8 حواجز عرضية، وعدد الخلايا من 17-2 خلية (Aljallad،2022).



الشكل (3): نماذج من مستعمرات اهم الفطريات المعزولة (A,a:Aspergillus *flavus*)
(B,b:A. *ochraceous*)(C,c:A.niger)(D,d:Alternaria.alternata)

اتفقت النتائج مع الكثير من الدراسات منها دراسة Bellaouchi واخرون (2021) التي تشير الى ان النمو المتميز للفطر *A. niger* يكون أبيض في البداية ، وسرعان ما يتحول إلى اللون الأسود . بينما اشار Mincuzzi واخرون (2023) الى امكانيه تنوع وتباين المستعمرات بالنسبة للفطر*Alternaria* في اللون (الأبيض، والبني، والأخضر العميق، و/أو الأسود) والملمس (المسطح، ورقيق، و/أو الصوفي) عند تعرضها لظروف بيئية مختلفة او تنميتها على أوساط زرعية مختلفة.

4-3: المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المدروسة

أظهرت النتائج تسجيل تباين كبير في المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية في أحداث مرض تعفن ثمار الرمان. اذ لوحظ وجود بعض الفروق المعنوية بين العزلات الفطرية المختبرة من حيث الضراوة المرضية فقد اظهرت أربع عزلات فطرية ضراوة مرضية عالية من بين 18 عزلة فطرية تم انتخابها على أساس معدلات التردد والظهور لعملية العزل والتشخيص اذ تم اختيار عزلة فطرية ممثلة لكل مجموعة عزلات النوع الواحد المعزولة من العينة نفسها المحددة ضمن أربع مجموعات من الفطريات (مجموعة *A.niger* و *A.flavus* و *A.ochraceous* و *A.alternata*).

اذ بينت النتائج بين العزلات الفطرية المختبرة والمعاملات المستعملة في طريقة التلقيح الصناعي (الحقن او التخديش) من حيث تأثيرها على النسبة المئوية لأحداث الاصابة لمرض تعفن ثمار الرمان. جدول (12) فقد تبين ظهور اربع عزلات فطرية كانت اكثر ضراوة بنسبة إصابة 100% ضمن معاملة التخديش وهي ***A.niger 4*** **(*KTAN*)** و ***A.flavus 1*** **(*KHAF*)** و ***A.ochraceous 2*** **(*KRAO*)** و***A.alternata 2*** **(*KCAA*)** بينما سجلت النسبة المئوية للإصابة في معاملة الحقن نسبة 100% لجميع العزلات الفطرية لذلك تم اعتماد طريقة التخديش في التلقيح الاصطناعي بالفطريات لثمار الرمان بالتجارب الخزنية اللاحقة.

تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي تشير ان الفطر *A.alternata* هو العامل الممرض الاكثر شيوعا وامراضية والمسبب عن تلف الرمان ما قبل وبعد الحصاد (Aloi واخرون،2021) ان العديد من أنواع الجنس *Alternaria* قادرة على إنتاج الانزيمات والسموم ، ونظرًا لقدرتها على النمو وإنتاج السموم في درجات حرارة منخفضة، فإنها يمكن أن

تكون ملوثات خطيرة للمواد الخام الزراعية والمحاصيل بعد الحصاد حتى في ظل ظروف التبريد. إذ اكدت الدراسات ان التفاوت بضراوة الفطريات باحداث المرض يعزى الى الاختلاف بالتركيب الوراثي للعزلات الفطرية والانزيمات المنتجة (Ezra واخرون، 2019).

الجدول (12) النسبة المئوية للإصابة في اختبار المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المنتخبة

ت	العزلة الفطرية	العينة المعزول منها	رمز العزلة الفطرية	% لنسبة الإصابة في معاملة الحقن	% لنسبة الإصابة في معاملة التخديش
1	***A.niger 1***	**KH**	***KHAN***	**100**	**80**
2	***A.niger 2***	**KR**	***KRAN***	**100**	**93.33**
3	***A.niger 3***	**KA**	***KAAN***	**100**	**86.66**
4	***A.niger 4***	**KT**	***KTAN***	**100**	**100**
5	***A.niger 5***	**BH**	***BHAN***	**100**	**73.33**
6	***A.niger 6***	**BS**	***BSAN***	**100**	**80**
7	***A.flavus 1***	**KH**	***KHAF***	**100**	**100**
8	***A.flavus 2***	**KR**	***KRAF***	**100**	**80**
9	***A.flavus 3***	**KT**	***KTAF***	**100**	**93.33**
10	***A.flavus 4***	**BH**	***BHAF***	**100**	**73.33**
11	***A.ochraceous 1***	**KH**	***KHAO***	**100**	**80**
12	***A.ochraceous 2***	**KR**	***KRAO***	**100**	**100**
13	***A.ochraceous 3***	**KA**	***KAAO***	**100**	**93.33**
14	***A.ochraceous 4***	**BH**	***BHAO***	**100**	**86.66**
15	***A.alternata 1***	**KH**	***KHAA***	**100**	**93.33**
16	***A.alternata 2***	**KC**	***KCAA***	**100**	**100**
17	***A.alternata 3***	**KA**	***KAAA***	**100**	**80**
18	***A.alternata 4***	**BM**	***BMAA***	**100**	**93.33**
L.S.D 0.05				**1.2524**	**1.3635**

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

فقد اكد Nouri واخرون (2020) ان هذه المسببات تهاجم الثمرة عن طريق إنتاج إنزيمات محللة للبشرة والجدار الخلوي ومركبات المقاومة لإزالة السموم الموجودة في انسجة جدار

الثمار يؤدي التفاعل المعزز بين العامل الممرض والمضيف إلى حدوث تغييرات في العمليات الفسيولوجية والكيميائية. في حين اكد Nallathambi وUmamaheswari (2009) ان الفطر *A. flavus* يقوم بإنتاج بعض الانزيمات لتحليل انسجة الثمار , فضلا عن انه يقوم بتخليق مجموعة من الأفلاتوكسينات في كل من وسط الاستزراع وفي ثمار الرمان المصابة بالإضافة إلى بعض المركبات الاخرى. إذ تم الكشف عن وجود الأفلاتوكسينات في ثمار الرمان المصابة بالفطر *A. flavus* .

وكذلك سجلت النتائج وجود الفروق المعنوية نفسها بين العزلات الفطرية المختبرة من حيث تأثيرها على النسبة المئوية لشدة الاصابة لمرض تعفن ثمار الرمان. جدول (13) فقد اظهرت العزلات الفطرية الأربع ضراوة عالية تمثلت بمعدلات شدة الإصابة بلغت 52% و 30% و26% و 24% على التوالي لمعاملة الحقن للعزلات و*A.alternata 2* (*KCAA*) و*A.niger 4* (*KTAN*) و*A.ochraceous 2* (*KRAO*) و *A.flavus 1* (*KHAF*) بينما سجلت النسبة المئوية لشدة الإصابة في معاملة التخديش نسبة العزلات الفطرية 44% و22% و20% و20% على التوالي للتسلسل السابق. إذ تم اختيار هذه العزلات الفطري الأربعة لاجراء التجارب اللاحقة تم انتخابها على أساس شدة ضراوتها واختلافها عن العزلات الأخرى.

وكذلك قد يعزى الاختلاف في قابلية الفطريات بأحداث المرض نتيجة الاختلاف درجات الحرارة والرطوبة العالية (Nargund واخرون، 2012).

الجدول (13) النسبة المئوية لشدة الإصابة في اختبار الامراضية للعزلات الفطرية المنتخبة

ت	العزلة الفطرية	العينة المعزول منها	رمز العزلة الفطرية	% لشده الإصابة في معاملة الحقن	% لشده الإصابة في معاملة التخديش
1	***A.niger 1***	**KH**	***KHAN***	**22**	**8**
2	***A.niger 2***	**KR**	***KRAN***	**19**	**17**
3	***A.niger 3***	**KA**	***KAAN***	**22**	**18**
4	***A.niger 4***	**KT**	***KTAN***	**30**	**22**
5	***A.niger 5***	**BH**	***BHAN***	**21**	**19**
6	***A.niger 6***	**BS**	***BSAN***	**20**	**18**
7	***A.flavus 1***	**KH**	***KHAF***	**24**	**20**
8	***A.flavus 2***	**KR**	***KRAF***	**20**	**18**
9	***A.flavus 3***	**KT**	***KTAF***	**17**	**15**
10	***A.flavus 4***	**BH**	***BHAF***	**20**	**16**
11	***A.ochraceous 1***	**KH**	***KHAO***	**22**	**14**
12	***A.ochraceous 2***	**KR**	***KRAO***	**26**	**20**
13	***A.ochraceous 3***	**KA**	***KAAO***	**15**	**12**
14	***A.ochraceous 4***	**BH**	***BHAO***	**20**	**7**
15	***A.alternata 1***	**KH**	***KHAA***	**18**	**16**
16	***A.alternata 2***	**KC**	***KCAA***	**52**	**44**
17	***A.alternata 3***	**KA**	***KAAA***	**20**	**26**
18	***A.alternata 4***	**BM**	***BMAA***	**22**	**14**
L.S.D 0.05				**0.5587**	**0.5676**

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

4-4: تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطريات المعزولة

اكدت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي لـ 4 عزلات فطرية التي تم عزلها من حالات تعفن ثمار الرمان المختلفة والتي أظهرت ضراوة شديدة في احداث مرض تعفن ثمار الرمان تحت ظروف مسيطر عليها، تشخيصها تحت انواع متباينة فقد اظهرت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي بان العزلات تعود الى الفطريات : *A.alternata* , *A.niger* , *A. flavus* , *A.ochraceus* . اذ تم تسجيل جميع العزلات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوي (NCBI) وتحت الرموز الخاصة المبينة ازاء كل منها في الجدول (14). اذ حققت التسلسلات النيوكليوتيدية الجزيئية اعلى نسبة تطابق تراوحت مابين 99.82 – 98.65 % مع المنطقة الجينية ITS عند مقارنتها مع التسلسلات النيوكليوتيدية المكافئة المسترجعة من بنك الجينات

في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) بأستخدام برنامج الـ (BLAST) ولكل عزلة فطرية بشكل منفرد. كما أُجريت التحاليل النيوكليوتيدية باستعمال برنامج (MEGA) لتحليل تتابع العزلات ورسم شجرة القرابة بين كل من هذه العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة بمركز (NCBI) حيث تم بناؤها من التسلسل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة ITS العائدة لكل من العزلات .

الجدول 14 : التشخيص الجزيئي لعزلات الفطريات المعزولة باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و GenBank Accession Number

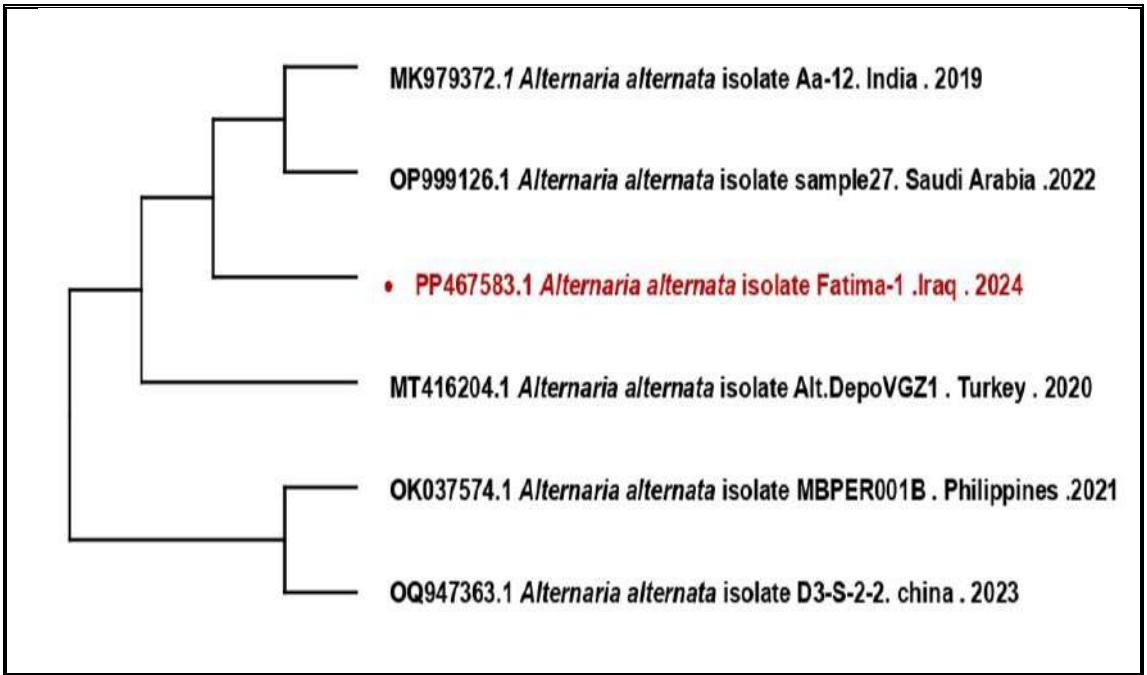
ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	Accession Number	رمز العزلات الفطرية
1	*Alternaria alternate*	*Isolate Fatima-1*	PP467583.1	*KCAA*
2	*Aspergillus flavus*	*Y.n.190.Fatima*	PQ034725	*KHAF*
3	*Aspergillus niger*	*Y.n.191.Fatima*	PQ034726	*KTAN*
4	*Aspergillus ochraceus*	*Y.n.192.Fatima*	PQ034727	*KRAO*

4-4-1: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.alternata Isolate Fatima-1* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية

لوحظ عن طريق مقارنة التتابعات النيوكلوتيدية لحزمة الحامض النووي للفطر *A.alternata Isolate Fatima-1* المعزول من ثمار الرمان مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابة الوراثي بلغت (99.82 – 99.46%) مع جميع عزلات الفطر *A.alternata* (جدول15). في حين أظهر الشكل (4) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة أظهرت تقارب وراثي كبير (نفس الانحدار الجيني) مع العزلتين السعودية والهندية المسجلة تحت ارقام إيداع (OP999126.1 و MK979372.1) على التوالي . في حين أظهرت تقارب مع العزلة التركية (MT416204.1) بانحدار جيني ثانوي . بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الفلبينية (OK037574.1) و والصينية (OQ947363.1) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 15: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.alternata Isolate Fatima-1* وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر نفسه المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	Accession Number	Sequence similarity	تأريخ التسجيل
1	*A.alternata*	Fatima-1	Iraq	PP467583.1	%100	2024
2	*A.alternata*	isolate Aa-12	India	MK979372.1	%99.82	2019
3	*A.alternata*	sample27	Saudi Arabia	OP999126.1	%99.64	2022
4	*A.alternata*	D3-S-2-2	China	OQ947363.1	%99.46	2023
5	*A.alternata*	Alt.DepoVGZ1	Turkey	MT416204.1	%99.46	2020
6	*A.alternata*	MBPER001B	Philippines	OK037574.1	%99.46	2021



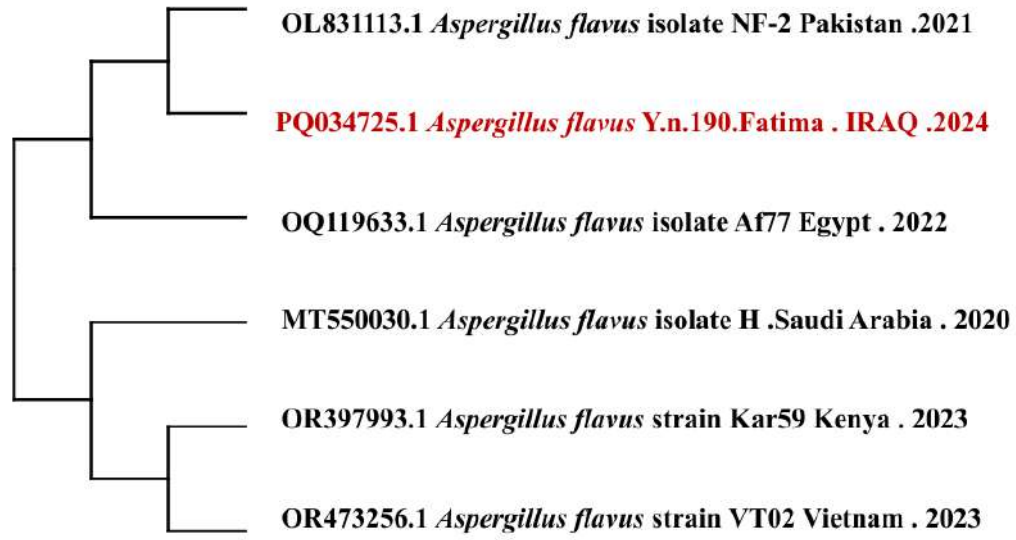
الشكل (4) الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.alternata Isolate Fatima-1*

4-4-2: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.flavus . Y.n.190.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية للفطر نفسه

لوحظ عن طريق مقارنة التتابعات النيوكلوتيدية لحزمة الحامض النووي للفطر *A.flavus . Y.n.190.Fatima* المعزول من ثمار الرمان مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.64 – 99.46%) مع جميع عزلات الفطر *A.flavus* (جدول16). في حين أظهر الشكل (5) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة أظهرت تقارب وراثي كبير (نفس الانحدار الجيني) مع العزل الباكستانية المسجلة تحت رقم الإيداع (**OL831113.1**). في حين أظهرت تقارب مع العزلة المصرية (**OQ119633.1**) بانحدار جيني ثانوي. بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الفيتنامية (**OR473256.1**) و الكينية (**OR397993.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 16: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.flavus . Y.n.190.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر نفسه المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	Accession Number	Sequence similarity	تأريخ التسجيل
1	***A.flavus***	***Y.n.190.Fatima***	**IRAQ**	**PQ034725**	**%100**	**2024**
2	***A.flavus***	**isolate NF-2**	**Pakistan**	**OL831113.1**	**%99.64**	**2021**
3	***A.flavus***	**isolate Af77**	**Egypt**	**OQ119633.1**	**%99.64**	**2022**
4	***A.flavus***	**Isolate H**	**Saudi Arabia**	**MT550030.1**	**%99.46**	**2020**
5	***A.flavus***	**strain VT02**	**Vietnam**	**OR473256.1**	**%99.46**	**2023**
6	***A.flavus***	**strain Kar59**	**Kenya**	**OR397993.1**	**%99.46**	**2023**



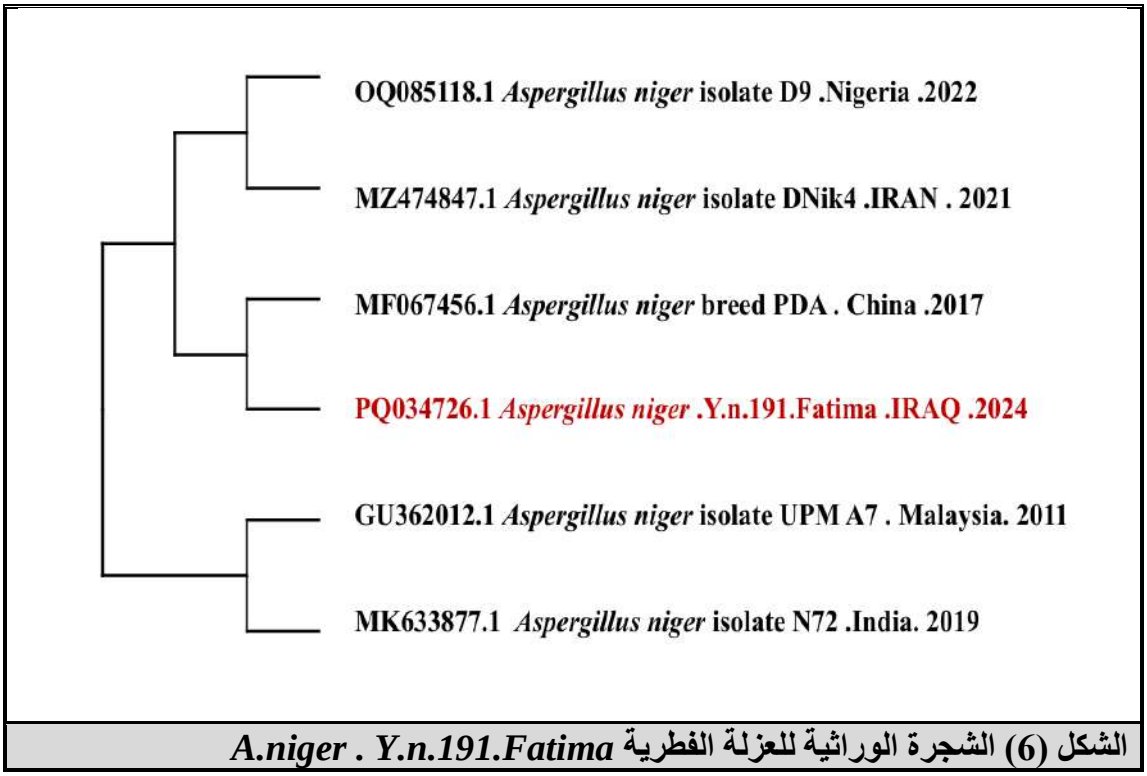
الشكل (5) الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.flavus . Y.n.190.Fatima*

3-4-4: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.niger . Y.n.191.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية للفطر نفسه

لوحظ عن طريق مقارنة التتابعات النيوكلوتيدية لحزمة الحامض النووي للفطر *A.niger . Y.n.191.Fatima* المعزول من ثمار الرمان مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.64 – 99.29%) مع جميع عزلات الفطر *A.niger* (جدول 17). في حين أظهر الشكل (6) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة أظهرت تقارب وراثي كبير (نفس الانحدار الجيني) مع العزل االصينية المسجلة تحت رقم الإيداع (**MF067456.1**) . في حين أظهرت تقارب ثانوي مع العزلتين الإيرانية (**MZ474847.1**) والنيجيرية (**OQ085118.1**) بانحدار جيني ثانوي . بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الهندية (**MK633877.1**) و الماليزية (**GU362012.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 17: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.niger . Y.n.191.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر نفسه المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	Accession Number	Sequence similarity	تأريخ التسجيل
1	*A.niger*	*Y.n.191.Fatima*	Iraq	PQ034726.1	%100	2024
2	*A.niger*	breed PDA	china	MF067456.1	%99.65	2017
3	*A.niger*	isolate DNik4	IRAN	MZ474847.1	%99.64	2021
4	*A.niger*	isolate D9	Nigeria	OQ085118.1	%99.29	2022
5	*A.niger*	isolate N72	India	MK633877.1	%99.46	2019
6	*A.niger*	isolate UPM A7	Malaysia	GU362012.1	%99.46	2011



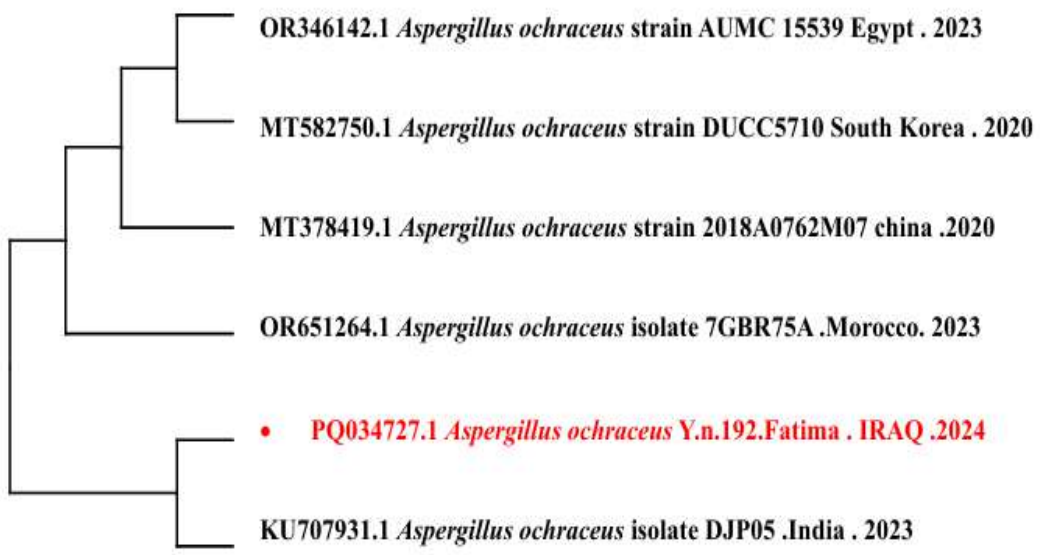
الشكل (6) الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.niger . Y.n.191.Fatima*

4-4-2: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية للفطر نفسه

لوحظ عن طريق مقارنة التتابعات النيوكلوتيدية لحزمة الحامض النووي للفطر ***A.ochraceus . Y.n.192.Fatima*** المعزول من ثمار الرمان مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.64 – 99.46%) مع جميع عزلات الفطر ***A.ochraceus*** (جدول18). في حين أظهر الشكل (7) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة أظهرت تقارب وراثي كبير (الانحدار الجيني نفسه) مع العزل الهندية المسجلة تحت رقم الإيداع (**KU707931.1**) في حين أظهرت تقارب ثانوي مع العزلة المغربية (**OR651264.1**) بانحدار جيني ثانوي. بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الكورية الجنوبية (**MT582750.1**) و المصرية (**OR346142.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 18: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	Accession Number	Sequence similarity	تأريخ التسجيل
1	*A.ochraceus*	*Y.n.192.Fatima*	Iraq	PQ034727.1	%100	2024
2	*A.ochraceus*	isolate DJP05	India	KU707931.1	%99.61	2016
3	*A.ochraceus*	strain DUCC5710	South Korea	MT582750.1	%98.65	2020
4	*A.ochraceus*	018A0762M07	china	MT378419.1	%98.65	2020
5	*A.ochraceus*	7GBR75A	Morocco	OR651264.1	%98.65	2023
6	*A.ochraceus*	AUMC 15539	Egypt	OR346142.1	%98.65	2023



الشكل (7) الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima*

استخدمت تقانة التشخيص الجزيئي بشكل واسع في العقود الأخيرة لتشخيص الفطريات وخاصة تلك الفطريات التي يصعب تشخيصها الى مستوى النوع وذلك لتقارب المظهري فيما بينها فضلاً عن عدم ثبات الصفات المظهرية نتيجة لتاثرها في البيئة، فقد استخدم التحليل النيوكليوتيدي للجين في تشخيص انواع الفطر *Aspergillus* sp بشكل كبير لصعوبة التشخيص المظهري (Alshehri وPalanisamy ، 2020).

إن التشخيص المعتمد على التركيب الوراثي يمتلك حساسية وتخصص عالي يصل إلى 100 % لتفسير النتائج والربط بين المجاميع المتقاربة وراثيا، وإن الطرائق التقليدية غير كفؤة في تميز الأنواع المتشابهة وراثياً فقد تصل حساسيتها وتخصصها إلى80 %، وبذا فإن كان هناك اختلاف في النمط المظهري لمجموعة الأنواع المنتمية إلى جنس واحد من الفطريات فالمحتوى الوراثي لهذه المجموعة يبقى متقاربا ولا يتغير إلا تحت ظروف معينة خلافا للنمط المظهري الخاضع لظروف بيئية معينة، ولذا يتوقع وجود اختلافات بين الأنواع المحددة بطرائق مختلفة (Pommerenke وآخرون، 2011).

أن المنطقة البينية المستنسخة (Internal Transcribed Spacer (ITS ما بين الجينات الرايبوسومية المحافظة خاصة الجين الرايبوسومي المحافظ rRNA أكثر ملاءمة

لتشخيص الأنواع والسلالات الفطرية وإمكانية دراسة العلاقة التطورية (Phylogenetic) للأنواع ذات الصلة الوثيقة والمتقاربة جـــــــــدا باستعمال هذة المنطقة (Rassin وآخرون، 2015) و ذكر Stool واخرون (2005) أن هذه المنطقة البينية (الفاصل) تقع بين جين s18 وجين 28 s rRNA ان فاصل ITS يقسم إلى فاصل 1 ITS والذي يفصل الجين الرايبوسومي المحافظ 18 s rRNA والجين5.8s ، وفاصل ITS2 الذي يفصل الجين 5.8 s rRNA و 28 S rRNA Tsang وأخرون(2016) لذا تعد المنطقة البينية (الفواصل) ITS محافظة بدرجة كبيرة نتيجة للقيود التطورية القليلة وبذلك فأنها تستعمل بنجاح في تمييز الأنواع ضمن الجنس الواحد للفطريات وأوضحوا إن تعاقبات ITS تقع بين الوحدات الثانوية الصغرى والكبرى من rDNA والفواصل غير المستنسخة Nontranscribed Spacer (NTS) التي تفصل بين مجموعات الجينات الرايبوسومية ذات التباين الكبير بين الأنواع على العكس من جينات rRNA التي تخضع لقيود تطورية وبذلك تكون أقل محافظة (Tsang، 2016).

4-5: تقييم كفاءة عدد من المستخلصات النباتية والمبيدات الكيميائية والعامل الاحيائي (الخميرة *S.cervisiae*) ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.

4-5-1: تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

بينت النتائج ان هناك وجود فروق معنوية بين جميع المستخلصات النباتية التي عملت على تثبيط نمو العزلتين الفطريتين بنسب مختلفة حيث أظهر في بعض المستخلصات فعالية تثبيطية عالية وصلت النسبة المئوية للتثبيط إلى 100 % جدول (19) و شكل (8) فقد أظهرت النتائج أن مستخلص الميرمية ومستخلص الكزبرة تفوق معنويا في منع الفطريات من النمو بشكل نهائي، اذ سجل أعلى نسبة مئوية للتثبيط 100% مقارنة بمعاملة الفطر الممرض 0.00% وتلتها المستخلصات الأخرى اذ سجل مستخلص الزعتر والقرنفل ثم السمسم والدارسين نسبة تثبيط عالية ضد نمو الفطريات بلغت 89% و83% و75% و72% على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة 0.00% اذ تم اختيار مستخلصي الميرمية والكزبرة كأفضل المستخلصات النباتية المستخدمة لاستعمالها في التجارب اللاحقة.

الجدول (19) **تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا**

ت	المعاملة	النسبة المئوية لتثبيط الفطريات الممرضة		معدل المعاملة
		A.alternata	***A.niger***	
1	الممرض+ مستخلص الميرمية	100	100	100
2	الممرض+ مستخلص الكزبرة	100	100	100
3	الممرض + مستخلص الزعتر	94.44	83.33	89
4	الممرض + مستخلص الدارسين	77.77	66.66	72
5	الممرض + مستخلص القرنفل	88.88	77.77	83
6	الممرض + مستخلص السمسم	83.33	66.66	75
7	الممرض+ كحول فقط (control)	0.00	0.00	0
L.S.D 0.05		الفطر	المعاملة	التداخل
		2.4995	2.3231	4.8226

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

اتفقت هذه النتائج مع دراسات سابقة بتقييم فعالية المستخلصات النباتية , فقد اشارت (محمد (2019) الى ان التركيز 20 ميكروليتر\مل للمستخلص الكحولي لنبات الكزبرة (*Coriandere sativaen*) كان أكثر فاعلية في تثبيط نمو الفطريات الممرضة المدروسة *A*, *Aspregillus* , *Alternaria* في دراسة أخرى تمت دراسة التأثير التثبيطي للمستخلصات الكحولية لنبات الميرمية (*Salvia officinalis*) اذ تم اختبار خمس تراكيز لكل نوع من هذه المستخلصات (5%، 10%، 15%، 20%، 25%) لتأثيرها في تثبيط النمو الفطري لأنواع من الفطريات الخيطية المعزولة من التربة (*Aspregillus niger, Alternaria alternata*) أظهرت النتائج أن لمستخلص الميرمية الكحولي تأثير مثبط لنمو الفطريات على الوسط الغذائي اكثر من المستخلص المائي (Abuaziza وAhamdi، 2023).

2-5-4: اختبار كفاءة بعض المبيدات ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

بينت النتائج ان المبيد الكيميائي ذو الاصل النباتي Palizin اظهر فرق معنوي من حيث التثبيط فقد اعطى أعلى معدل تثبيط للعزلات الفطرية الممرضة بنسبة 88.89% جدول (20) والشكل (8) بينما سجل المبيد Tondexir معدل تثبيط بلغ 79.62% مقارنة بمعاملة السيطرة 0.00%.

في حين بينت النتائج ان هناك فروق معنوية بين المبيدين من حيث تأثر الفطر*A.alternata* بالمبيدين فقد اظهر تفوقا معنويا في ازدياد معدل التأثر كان اعلى من معدل تأثر الفطر *A.niger*اذ بلغت 86.11% و82.40% على التوالي.

وان التركيز 0.3% للمبيد Palizin قد منع من نمو الفطريات بشكل نهائي فكانت النسبة المئوية للتثبيط 100% مقارنة بمعاملة الفطر الممرض 0.00%. كما اعطى المبيد *Tondexir* نسبة تثبيط عالية بلغت 94.44% و 88.88% لنفس التركيز وللفطرين *A.alternata* و *A.niger* على التوالي.

إذ اثبتت دراسات سابقة ان استخدام المبيدات الفطريات ذو الاصل النباتي .تعتبر طرق امنة وبديلة بمكافحة الفطريات التي تصيب المحاصيل بعد الحصاد (Mohd Zainudin واخرون،2024) ذكرت العديد من الدراسات ان لبعض المبيدات ذات الأصل النباتي سمية عالية لا تقل عن مثيلتها من المبيدات الكيمياوية المصنعة الا انها تتحلل سريعا الى مواد طبيعية غير سامة بعد استعمالها بفترة زمنية قصيرة كما انها لا تترك تأثيًرا سلبيًا على البيئة (Kabiri و Amiri-Besheli،2012)

الجدول (20) اختبار كفاءة المبيدين Palizin و Tondexir ضد نمو العزلات الفطرية

المبيد	التركيز	النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر		معدل تأثير التركيز	معدل تأثير المبيد
		A.alternata	*A.niger*		
Palizin	%00	0.00	0.00	0.00	88.89
	%0.1	83.33	77.77	80.55	
	%0.2	88.88	83.33	86.11	
	%0.3	100.00	100.00	100.00	
Tondexir	%00	0.00	0.00	%0.00	79.62
	%0.1	66.66	66.66	66.66	
	%0.2	83.33	77.77	80.55	
	%0.3	94.44	88.88	91.66	
معدل تأثير الفطر		86.11	82.40		
L.S.D 0.05		المبيد	التركيز	الفطر	التداخل
		3.5653	2.2524	2.1154	7.9331

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

3-5-4: اختبار كفاءة الخميرة *S. cervisiae* ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

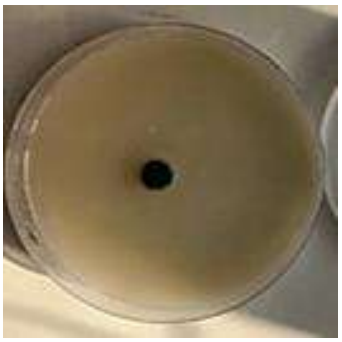
بينت النتائج ان **الخميرة *S. cervisiae*** اعطت معدل تثبيط عالي ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة وبمعدل 97 % مقارنة بمعاملة السيطرة 0.00% جدول (21) والشكل (8). في حين بينت التنائج وجود فرق معنوي من حيث تأثر الفطر *A.alternata* بتراكيز الخميرة المختلفة كان اعلى من معدل تأثر الفطر*A.niger* اذ بلغت 91% و 85% على التوالي. بينما اظهر التخفيف السادس من عالق الخميرة تفوق معنوي من حيث المقدرة على منع نمو عزلة الفطر *A.alternata* بشكل نهائي فكانت النسبة المئوية للتثبيط 100% مقارنة بمعاملة الفطر الممرض *A.niger* 94.44%.

بينما التخفيف الثامن والعاشر سجلا نسب تثبيط متباينة بمعدل 86% و81% على التوالي . لذلك تم اختيار التخفيف السادس لتطبيقة بالتجارب اللاحقة .

جدول (21) اختبار كفاءة الخميرة *S. cervisiae* ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

المعاملة	التخفيف	النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر		معدل تأثير التخفيف	معدل التأثير
		A.alternata	*A.niger*		
S. cervisiae + *الممرض*	$1*10^{-6}$	100	94.44	97	88
	$1*10^{-8}$	88.88	83.33	86	
	$1*10^{-10}$	83.33	77.77	81	
(control) الممرض فقط		0.0	0.0	0.0	0.0
معدل تأثير الفطر		91	85		
L.S.D 0.05		المعاملة	التركيز	الفطر	التداخل
		1.8589	1.5571	1.8589	5.2749

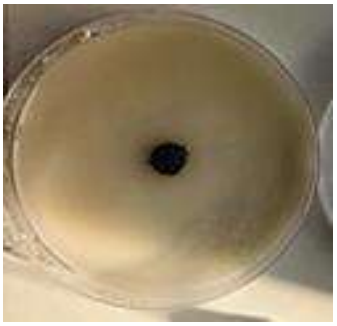
Aspergillus فقط (control)



Aspergillus + الخميرة *S.cervisiae*

Alternaria فقط (control)

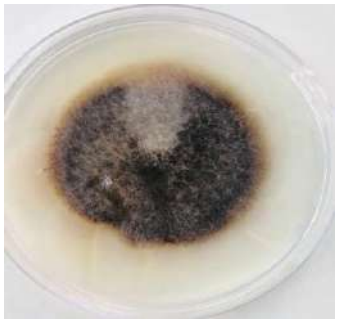
Aspergillus + مستخلص الميرمية



Alternaria + الخميرة *S.cervisiae*

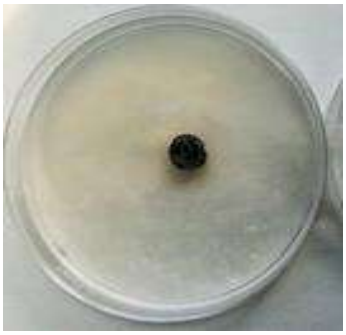
Alternaria + مستخلص الميرمية

Aspergillus + مستخلص الكزبرة



Alternaria + ايثانول (control)

Alternaria + مستخلص الكزبرة



Aspergillus + المبيد *Palizin*

Aspergillus + ايثانول (control)

Alternaria + المبيد *Palizin*

الشكل (8) نماذج لأفضل معاملات التضاد المستخدمة ضد *Alternaria sp* و *Aspergillus sp* مختبريا

4-6: أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في المخزن

تبينت نتائج اجراء هذه التجربة التي نفذت لتقييم فعالية المبيد (Palizin) و مستخلصي نبات الميرامية نبات الكزبرة والتخفيف السادس من عالق الخميرة *S.cervisiae*. في تثبيط مهاجمة الفطريات الممرضة في احداث الإصابة بمرض تعفن ثمار الرمان. ان جميع هذه العوامل خفضت من النسبة المئوية لاحداث الإصابة وكذلك تثبيط من شدة الإصابة مقارنة بمعاملة السيطرة (معاملة الممرض فقط).

اذ بينت نتائج حساب النسبة المئوية لحدوث المرض بعد 21 يوم من تنفيذ التجربة بان مستخلص الكزبرة قد تفوق معنوياً بخفض نسبة الإصابة الى 73% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 100% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من احداث الإصابة بلغ 27% (جدول 22) تلتها المعاملة بالمبيد ذو الأصل النباتي Palizin بخفض النسبة المئوية لحدوث المرض بمعدل 78% وبمعدل تثبيط بلغ 22%. في حين جاءت معاملتي مستخلص نبات الميرمية والعامل الحيوي (الخميرة *S.cervisiae*) أخيرا , بمعدل خفض لنسبة احداث الإصابة بلغت 80% و82% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 20% و18% مقارنة بمعاملة السيطرة.

اما ما يتعلق بكفاءة او مقدرة العزلات الفطرية المختبرة على مقاومة عوامل المكافحة المستخدمة واحداث المرض فقد أظهرت العزلة *A.alternate* اعلى معدل للمقاومة ضد هذه العوامل وسجلت اعلى نسبة مئوية لاحداث الإصابة بلغت 88% , يليه الفطر *A.niger* بمعدل نسبة إصابة بلغت 82% مقارنة بمعاملة السيطرة 100% بينما سجل الفطرين *A.flavus* و *A.ochraceous* معدل نسبة إصابة بلغت 79% لكليهما.

الجدول(22) تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن

المعاملة	النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالفطريات الممرضة				معدل المعاملة	% للتثبيط
	A.alternate	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*		
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0	-----
(Path)only	100	100	100	100	100	0.00
(Path)+(*S.cervi.*)	93.33	80	73.33	80	82	18
(Path)+(*Palizin*)	86.66	86.66	73.33	66.66	78	22
(Path)+(ex.*S.o*)	80	86.66	80	73.33	80	20
(Path)+(ex.*C.s*)	80	73.33	66.66	73.33	73	27
معدل % لحدوث اصابة الفطر	88	85	79	79		
L.S.D 0.05	المعاملة		الفطر		التداخل	
	1.9958		2.5756		4.5714	

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

كذلك اظهرت نتائج حساب النسبة المئوية لشدة الاصابة بعد 21 يوم من تنفيذ التجربة ان مستخلص الكزبرة قد تفوق وبفارق معنوي كبير بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة الى 8.06% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 25.88% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من شدة احداث الإصابة بلغ 68.85% (جدول 23 والشكل9 , 10 , 12, 11) تلتها المعاملة بمستخلص نبات الميرمية بخفض النسبة المئوية لشدة حدوث الاصابة بمعدل 9.98% وبمعدل تثبيط بلغ 61.43% . في حين جاءت معاملتي المبيد ذو الأصل النباتي Palizin والعامل الحيوي (خميرة *S.cervisiae*) أخيرا بمعدل خفض لنسبة شدة احداث الإصابة بلغت 10.04% و11.06% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 61.20% و57.26% مقارنة بمعاملة السيطرة.

اما بخصوص بكفاءة او مقدرة العزلات الفطرية المختبرة على مقاومة عوامل المكافحة المستخدمة واحداث شدة الإصابة فقد أظهرت العزلة *A.alternate* اعلى معدل للمقاومة ضد هذه العوامل وسجلت اعلى معدل للنسبة المئوية لشدة الإصابة بلغت

17.36% , يليه الفطر *A.niger* بمعدل شدة إصابة بلغت 12.89 % مقارنة بمعاملة السيطرة 25.00% بينما سجل الفطر *A.flavus* 11.17% والفطر *A.ochraceous* 10.59% معدل لنسبة شدة الإصابة.

الجدول(23) تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لشدة الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن

المعاملة	النسبة المئوية لشدة الإصابة بالفطريات الممرضة				معدل المعاملة	% للتثبيط
	A.alternate	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*		
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0	-----
(Path)only	40.26	23.23	21.66	18.40	25.88	0.00
(Path)+(*S.cervi.*)	13.66	10.73	9.80	10.06	11.06	57.26
(Path)+(*Palizin*)	12.46	11.86	7.73	8.13	10.04	61.20
(Path)+(ex.*S.o*)	11.26	10.13	9.13	9.40	9.98	61.43
(Path)+(ex.*C.s*)	9.20	8.53	7.53	7.00	8.06	68.85
معدل % لشدة اصابة الفطر	17.36	12.89	11.17	10.59		
L.S.D 0.05	المعاملة		الفطر		التداخل	
	2.016		1.8032		4.032	

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

هناك العديد من الدراسات تتفق على ان المستخلصات النباتية تعمل على الحد من نمو العديد من الفطريات وبالتالي تقلل من نسب الاصابة والتلوث (Cowan ، 1999) ان المستخلص الكحولي لبذور الكزبره يعتبرمصدر محتمل للمكونات النشطة بيولوجيًا وتطبيقاته كعامل مضاد للفطريات (Sumalan واخرون، 2019) فقد أظهر مستخلص نبات الكزبرة تثبيطًا بنسبة 100% لنمو الفطريات *A. terreus* و*A. niger* و*F. graminearum* و*F. Oxysporum*. (Singh,واخرون ,2006) . وفي دراسة عن التأثيرات المثبطة للزيوت الأساسية لنبات المريمية (Salvia officinalis) والكزبرة (Coriandrum sativum) على نمو الفطريات وتبين نتيجة هذا البحث أن وجود المستخلصات سيكون السبب الرئيسي في تقليل نمو الفطريات كمثل اجناس *Aspergillus* منها *A.flavus* و*A.fumigatus* ، *A.ochraceus*

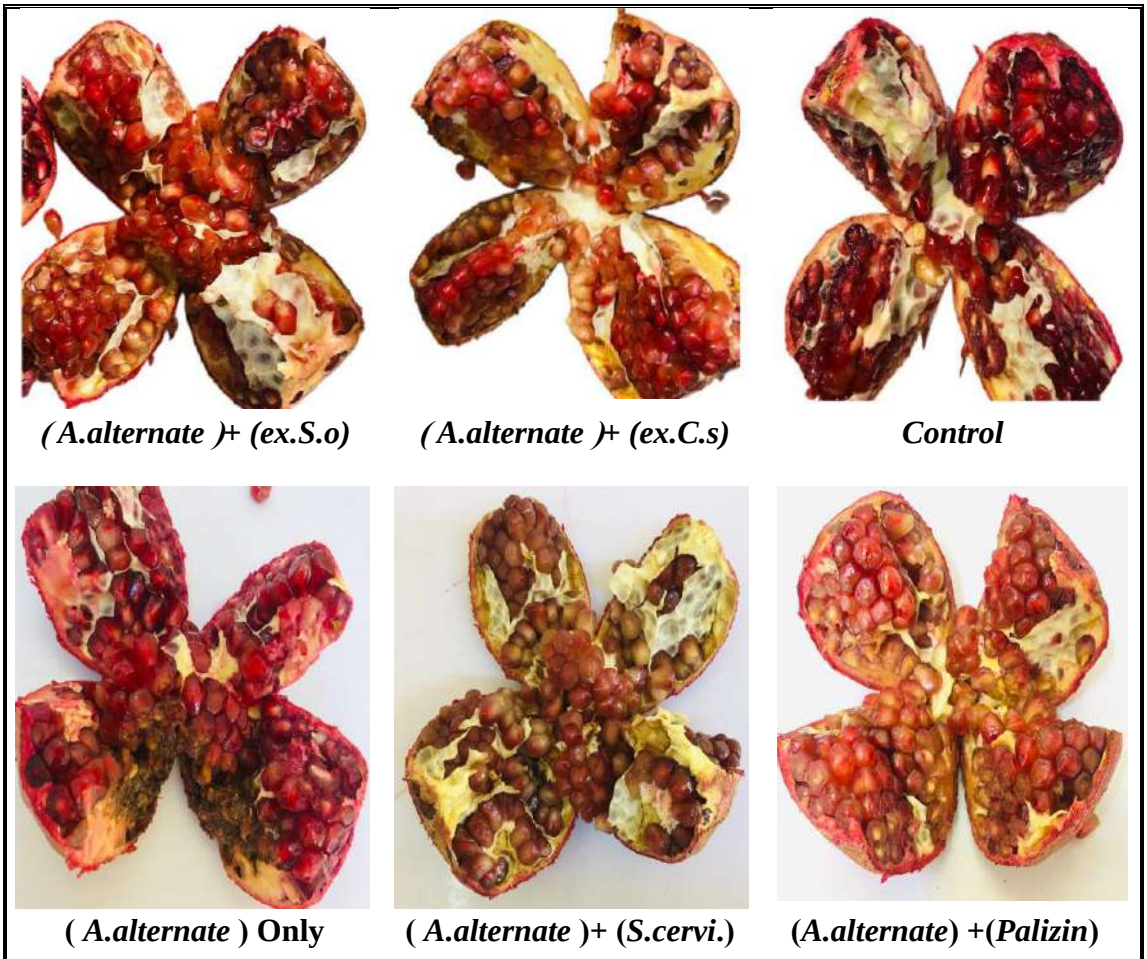
(Yahyaabadi واخرون،2011). بينما تم التأكد من فعالية مستخلص الكزبرة في مكافحة *A.alternaria* (KURKINA اخرون) وقد وجد أن جميع الزيوت العطرية المدروسة لها خصائص مضادة للفطريات، ويمكن أيضًا استخدام زيت المريمية العطري ذو التأثير المتوسط للفطريات، (Dellavalle واخرون، 2011).

اختبر النشاط المضاد للفطريات للمستخلصات النباتية الخام وتخفيفاتها الخاصة من النباتات الطبية ضد *Alternaria sp*. إذ اعطى مستخلص الميرمية *S. officinalis* ، نشاطًا مضادًا للفطريات في المختبر، مع قيم تثبيط تزيد عن 90%. (Rashidi واخرون,2011) بينما سجل مستخلص الميرمية نسبة تثبيط مقاربة لاجناس الفطر Aspergillus, *A.flavus,A.niger*, *A.ochreacus*, والتي تعتبر من الانواع الاكثر مقاومة. في حين اكدت دراسة Lima واخرون (2016) سيكون هناك أمل في المستقبل، من خلال استخدام المواد الفعالة من النباتات للوصول إلى تأثيرات مقبولة مع عدم وجود آثار جانبية ومضاعفات لعلاج الأمراض.

وقد اثبت ان السبب في فاعلية الخميرة *S.cerevisiae* في تثبيط العديد من الفطريات إلى سرعة نموها ومنافستها على المكان والغذاء أوبسبب تطفلها على الفطر الممرض فهي آليات مقترحة لفعل الخمائر كعوامل مكافحة احيائية (El-Nady وShalaby ، 2008) إذ اكد Persons واخرون (2013) أن التركيزات المرتفعة من *S. cerevisiae* تكون فعالة اكثر في تثبيط نمو أنواع الفطر *Aspergillus* في جميع درجات الحرارة، ولكن تأثيراتها تكون أكثر وضوحًا عند 22 درجة مئوية. تشمل الآثار الأوسع لهذه الدراسة إمكانية استخدام S. cerevisiae كعامل تحكم بيولوجي لحماية المنتجات الزراعية التي يستهلكها البشر عادةً من السموم الفطرية التي تنتجها *A.flavus* و*A.parasiticus* . وكذلك اشارات دراسات اخرى الى لتقييم الخصائص المضادة للخميرة. اذ تم تحديد إنتاج الإنزيمات الخارجية المحللة بواسطة سلالات الخميرة. في تجارب البيوت البلاستيكية تم تقييم قدرة سلالات الخميرة على استعمار سطح أوراق البطاطا وتقليل أعراض الفطر *Alternaria* على النباتات. قامت سلالة *Saccharomyces cerevisiae* بتثبيط نمو فطريات *Alternaria* وخفضت بشكل أكثر فعالية أعراض *Alternaria* على النباتات الملقحة (من حوالي 60٪ إلى 90٪ لـ *A. solani* و لـ*A. alternata*) بعد سبعة أيام. أنتجت هذه السلالة الإنزيمات المثبطة ، مثل الأميليز والبكتيناز

والبروتياز. بعد 18 يومًا وهي واعدة لمزيد من الاختبارات الميدانية (Kowalska واخرون، 2022)

إذ اثبتت دراسات سابقة ان استخدام مبيدات الفطريات الكيميائية ذو الاصل النباتي .تعتبر طرق امنة وبديلة بمكافحة الفطريات التي اصيب المحاصيل بعد الحصاد (Mohd Zainudin واخرون، 2024) ان المبيدات ذات الأصل النباتي (Palizin) كبدائل للمواد الكيميائية والتي تكون الاقل سمية للإنسان وحيواناته وذات تأثير قاتل وطارد للآفات المخزنية (عمران، 2021)



الشكل(9) نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.alternate* في المخزن

(A.niger)+ (ex.S.o)

(A.niger)+ (ex.C.s)

Control

(*A.niger*) Only

(*A.niger*)+ (*S.cervi.*)

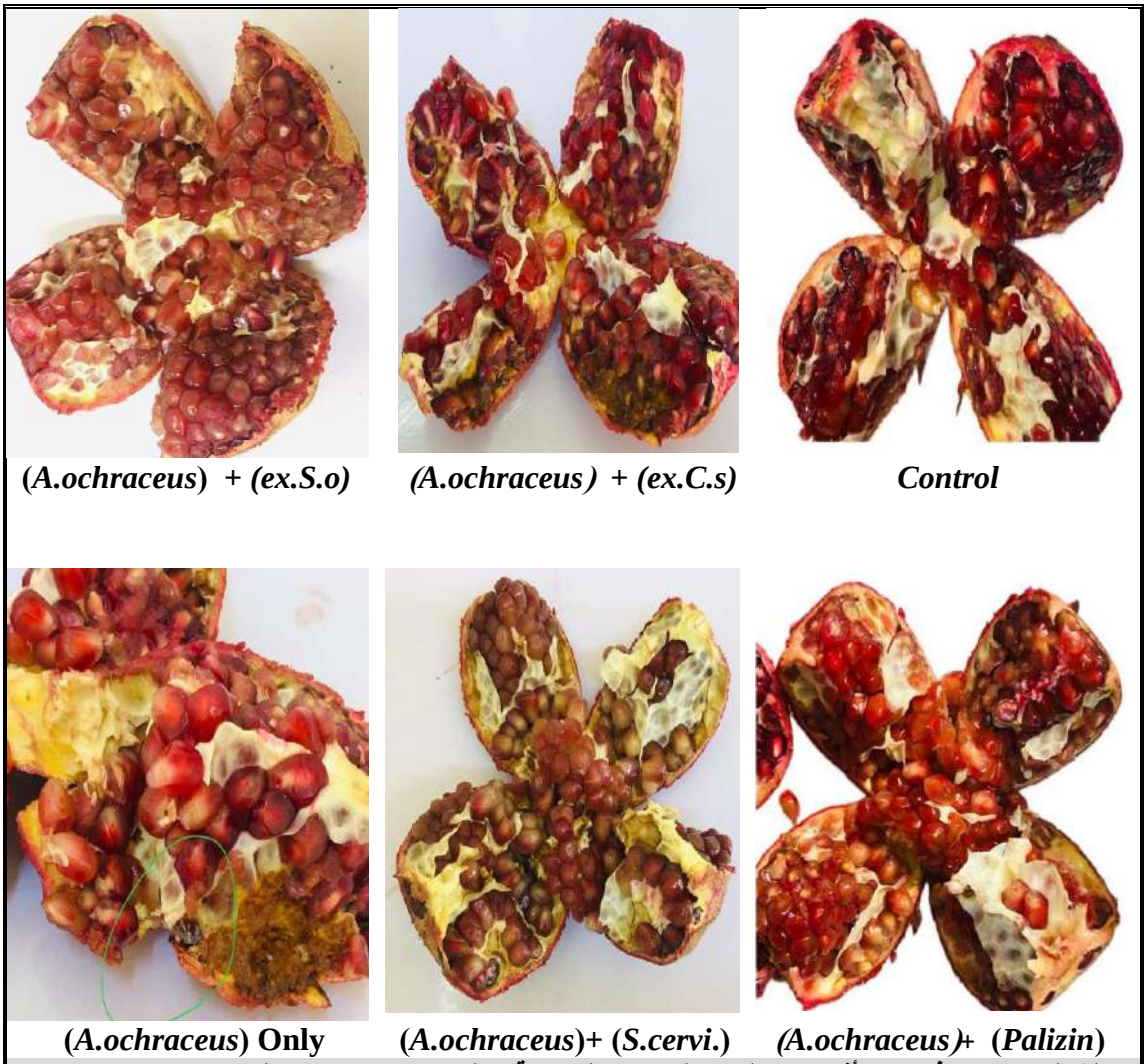
(*A.niger*) +(*Palizin*)

الشكل(10) :نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.niger* في المخزن

(*A.flavus*) + (*ex.S.o*) (*A.flavus*) + (*ex.C.s*) *Control*

(*A.flavus*) Only (*A.flavus*)+ (*S.cervi.*) (*A.flavus*) +(*Palizin*)

الشكل(11): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.flavus* في المخزن



الشكل(12): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.ochraceus* في المخزن

4-7: الكشف عن قابلية الفطريات الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان ودور عامل المكافحة في السيطرة على انتاجها في المخزن

بينت نتائج هذا الاختبار تلوث العديد من ثمار الرمان بالسموم الفطرية , اذ اجري هذا الكشف على نفس نتاج التجربة الخزنية التي نفذت لتقييم فعالية عدد من عوامل المكافحة في تثبيط مهاجمة الفطريات الممرضة في احداث مرض تعفن ثمار الرمان. تم الكشف عن انتاج السموم الفطري في معاملتي الفطر الممرض فقط ومعاملة

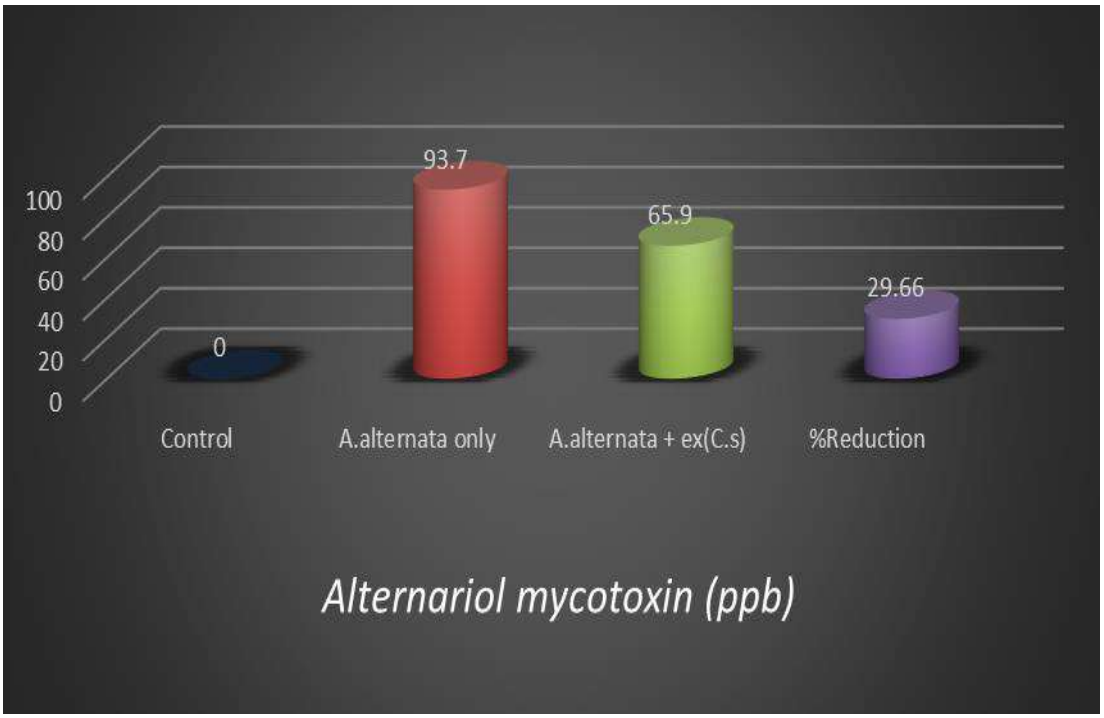
السيطرة بدون فطر للمقارنة مع معاملة افضل عامل مكافحة في تثبيط الإصابة وهو مستخلص الكزبرة لتقييم دورة في منع الفطريات من انتاج السموم الفطرية .

أظهرت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC مقدرة جميع العزلات الفطرية الاربع المختبرة (*A.alternate* و*A.niger* و*A.flavus* و*A.ochraceous*) على انتاج مجموعة سموم فطرية مختلفة الأنواع تضمنت (*Aflatoxin* B1 و *Ochratoxin A* و *Alternariol*) وبمستويات انتاجية مختلفة تراوحت بين عالية الإنتاجية ومنخفضة الإنتاجية .

1-7-4: الكشف عن قابلية الفطر *A.alternate* على انتاج السم الفطري *Alternariol* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن

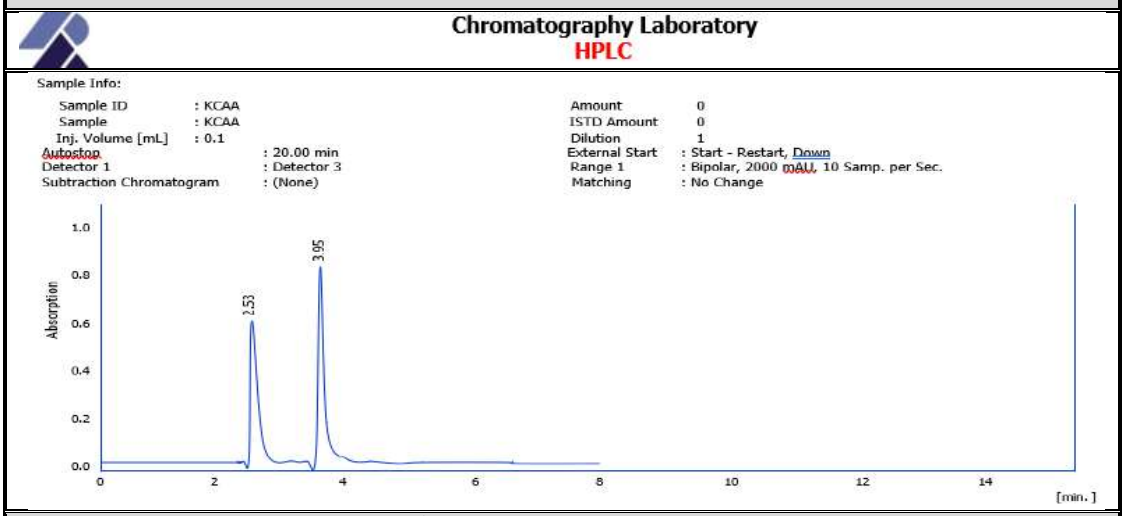
بينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 24 وشكل 13 وشكل 14) بان العزلة الفطرية *A.alternate* ذات الرمز (*KCAA*) والمعزولة من ثمار الرمان المصابة والمجموعة من قضاء المركز لمحافظة كربلاء , أظهرت مقدرة عالية على أنتاج السم الفطري *Alternariol* في ثمار الرمان المخزونة (فترة 21 يوم) وبمستويات مرتفعة بلغت 93.7 ميكروغرام/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة (ثمار غير معاملة بالممرض) بلغت 0.00%

بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة الكحولي أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وخفض نسبة وشدة الإصابة . وهذا ما سبب باختزال جزئي لمستويات انتاج السم *Alternariol* , فبلغت النسبة المئوية لاختزال السم الى 29.66% . اذ تمكنت العزلة الفطرية *A.alternate* من مقاومة تأثير المستخلص النباتي وإنتاج السم الفطري *Alternariol* بمعدل 65.9 ميكروغرام / كغم

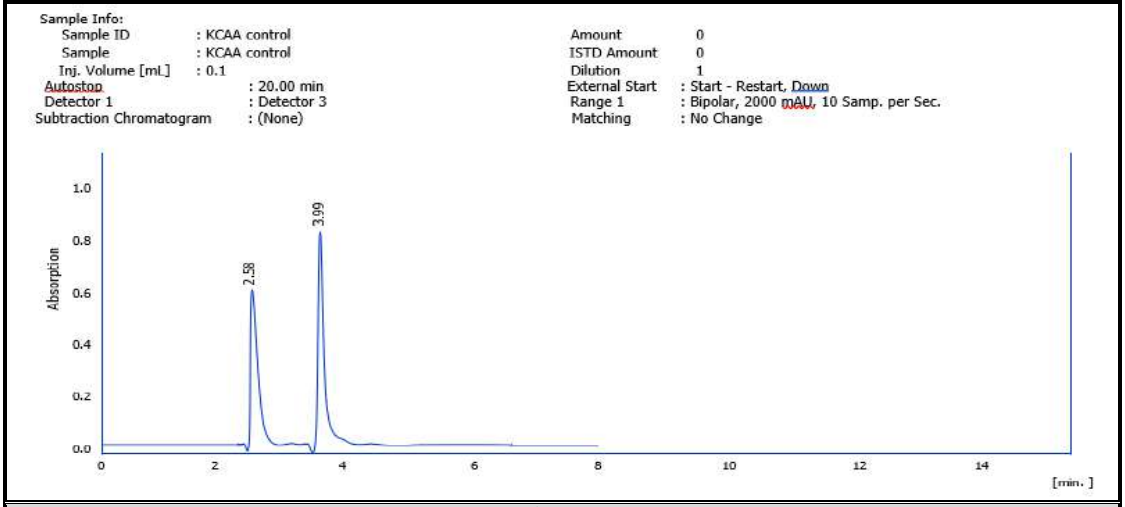


الشكل (13) تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.alternate* في انتاج سم *Alternariol*

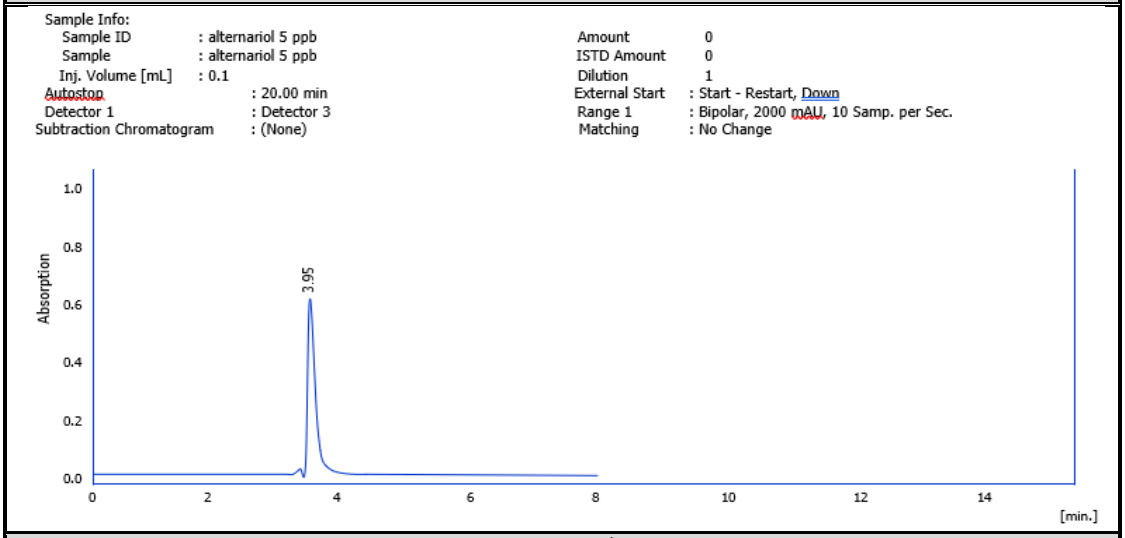
وتأتي هذه النتائج متفقة مع ما اشار اليه Solhaug واخرون(2016) من ان اغلب عزلات الفطر*A.alternate* لها القدر ة على انتاج السم الفطري AOH وتحت مختلف الظروف وعلى اغلب عوائله النباتية وهذا ما تم ملاحظته فعلا حيث لوحظ ان جميع عزلات الفطر *A.alternata* كان لها القدرة على انتاج سم الالترناريول AOH (Barkai، 2008).اتفقت هذه النتائج مع الدراسات السابقة والتي تشير سموم *Alternariol* من السموم الرئيسة والاكثر انتشاراً في ثمار الرمان ذات تأثيرات مهمة وسلبية محتملة على الانسان عند تناول الفاكهة او الغذاء الملوث المنتج الرئيسي لها هو *Alternaria alternate*. (Bacha واخرون، 2023) اكدت بينما اكدت دراسة عن إمكانات مستخلص الكزبرة الأساسي كعامل مضاد للفطريات *Alternaria alternate* وتخليق سم *Alternariol* . (Sumalan واخرون، 2019)



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري *Alternariol* المنتج من العزلة *A.alternate* في ثمار الرمان



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري *Alternariol* المنتج من العزلة *A.alternate* ودور مستخلص الكزبرة في اختزاله



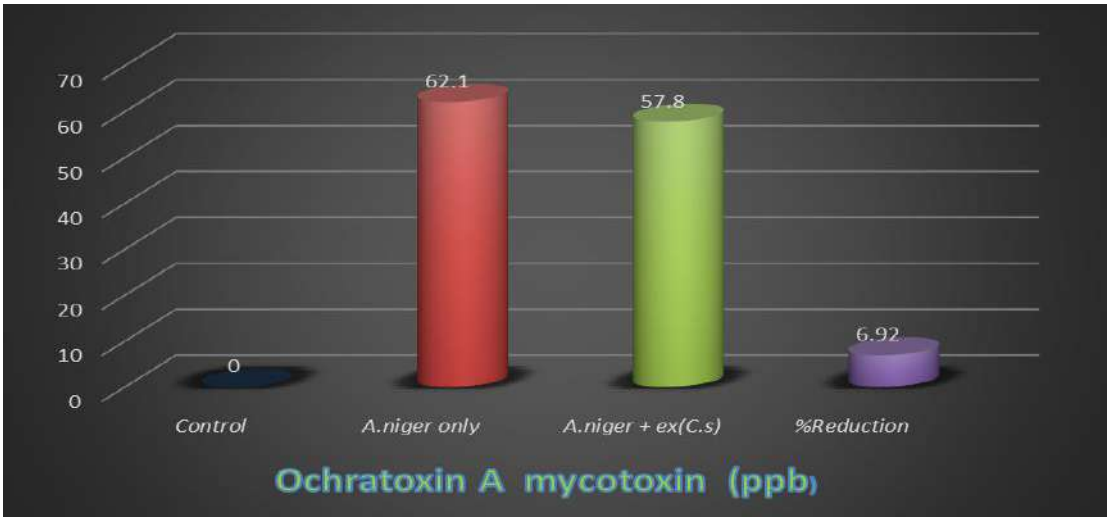
تقدير المادة القياسية للسم الفطري *Alternariol*

الشكل (14): الكشف عن قابلية الفطر *A.alternate* على انتاج السم الفطري *Alternariol*

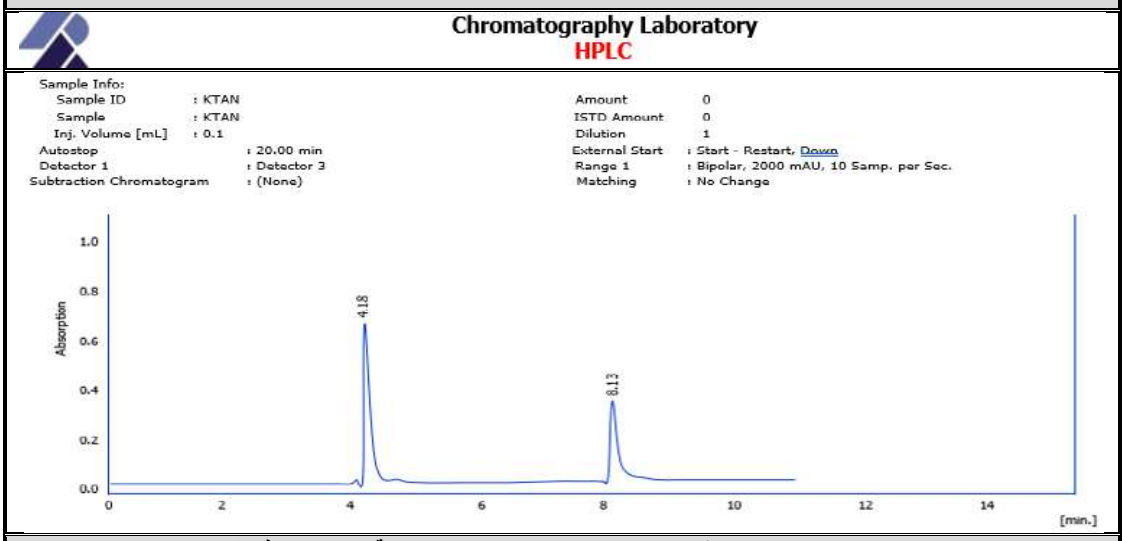
2-7-4: الكشف عن قابلية الفطر *A.niger* على انتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن

بينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 24 وشكل 15 وشكل 16) بان العزلة الفطرية *A.niger* ذات الرمز (*KTAN*) والمعزولة من ثمار الرمان المصابة والمجموعة من قضاء الهندية لمحافظة كربلاء , أظهرت مقدرة عالية على أنتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان المخزونة (فترة 21 يوم) وبمستويات مرتفعة بلغت 62.10 ميكروغرام/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة (ثمار غير معاملة بالممرض) بلغت 0.00%

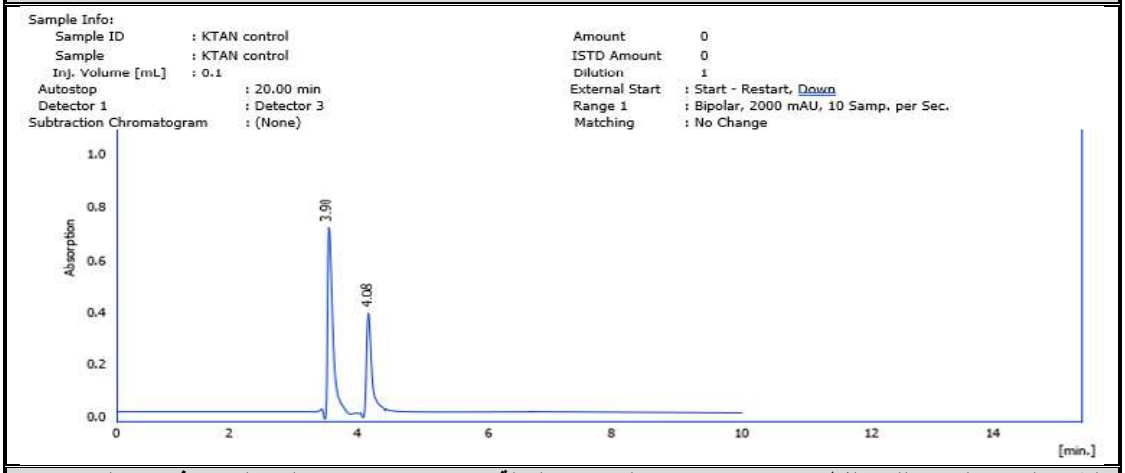
بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وخفض نسبة وشدة الإصابة . وهذا ما سبب باختزال طفيف لمستويات انتاج السم *Ochratoxin A* , فبلغت النسبة المئوية للاختزال الى 6.92% . اذ تمكنت العزلة الفطرية *A.niger* من مقاومة تأثير المستخلص النباتي وإنتاج السم الفطري *Ochratoxin A* بمعدل 57.8 ميكروغرام / كغم . وقد يُعزى تفاوت العزلات في إنتاج السموم الفطرية على القدرة الوراثية للعزلة الفطرية , والظروف التفضيلية الملائمة لِكُل عُزلة لإنتاج توكسن معين وبشكل أساسي الرطوبة ودرجة الحرارة أثناء التخزين (Ałtynو Twaruzek،2020).



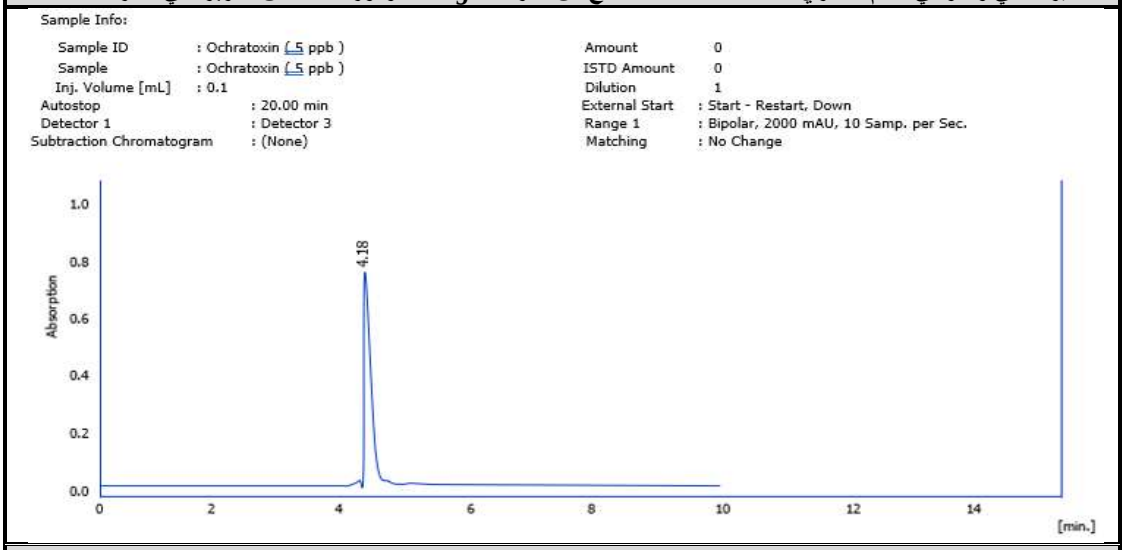
الشكل (15) تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.niger* في انتاج سم *Ochratoxin A*



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Ochratoxin A المنتج من العزلة ***A.niger*** في ثمار الرمان



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Ochratoxin A المنتج من العزلة ***A.niger*** ودور مستخلص الكزبرة في اختزاله



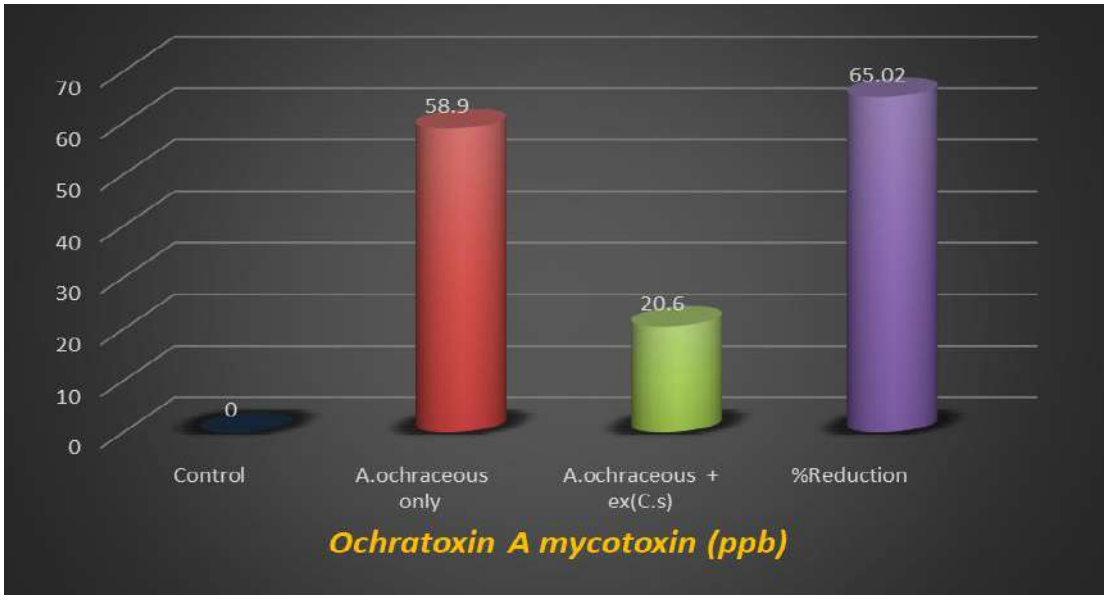
تقدير المادة القياسية للسم الفطري Ochratoxin A

الشكل (16) الكشف عن قابلية الفطر *A.niger* على انتاج السم الفطري Ochratoxin A

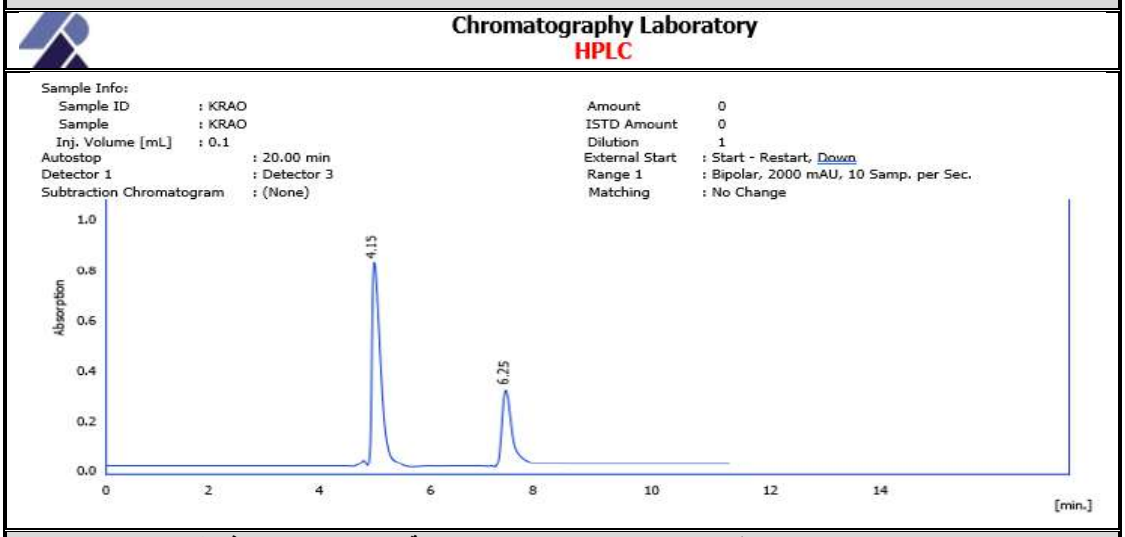
3-7-4: الكشف عن قابلية الفطر *A.ochrecaus* على انتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن

بينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 24 وشكل 17 وشكل 18) بان العزلة الفطرية *A.ochrecaus* ذات الرمز (*KRAO*) والمعزولة من ثمار الرمان المصابة والمجموعة من قضاء الحر لمحافظة كربلاء , أظهرت مقدرة عالية على أنتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان المخزونة (فترة 21 يوم) وبمستويات مرتفعة بلغت 58.9 ميكروغرام/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة (ثمار غير معاملة بالممرض) بلغت 0.00%

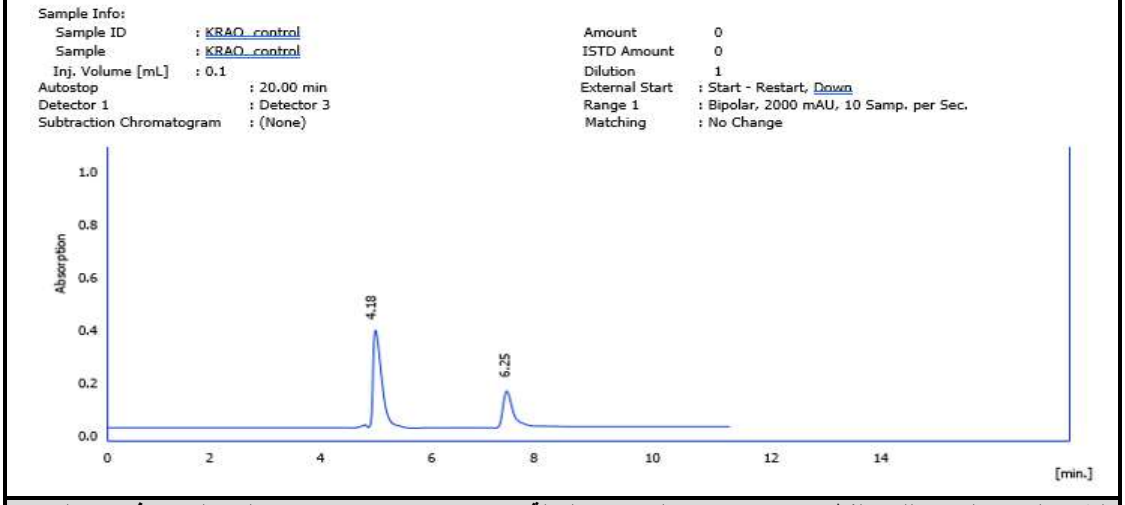
بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة الكحولي أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وخفض نسبة وشدة الإصابة . وهذا ما سبب باختزال كبير لمستويات انتاج السم *Ochratoxin A* , فبلغت النسبة المئوية لاختزال السم الى 65.02% . اذ تمكنت العزلة الفطرية *A.ochrecaus* من مقاومة تأثير المستخلص النباتي وإنتاج السم الفطري *Ochratoxin A* بمعدل 20.6 ميكروغرام / كغم



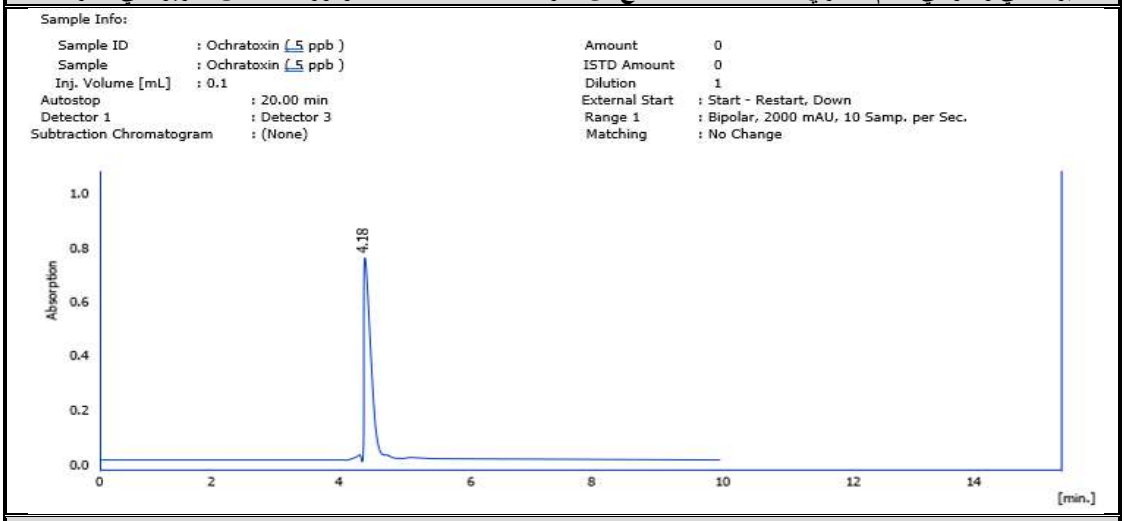
الشكل (17) تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.ochrecaus* في انتاج سم *OchratoxinA*



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Ochratoxin A المنتج من العزلة ***A.ochraceous*** في ثمار الرمان



لتقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Ochratoxinالمنتج من العزلة ***A.ochraceous*** ودور مستخلص الكزبرة في اختزاله



تقدير المادة القياسية للسم الفطري Ochratoxin A

الشكل (18) الكشف عن قابلية الفطر *A.ochraceous* على انتاج السم الفطري Ochratoxin A

تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات السابقة والتي تشير بان المنتج الرئيسي لسم الاوكراتوكسين هو انواع الفطر *Aspergillus spp*. اذ تتميز بسميتها للكلية ومسرطنة تنتجها أنواع تحت ظروب بيئية مختلفة (Heperkanواخرون، 2023) وكذلك اثبت إنتاج OchratoxinA بشكل أساسي بواسطة *A.ochrecaus, A.niger* . (Reddy واخرون، 2010 وNavale واخرون،2021). فقد ثبت Basilico واخرون (1999) أن الزيوت العطرية الكزبرة (*Coriandrum sativum*) فعالة ضد الفطريات المنتجة للأوكراتوكسين،وتؤدي الى اختزال السم بشكل كبير.

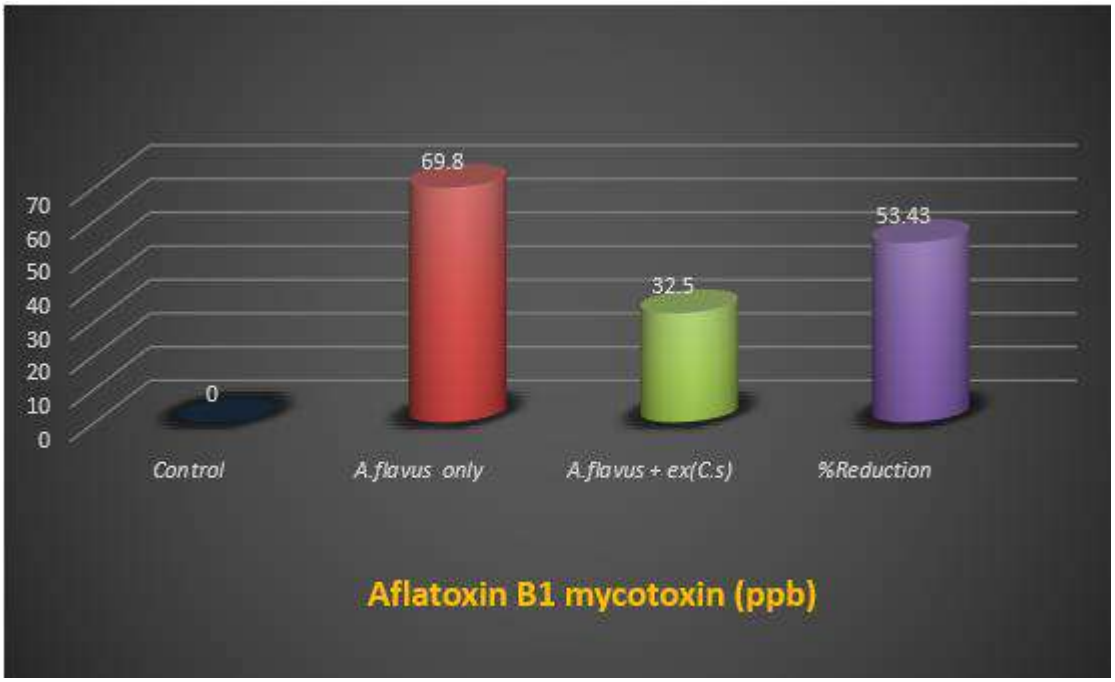
4-7-4: الكشف عن قابلية الفطر *A.flavus* على انتاج السم الفطري *Aflatoxin* B1 في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن

بينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 24 وشكل 19 وشكل 20) بان العزلة الفطرية *A.flavus* ذات الرمز (*KHAF*) والمعزولة من ثمار الرمان المصابة والمجموعة من قضاء الحسينية لمحافظة كربلاء , أظهرت مقدرة عالية على أنتاج السم الفطري *AflatoxinB1* في ثمار الرمان المخزونة (فترة 21 يوم) وبمستويات مرتفعة بلغت 69.8 ميكروغرام/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة (ثمار غير معاملة بالممرض) بلغت 0.00%.

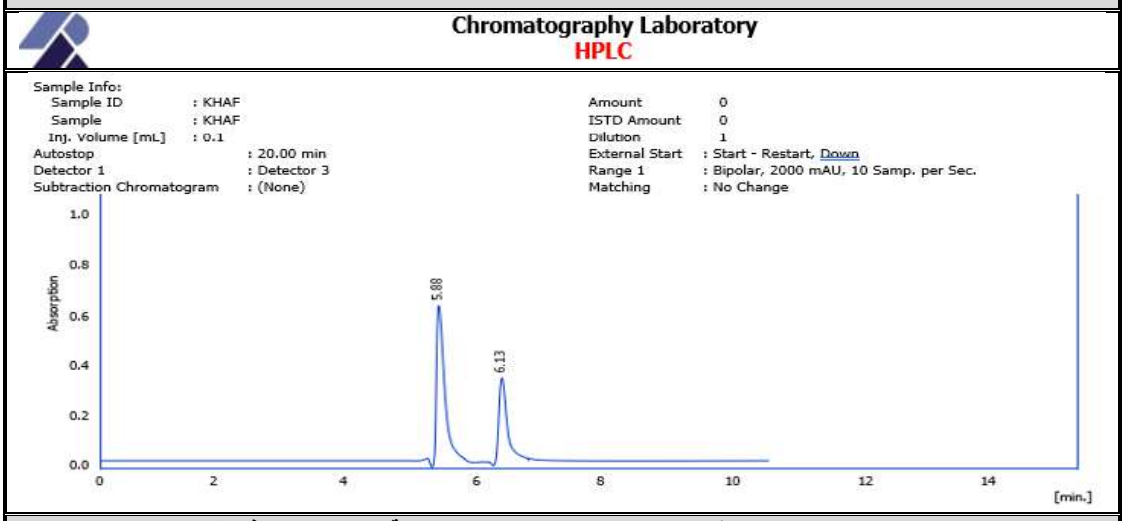
بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة الكحولي أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وخفض نسبة وشدة الإصابة . وهذا ما سبب باختزال اكثر من نصف مستويات انتاج السم *AflatoxinB1* فبلغت النسبة المئوية لاختزال السم الى 53.43% . اذ تمكنت العزلة الفطرية *A.flavus* من مقاومة تأثير المستخلص النباتي وإنتاج السم الفطري *AflatoxinB1* بمعدل 32.5 ميكروغرام / كغم .

تتفق هذه مع الدراسات السابقة التي تشير بأن المنتج الرئيسي لسم (AFB1) *Aspergillus flavus* (Medina واخرون،2014)ويعتبر أحد أهم المركبات الثانوية بسبب خصائصه المسببة للسرطان المثبتة لدى الإنسان ووجوده المتكرر في العديد من

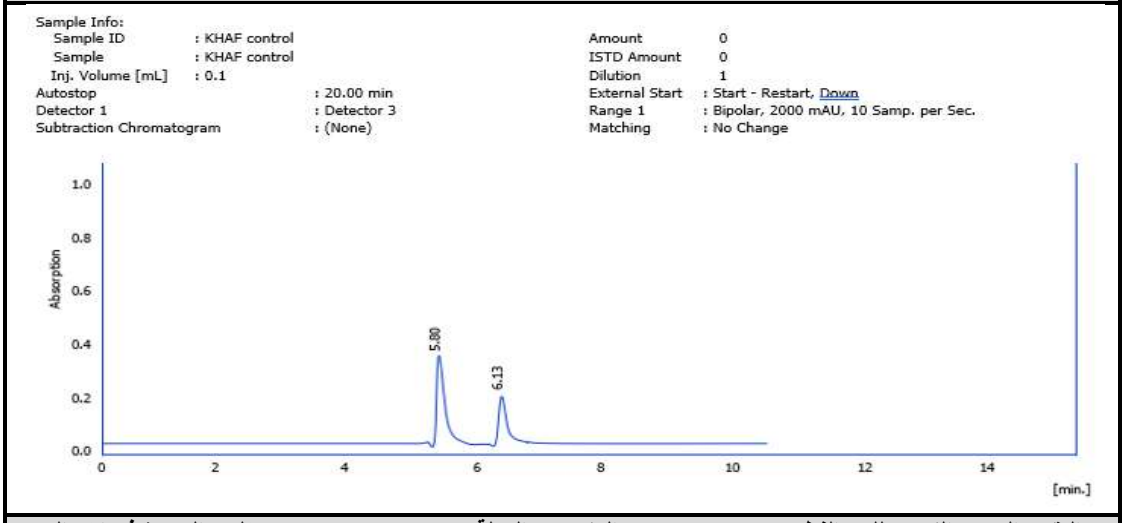
المـواد الغذائيــة فــي جميــع أنحــاء العــالم و(Caceresواخــرون،2020) إذ اكـدت الدراســة التـــي قـــام بهـــا Lasram واخـــرون (2019) ان مســـتخلص بـــذور الكزبـــرة (*Coriandrum sativum*) أظهـرت قـدرة كبيـرة علـى تقليـل امتـداد الفطريـات وتخليـق الأفلاتوكسين B1 لسلالة *A. flavus* المختبرة.



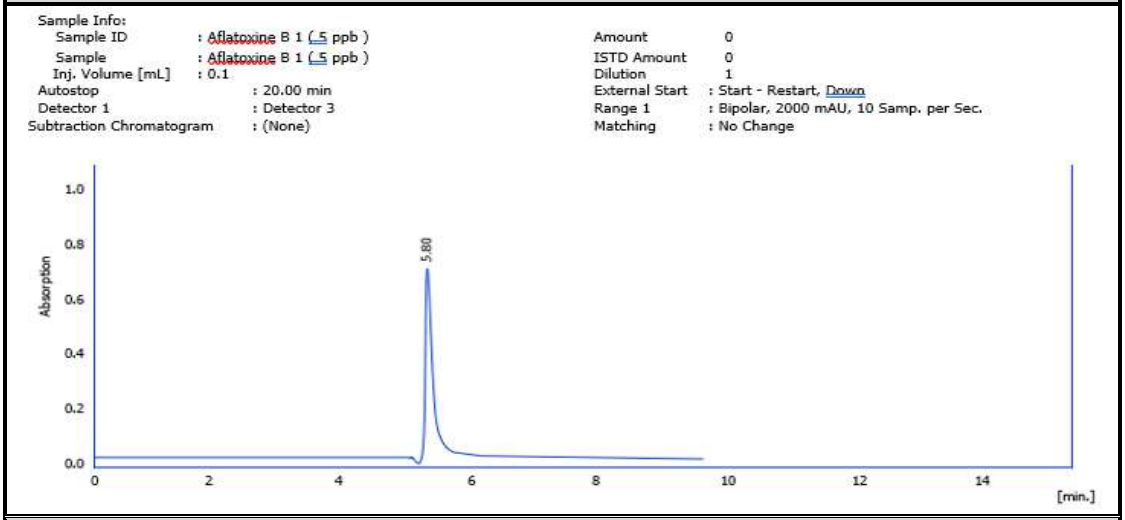
الشكل (19): تاثير مستخلص الكزبرة في ***A.flavus*** **على انتاج السم Aflatoxin B1**



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Aflatoxin B1 المنتج من العزلة *A.flavus* في ثمار الرمان



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Aflatoxin B1 المنتج من العزلة *A.flavus* ودور مستخلص الكزبرة في اختزاله



تقدير المادة القياسية للسم الفطري Aflatoxin B1

الشكل (20): الكشف عن قابلية الفطر *A.flavus* على انتاج السم الفطري Aflatoxin B1

الجدول (24) قابلية الفطريات الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان ودور عامل المكافحة (مستخلص الكزبرة) في السيطرة على انتاجها في المخزن

المعاملة	الكشف الكمي والنوعي لتلوث ثمار الرمان بالسموم الفطرية المصابة بالفطريات الممرضة				
	الفطريات	*A.alternate*	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*
	رمز العزلة	*KCAA*	*KTAN*	*KHAF*	*KRAO*
	نوع السم الفطري	*Alternariol* (ppb)	*OchratoxinA* (ppb)	*AflatoxinB1* (ppb)	*OchratoxinA* (ppb)
Control	بدون معاملة	0.00	0.00	0.00	0.00
(Path)only	الممرض فقط	93.7	62.1	69.8	58.9
(Path)+(ex.*C.s*)	مستخلص الكزبرة	65.9	57.8	32.5	20.6
النسبة المئوية للاختزال		29.66	6.92	53.43	65.02

***كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات**

4-8:أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في الحقل

تبين من نتائج اجراء هذه التجربة التي نفذت لتقييم فعالية المبيد (Palizin) , و مستخلصي نبات الميرامية نبات الكزبرة و الخميرة *S.cervisiae*. في تثبيط مهاجمة الفطريات الممرضة في احداث الإصابة بمرض تعفن ثمار الرمان في الحقل على ازهار الزمان. ان جميع هذه العوامل خفضت من النسبة المئوية لاحداث الإصابة وكذلك تثبيط من شدة الإصابة مقارنة بمعاملة السيطرة (معاملة الممرض فقط).

اذ بينت نتائج حساب النسبة المئوية لحدوث المرض بعد 75 يوم من تنفيذ التجربة بان المبيد ذو الأصل النباتي Palizin قد تفوق معنوياً بخفض نسبة الإصابة الى

16.66% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 84.44% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من احداث الإصابة بلغ 80.27% (جدول 25) تلتها المعاملة بمستخلص الكزبرة بخفض النسبة المئوية لحدوث المرض بمعدل 45% وبمعدل تثبيط بلغ 46.70% . في حين جاءت معاملتي مستخلص نبات الميرمية والعامل الحيوي (خميرة *S.cervisiae*) أخيرا , بمعدل خفض لنسبة احداث الإصابة بلغت 53.33 % و65% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 36.84% و23.02% مقارنة بمعاملة السيطرة.

اما فيما يتعلق بكفاءة او مقدرة العزلات الفطرية المختبرة على مقاومة عوامل المكافحة المستخدمة واحداث المرض فقد أظهرت العزلة *A.alternate* اعلى معدل للمقاومة ضد هذه العوامل وسجلت اعلى نسبة مئوية لاحداث الإصابة بلغت 68% , يليه الفطر *A.niger* بمعدل نسبة إصابة بلغت 61.33% بينما سجل الفطرين *A.flavus* و *A.ochraceous* معدل نسبة إصابة بلغت 52.00% و16.66% على التوالي.

الجدول (25) تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في الحقل

المعاملة	النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالفطريات الممرضة				معدل المعاملة	% للتثبيط
	A.alternate	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*		
Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0	-----
(Path)only	93.33	86.66	73.33	46,66	84.44	0.00
(Path)+(*S.cervi.*)	80.00	80.00	73.33	26.66	65.00	23.02
(Path)+(*Palizin*)	26.66	20.00	13.33	6.66	16.66	80.27
(Path)+(ex.*S.o*)	73.33	66.66	53.33	20.00	53.33	36.84
(Path)+(ex.*C.s*)	66.66	53.33	46.66	13.33	45.00	46.70
معدل % لحدوث اصابة الفطر	68.00	61.33	52.00	16.66		
L.S.D 0.05	المعاملة		الفطر		التداخل	
	2.9896		2.7732		5.7628	

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

كذلك اظهرت نتائج حساب النسبة المئوية لشدة الاصابة بعد 75 يوم من تنفيذ التجربة ان المبيد ذو الأصل النباتي Palizin قد تفوق وبفارق معنوي كبير بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة الى 6.30% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 32.41% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من شدة احداث الإصابة بلغ 80.56% (جدول 26 والشكل 21, 22, 23, 24) , تلتها المعاملة بمستخلص نبات الكزبرة بخفض النسبة المئوية لشدة حدوث الاصابة بمعدل 7.57 % وبمعدل تثبيط بلغ 76.64% . في حين جاءت معاملتي مستخلص الميرمية والعامل الحيوي (خميرة *S.cervisiae*) أخيرا , بمعدل خفض لنسبة شدة احداث الإصابة بلغت 8.98 % و 10.31% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ **72.29**% و **68.18** % مقارنة بمعاملة السيطرة .

اما بخصوص بكفاءة او مقدرة العزلات الفطرية المختبرة على مقاومة عوامل المكافحة المستخدمة واحداث شدة الإصابة فقد أظهرت العزلة *A.alternate* اعلى معدل للمقاومة ضد هذه العوامل وسجلت اعلى معدل للنسبة المئوية لشدة الإصابة بلغت 16.02% , يليه الفطر *A.niger* بمعدل شدة إصابة بلغت 15.50 % بينما سجل الفطر *A.flavus* 11.57% والفطر *A.ochraceous* 8.40% معدل لنسبة شدة الإصابة.

الجدول(26) تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لشدة الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن

المعاملة	النسبة المئوية لشدة الإصابة بالفطريات الممرضة				معدل المعاملة	% للتثبيط
	A.alternate	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*		
Control	%0.0	%0.0	%0.0	%0.0	0	-----
(Path)only	42.28	40.24	26.67	20.43	32.41%	%0.00
(Path)+(*S.cervi.*)	13.66	10.73	9.80	7.06	10.31%	%68.18
(Path)+(*Palizin*)	8.46	7.86	5.73	3.13	6.30%	%80.56
(Path)+(ex.*S.o*)	11.26	10.13	8.13	6.40	8.98%	%72.29
(Path)+(ex.*C.s*)	9.20	8.53	7.53	5.00	7.57%	%76.64
معدل % لشدة اصابة الفطر	16.02%	15.50%	11.57%	8.40%		
L.S.D 0.05	المعاملة		الفطر		التداخل	
	1.1132		0.8789		1.9921	

هناك العديد من الدراسات تتفق على ان المستخلصات النباتية تحد من نمو العديد من الفطريات وبالتالي تقلل من نسب الاصابة والتلوث (Cowan1999,) ان المستخلص الكحولي لبذور الكزبره والميرمية يعتبران مصدر محتمل للمكونات النشطة بيولوجيًا وتطبيقاته كعامل مضاد للفطريات (Abuaziza ,وAhamdi, 2023) في حين يتأمل ان تكون المبيدات ذات الأصل النباتي (Palizin) كبدائل للمواد الكيميائية فهي تكون الاقل سمية للإنسان وحيواناته وذات تأثير قاتل وطارد للآفات المخزنية (عمران ، 2021) بينما يعد عدد غير قليل من الخمائر في مجال السيطرة او المكافحة الحيوية (Control Biological) ضد الفطريات الممرضة للنبات وكذلك تستخدم في عمليات حفظ الاغذية والاعلاف (Palpacelli ,واخرون 1991,) فضلاً عن استخدامها في المجال الطبي والعلاجي فقد استخدمت كمواد مضادة للفطريات ,كما اشار الى قدرة هذه الخمائر على تثبيط نمو الفطريات المسببة للأمراض النباتية وتحلل الفواكه والخضروات (Graeme واخرون,1995)

(A.alternate)+ (ex.S.o)

(A.alternate)+ (ex.C.s)

Control

(*A.alternate*) Only

(*A.alternate*)+(*S.cervi.*)

(*A.alternate*) +(*Palizin*)

الشكل(21): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.alternate* في الحقل

(A.niger)+ (ex.S.o)

(A.niger)+ (ex.C.s)

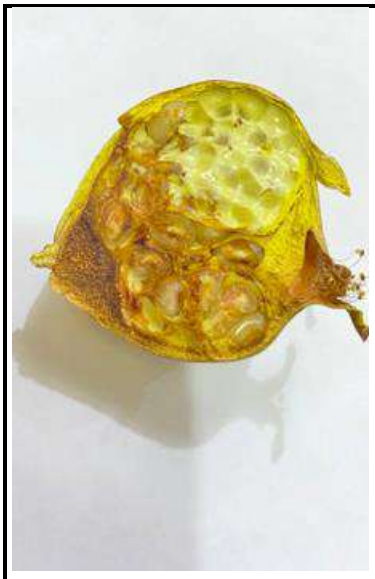
Control

(*A.niger*) Only

(*A.niger*)+ (*S.cervi.*)

(*A.niger*) +(*Palizin*)

الشكل(22): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.niger* في الحقل



(*A.flavus*) + (*ex.S.o*)

(*A.flavus*) + (*ex.C.s*)

Control

(*A.flavus*) Only

(*A.flavus*)+ (*S.cervi*.)

(*A.flavus*) +(*Palizin*)

الشكل(23): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.flavus* في الحقل

(*A.ochraceus*) + (*ex.S.o)*

(*A.ochraceus*) + (*ex.C.s)*

Control

(*A.ochraceus*) Only

(*A.ochraceus*)+ (*S.cervi.*)

(*A.ochraceus*)+ (*Palizin*)

الشكل(24): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.ochraceus* في الحقل

5: الاستنتاجات والتوصيات

5-1: الاستنتاجات :

1. اهم المسببات المرضية المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان كان *Aspergillus spp* و*A.niger* و*A. flavus* و *A.ochrecaus* و*Alternaria sp* و *Penicillium spp* و *Rhizopus sp* و*Cladosporium sp*.
2. اكثر الفطريات ظهورا وترددا المعزولة من حالات تعفن ثمار الرمان هو الفطر *Aspergillus spp* يليه الفطر*Penicillium spp* ثم الفطر *Alternaria sp* .
3. اغلب الفطريات المعزولة من ثمار الرمان المصابة تميزت بخطورتها السمية لانها تمتلك المقدرة على انتاج طيف واسع من السموم الفطرية التي من أهمها سموم (Afla B1) Aflatoxin B1 و Ochratoxin A (OTA) وسموم Alternariol (AOH)
4. ان جميع المستخلصات النباتية الكحولية (مستخلص الميرمية والكزبرة والدارسين والزعتر والسمسم والقرنفل) عملت على تثبيط نمو العزلات الفطرية بنسب مختلفة , حيث أظهر في بعض المستخلصات فعالية تثبيطية عالية وصلت النسبة المئوية للتثبيط إلى 100 %.
5. تفوق مستخلص الكزبرة بتثبط المسببات المرضية من مهاجمة ثمار الرمان وادى الى خفض كبير بالنسبة المئوية لشدة الإصابة في التجربة الخزنية. بينما تصدرت معاملة المبيد ذو الأصل النباتي Palizin بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة لجميع الفطريات في التجربة الحقلية.
6. تمكن مستخلص الكزبرة الكحولي من تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وسبب باختزال جزئي لمستويات انتاج السموم الفطرية.

2-5: التوصيات

1. تخزين الثمار بشكل جيد وتجنب المصابة منها ،وتقليل فترات التخزين لتلافي الاصابة بالفطريات وانتاجها السموم الفطرية.
2. استعمال مستخلص الكزبرة لتثبيط نمو المسببات المرضية ومنعها من مهاجمة ثمار الفاكهة وإنتاج السموم الفطرية في المخزن.
3. استخدام بعض الإجراءات الوقائية قبل حصاد الرمان للحيلولة دون اصابتها بمسببات تعفن الثمار والانتقال به الى المخزن.
4. اجراء دراسات للكشف عن السموم الفطرية الاخرى والتي لم تشملها هذه الدراسة لارتباطها بصحة الانسان والحيوان.
5. دراسة بعض المركبات الامنة بيئياً في خفض التلوث الفطري في ثمار الرمان . والسيطرة على انتاج السموم الفطرية.
6. تفعيل الدور الرقابي والحجر الزراعي في متابعة استيراد المنتجات الزراعية لمنع دخول السلالات الفطرية شديدة الامراضية والمنتجة للسموم الفطرية من ضمن الخضار والفاكهة المستوردة.

1-6: المصادر العربية

ابــو النجــا، محمــد علــي عــواد، محمــد علــي محمــد ســكر (2022). التحليــل المــالي والاقتصــادي لاســتخدام الطاقــة الشمســية فــي الإنتــاج الزراعــي (دراســة حالــة: الرمــان بواحة المغرة). المجلة المصرية للاقتصاد الزراعي، مجلد 32 العدد الأول، 2022.

زعــيط،أحلام القمــودي، ســعاد محمــد أبوالغيــث (2021). الفعاليــة التضــادية لــبعض المستخلصــات النباتيــة ضــد فطــر *Aspergillus niger* المعــزول *Allium cepa* L. من نبات البصل .*مجلة البيان العلمية*.531-540 ,(9) ,

الجهــاز المركــزي للإحصــاء (2021). تقريــر انتــاج أشــجار الفواكــه الصــيفية لعــام 2020. مديرية الإحصاء الزراعي. وزارة الزراعة. جمهورية العراق.

الحــداد،انفال مكــي صــاحب (2021).التشــخيص المظهــري والجزيئــي لمســبب مــرض التبقــع الالترنــاري علــى الزيتــون وتعزيــز المقاومــة باســتخدام بعــض العوامــل الحيويــة والاســمدة العضــوية ، رســالة ماجســتير ،جامعــة الكوفــة كليــة الزراعــة ،قســم وقايــة النبات،العراق

الــدوري، احســان فاضــل صــالح، جاســم محمــد علــوان (2012). اســتجابة أشــجار الرمــان صــنف ســليمي (*Punica granatum* L.) للتســميد العضــوي والــ NPK والــرش الورقي بالبورون وحامض الاسكوربيك. كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل.

الشــيخلي، مــروة عمــاد الــدين وناهــدة مهــدي صــالح (2015). فعاليــة خميــرة الخبــز وحــامض السالســيلك ضــد الفطــر *Penicillium digitum* المســبب لمــرض العفــن الاخضر على ثمار البرتقال. مجلة العلوم الزراعية العراقية - 46(3): 393 402

دخيــل، فيــد عبــاس (2021). التكامــل بــين العوامــل الأحيائيــة والمبيــدات الكيميائيــة فــي السيطرة علــى مسببات امــراض جــذور نباتــات الزينــة فــي مشــاتل محــافظتي كــربلاء وبابــل. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة كربلاء.العراق

صبا كاظم، صباح علوان وحسين الكلابي (2015). تقويم كفاءة بعض عوامل المقاومة الحيوية والفيزيائية ومستخلص نبات الالوفيرا Aloe vera في مقاومة الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة في الترب المزيجية والرملية.(2)*7* ,*Kufa Journal for Agricultural Sciences* .

عمران، ايمان موسى (2021). دراسة بعض الجوانب التصنيفية والحياتية للحشرتين *Oryzaephilus surinamensis* و *Rhyzopertha dominica* مع الاشارة الى مكافحتهما . اطروحة. دكتوراه كلية العلوم .جامعة البصرة. 303 صفحة

العواضي، عمرو جابر نعمان (2018). دليل افات وامراض الرمان، الإدارة الزراعية، مؤسسة الحظا للتجارة والوكالات، الإدارة الزراعية - القسم الفني، الجمهورية اليمنية.

محمد،حلا علي (2019). تأثير مستخلصات نبات الكزبرة(*Coriandrum sativum*) في نمو بعض الفطور الممرضة للنبات ، *Fusarium oxysporum* *Aspergillus* sp .*Penicillium* sp مجلة وقاية النبات العربية،مجلد 37،عدد 4، 2019.

المفلحي،محمود علي عبدالله،محمد عبدالرحيم احمد الزمير (2016).حصر وتقدير نسبة الاصابة بمرض ذبول وموت اشجار الرمان وعزل المسببات المرضية المصاحبة للمرض بمحافظة صعده _اليمن ،قسم وقاية النبات ،كلية الزراعة،جامعة صنعاء،اليمن.

6-2 : References

Abuaziza, F. B., and Ahamdi, I. M.(2023) Evaluation of the Activity of Alcoholic Extract from The Leaves of *Salvia officinalis* and Mentha longifolia against Some Fungi Isolated from Soil.

Abdel-Sater, M., Abdel-Hafez, S., Hussein, N., and Al-amery, E. (2017). Fungi associated with maize and sorghum grains and their potential for amylase and *aflatoxins* production. *Egyptian Journal of Botany*, *57*(1), 119-137.

Al-Hamiri, Y.N.(2016). Integrated control of fungal pathogens causing agent of crown and root rot disease on potato in middle of iraq. Journal of Kerbala for Agricultural Sciences 3 (4): 104-122

Aljallad, R.(2022). First report of *Alternaria alternata* Keissler causing leaf spot on Rhus coriarial in Syria.Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (44) No. (3)

Alshehri, B., and Palanisamy, M. (2020). Evaluation of molecular identification of *Aspergillus* species causing fungal keratitis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(2), 751-756.

Al-Muammar, M. N., and Khan, F. (2012). Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). Nutrition, 28(6), 595-604.

Aloi, F., Riolo, M., Sanzani, S. M., Mincuzzi, A., Ippolito, A., Siciliano, I., ... and Cacciola, S. O. (2021). Characterization of

Alternaria species associated with heart rot of pomegranate fruit. Journal of Fungi, 7(3), 172.

Alshannaq, A., and Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. International journal of environmental research and public health, 14(6), 632.

Ałtyn, I., and Twarużek, M. (2020). Mycotoxin contamination concerns of herbs and medicinal plants. *Toxins*, *12*(3), 182.

Amaike, S., and Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. Annual review of phytopathology, 49(1), 107-133.

Ammar, M. I., and El-Naggar, M.A.(2014). Screening and characterization of fungi and their associated mycotoxins in some fruit crops. International Journal of Advanced Research, 2(4), 1216-1227.

Andersen, B., Smedsgaard, J., Jørring, I., Skouboe, P., and Pedersen, L. H. (2006). Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. International Journal of Food Microbiology, 111(2), 105-111.

Arce-Lopez, B., Lizarraga, E., Vettorazzi, A., and González-Peñas, E. (2020). Human Biomonitoring of Mycotoxins in Blood, Plasma and Serum in Recent Years: A Review. Toxins, 12(3), 147.

Arendse, E. (2014). Determining optimum storage conditions for pomegranate fruit (cv. Wonderful) (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

Artés, F., Tudela, J. A., and Villaescusa,R. (2000). Thermal postharvest treatments for improving pomegranate quality and shelf life. Postharvest Biology and Technology, 18(3), 245-251.

Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases-A review. Ecological Complexity, 49, 100978,12.

Al-Niaame, A. E. and Aziz, R. A.(2013). Astudy of Histopathological Effects of Methanolic Buds of Flowers Extract of Lavandula officinalis L. on Selected Organs of Male Mice. iraq journal of market research and consumer protection, 5(2), 184-198

Bacha, S. A. S., Li, Y., Nie, J., Xu, G., Han, L., and Farooq, S. (2023). Comprehensive review on patulin and *Alternaria* toxins in fruit and derived products. Frontiers in Plant Science, 14, 1139757.

Barkai-Golan, R. (2008). *Aspergillus mycotoxins*. In Mycotoxins in fruits and vegetables (pp. 115-151). Academic Press.

Basilico, M.Z. and J.C. Basilico(1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and *ochratoxin* a production. Lett. Applied Microbiol., 29: 238-241

Bellaouchi, R., Abouloifa, H., Rokni, Y., Hasnaoui, A., Ghabbour, N., Hakkou, A., and Asehraou, A. (2021). Characterization and

optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 19(1), 50.

Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S., P. Oswald, I., El Khoury, A., ... and Bailly, J. D. (2020). *Aflatoxin* biosynthesis and genetic regulation: A review. *Toxins*, *12*(3), 150.

Cara, M., Toska, M., Frasheri, D., Baroncelli, R., and Sanzani, S. M. (2022). *Alternaria* species causing pomegranate and citrus fruit rots in Albania. Journal of Plant Diseases and Protection, 129(5), 1095-1104.

Conway, W. S., Sams, C. E., and Hickey, K. D. (2001). Pre-and postharvest calcium treatment of apple fruit and its effect on quality. In International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants 594 (pp. 413-419).

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. ciln. Microbiol- Rev., 12 (4): 564-582.

Dassprakash, M. V., Arun, R., Abraham, S. K., and Premkumar, K. (2012). In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. Pharmaceutical biology, 50(12), 1523-1530.

Dellavalle, P. D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., and Rizza, M. D. (2011). Antifungal activity of medicinal plant

extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. Chilean journal of agricultural research, 71(2), 231-239.

DeMers,M. (2022). *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. Microbiology, 168(3), 001153.

Diaz-Najera, J. F.; Serna, S. A.; Bahena, A. M.; Cruz, E.B., Hernandez, M.V., Gomez, O.G., Aragón, D.F. (2021). First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) Causing Wilt Disease of Phaseolus vulgaris in Mexico. Plant Dis.105:710.

Doughari, J. H., El-mahmood, A. M. and Tyoyina, S. P. (2008). Antimicrobial activity of leaf extracts of Senna obtusifolia (L). Afric. J. Pharmacy and Pharmacology, 2, 1, 7-13.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., ... and Bignami, M. (2020). Risk assessment of *ochratoxin* A in food. EFSA Journal, 18(5), e06113

Ezra, D., Kirshner, B., Hershcovich, M., Shtienberg, D., and Kosto, I. (2015). Heart rot of pomegranate: Disease etiology and the events leading to development of symptoms. Plant Disease, 99(4), 496-501

Ezra, D., Shulhani, R., Bar Ya'akov, I., Harel-Beja, R., Holland, D., and Shtienberg,D. (2019). Factors affecting the response of pomegranate fruit to *Alternaria alternata*, the causal agent of heart rot. Plant disease, 103(2), 315-323.

Faedda, R., Granata, G., Massimino Cocuzza, G. E., Lo Giudice, V., Audoly, G., Pane, A., and Cacciola, S. O. (2015). First report of heart rot of pomegranate *Punica granatum* caused by *Alternaria alternata* in Italy. Plant Disease, 99(10), 1446..

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.Meeting, and World Health Organization. (2002). Evaluation of certain *mycotoxins* in food: Fifty-Sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Vol. 56). World Health Organization.

Garrido, C. E., Pezzani, C. H., and Pacin, A. (2012). Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (Zea mays L.), from 1999 to 2010. Food Control, 25(2): 660-665.

Ge, S., Duo, L., Wang, J., Yang, J., Li, Z., and Tu, Y. (2021). A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. Journal of ethnopharmacology, 271, 113877.

Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., Roustaee, A., and Sahebani, N. A. (2009). Biological control of apples blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection Research.

Graeme, M. Walker; Anne, H. Mcleod and Valerie, J. Hodgson . (1995). Interactions between Killer yeast and phathogenic.fungi FEMS Microbiology. 127, Issue 3, 213-222 .

Hackbart, H., Prietto, L., Primel, E. G., Garda-Buffon, J., and BadialeFurlong, E. (2012). Simultaneous extraction and detection

of *ochratoxin* A and citrinin in rice. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23, 103-109

Heperkan, Z. D., Gunalan-Inci, E., and Ceyhan, T. (2023). Unexpectedly high patulin contamination and co-occurrence of ochratoxin A in homemade vinegar. Food Control, 148, 109685.

Huang, S.L. ; Kohmoto, K. ; Otani, H. ; Kodama, M. (1996) . Nuclear behavior during the formation ofapressoriaby *Alternaria alternata*. Myco. Sci., 37, 41-47

Jatoi, G. H., Muhammad, S., Metlo, W. A., Al-Ani, L. K. T., Haseenullah, M. A. A., Gadhi, M. A., and Reki, M. (2020). Efficacy of different essential oils, fungicides and biocontrol agents against Aspergillus niger the causal agent of fruit rot in Pomegranate. Int. J. Biosci, 16, 51-65.

Jurenka, J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. Alternative medicine review, 13(2).

Kabiri, M., and Amiri-Besheli, B. (2012). Toxicity of Palizin, Mospilan and Consult on Agonoscena pistaciae Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae), *Oenopia conglobata* L.(Coleoptera: Coccinellidae) and Psyllaephagus pistaciae Ferrière (Hymenoptera: Encyrtidae). *Academic Journal of Entomology*, *5*(2), 99-107.

Kanetis, L., Testempasis, S., Goulas, V., Samuel, S., Myresiotis, C., and Karaoglanidis, G. S. (2015). Identification and *mycotoxigenic* capacity of fungi associated with pre-and postharvest fruit rots of

pomegranates in Greece and Cyprus. International Journal of Food Microbiology, 208, 84-92.

Khan, A. A., Habib, A., Khan, W. A., and Arif, M. U. (2021). Management of Grey mold of Pomegranate (*Punica granatum* L.) through essential oils. Life Science Journal, 18(11).

Kimura, N.,Tsuge, T. (1993) . Genecluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. J. Bacteriol., 175, 4427-4435

Kitigwa, S. J., Kimaro, E. G., Nagagi, Y. P., Kussaga, J. B., Suleiman, R. A., and Matemu, A. (2023). Occurrence and associated risk factors of *aflatoxin* contamination in animal feeds and raw milk from three agroecological zones of Tanzania. *World Mycotoxin Journal*, *16*(2), 149-163.

Kinay Teksur, P., Şen, F., Yıldız, F., Hizaler, K., and Celik, Y. (2012). The effect of pre and postharvest treatments on decay development of 'Hicaz'pomegranates (*Punica granatum* L. var Hicaz). In The 7th International Postharvest Symposium (IPS2012), Kuala Lumpur, Malaysia.

Kowalska, J., Krzymińska, J., Matysiak, K., and Jakubowska, M. (2022). Screening for Antagonistic Yeasts to Manage *Alternaria* spp. in Organic Farming. Agriculture, 12(10), 1693.

Krebs C.J. (1978). Ecology:The Experimental Analysis of Distribution and Abundance .Harper and Row Publisher, New York.

Küpper, W., Pekmezci, M., and Henze, J. (1994). Studies on CA-storage of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaz). Postharvest Physiology of Fruits 398, 101-108.

KURKINA, Y. N., ESINA, E. P., BARSKOVA, A. S., SHERBAKOVA, A. Y., and LAZAREV, A. V. (2020). Influence of natural essential oils on phytopathogenic strains *alternaria alternata* and *cladosporium cladosporioides*. International Journal of Pharmaceutical Research (09752366), 12(2).

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution, 35(6), 1547.

Lacey, J., G. L. Bateman and C.J. Mirocha. (1999). Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. In wheat Ann. Appl. Biol. 134: 277-283

Lansky, E. P., and Newman, R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of ethnopharmacology, 109(2), 177-206.

Lasram, S., Zemni, H., Hamdi, Z., Chenenaoui, S., Houissa, H., Tounsi, M. S., and Ghorbel, A. (2019). Antifungal and *antiaflatoxinogenic* activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. Industrial crops and products, 134, 11-18.

Lima, C. B. D., Rentschler, L. L. A., Bueno, J. T., and Boaventura, A. C. (2016). Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata, Alternaria dauci* and on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). Ciência Rural, 46(5), 764-770.

Liu, L., Xie, M., and Wei, D. (2022). Biological Detoxification of Mycotoxins: Current Status and Future Advances. International journal of molecular sciences, 23(3), 1064.

López, P., Venema, D., Mol, H., Spanjer, M., de Stoppelaar, J., Pfeiffer, E., and de Nijs, M. (2016). *Alternaria* toxins and conjugates in selected foods in the Netherlands. Food Control, 69, 153-159.

Lotfi, M., Hamdami, N., Dalvi-Isfahan, M., and Fallah-Joshaqani, S. (2022). Effects of high voltage electric field on storage life and antioxidant capacity of whole pomegranate fruit. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 75, 102888.

Lucey, J. A., Munro, P. A., and Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. International Dairy Journal, 9(3-6), 275-279.

Luo, Y., Hou, L., Förster, H., Pryor, B., and Adaskaveg, J. E. (2017). Identification of *Alternaria* species causing heart rot of pomegranates in California. Plant disease, 101(3), 421-427.

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., and Toman, J. (2016). *Ochratoxin* A: 50 years of research. Toxins, 8(7), 191.

Mateo, EM , Gill-serna , J., Patino, B. and jinenez ,M. (2011). Adlatoxinand *ochratoxins* Ain stored barley grian in spain and impact of pre –based strategies to assess the occurrence of *aflatoxigenic* andochratoxigenic *Aspergillus* spp.International Journalof food 26./microbiology .149(2):118.

McKinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by Helminthosporium sativum.

Medina, A., Rodriguez, A., and Magan, N. (2014). Effect of climate change on *Aspergillus flavus and aflatoxin* B1 production. Frontiers in microbiology, 5, 348.

Mincuzzi, A., and Ippolito, A. (2023). Pomegranate: Postharvest Fungal Diseases and Control. In New Advances in Postharvest Technology. IntechOpen

Mincuzzi, A., Picciotti, U., Sanzani, S. M., Garganese, F., Palou, L., Addante, R., ... and Ippolito, A.(2023). Postharvest Diseases of Pomegranate: *Alternative* Control Means and a Spiderweb Effect. Journal of Fungi, 9(8), 808

Mincuzzi, A., Sanzani, S. M., Palou, L., Ragni, M., and Ippolito, A. (2022). Postharvest rot of pomegranate fruit in southern Italy: Characterization of the main pathogens. Journal of Fungi, 8(5), 475.

Mohd Zainudin, N. A. I., Abd Murad, N. B., & Shaari, F. N. (2024). Utilisation of Plant-Based Product in Post-harvest Disease Management of Fruits. In Advances in Tropical Crop Protection (pp. 121-155). Cham: Springer Nature Switzerland.

Munhuweyi, K., Lennox, C. L., Meitz-Hopkins, J. C., Caleb, O. J., and Opara, U. L. (2016). Major diseases of pomegranate (*Punica granatum* L.), their causes and management—A review. Scientia Horticulturae, 211, 126-139.

Myresiotis, C. K., Testempasis, S., Vryzas, Z., Karaoglanidis, G. S., and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015). Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method. Food Chemistry, 182, 81-88.

Naher, L., Yusuf, U. K., Ismail, A., and Hossain, K. (2014). *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. Pak. J. Bot, 46(4), 1489-1493.

Nallathambi, P., and Umamaheswari, C. (2009). Detection of *aflatoxins* in pomegranate arils infected by *Aspergillus* species. *Indian Phytopathology*, *62*(2), 178-182.

Nargund, V. B., Jayalakshmi, K., Benagi, V. I., Byadgi, A. S., Patil, R. V., Melgarejo, P., and Valero, D. (2012). Status and management of anthracnose of pomegranate in Karnataka State of India. *Options Méditerranéennes Ser. A Semin. Mediterr*, *103*, 117-120.

Navale, V., Vamkudoth, K. R., Ajmera, S., and Dhuri, V. (2021). *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. Toxicology reports, 8, 1008-1030.

Neamah, S. K., Alwan, S. L., and AL-Abedy, A. N. (2020). Molecular diagnosis of new *Aspergillus niger* isolates causing degradation of pomegranate (*Punica granatum*) trees in Iraq. Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol, 79-84.

Nirmal, M. D., Jadhav, P. P., and Pawar, S. (2023). Pomegranate Leaf Disease Detection Using Supervised and Unsupervised Algorithm Techniques. Cybernetics and Systems, 1-12.

Nouri, B., Mohtasebi, S. S., and Rafiee, S. (2020). Quality detection of pomegranate fruit infected with fungal disease. International Journal of Food Properties, 23(1), 9-21.

Ntasiou, P., Myresiotis, C., Konstantinou, S., Papadopoulou-Mourkidou, E., and Karaoglanidis, G. S. (2015). Identification, characterization and mycotoxigenic ability of *Alternaria* spp. causing core rot of apple fruit in Greece. International journal of food microbiology, 197, 22-29.

Ostry, V. (2008). *Alternaria mycotoxins*: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin Journal, 1(2), 175-188.

Pala, H.; Tatli, A.; Yilmaz, C.; Özgüven, A.I.(2009). Important diseases of pomegranate fruit and control possibilities in Turkey. Acta Hortic. 2009, 818, 285–290.

Pandian, J. D., Singh, G., Kaur, P., Bansal, R., Paul, B. S., Singla, M., ... and Sharma, M. (2016). Incidence, short-term outcome, and spatial distribution of stroke patients in Ludhiana, India. Neurology, 86(5), 425-433.

Pantiora, P. D., Balaouras, A. I., Mina, I. K., Freris, C. I., Pappas, A. C., Danezis, G. P., ... and Georgiou, C. A. (2023). The Therapeutic Alliance between Pomegranate and Health Emphasizing on Anticancer Properties. Antioxidants, 12(1), 187.

Palpacelli ,V., Cinai, M. and Rosini, G. (1991).Activity of different "Killer" yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. FEMS Microbiol Lett 1; 68 (1) : 75-8 .

Persons, K., Raines, J. M., & Rodriguez, J. M. (2013). Antagonistic effects of *Saccharomyces cerevisiae* on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* at varying temperatures. Mycology, 4(1), 38-43.

plascencia-Jatomea, M., Susana, M., Gómez, Y., & Velez-Haro, J. M. (2014). *Aspergillus* spp.(Black mold). In Postharvest decay (pp. 267-286). Academic Press

Pommerenke, C.,M. Musken, T. Becker and A. Dotsch.(2011). Global genotype phenotype correlation in *Pseudomonas* aeruginosa .Plos. Pathog.6 :1-8

Pundri,R.K.and Jain,P.(2010). Antifungal activity of twenty two ethanolic plant extracts against food_associated fungi .journal of pharmacy Rsearch,3,506-510.

Rashidi, A., Mousavi, B., Rahmani, M. R., Rezaee, M. A., Hosaini, W., Motaharinia, Y., ... and Zamini, G. (2011). Evaluation of antifungal effect of *Lavandula officinalis*, *Salvia officinalis* L., Sumac, *Glycyrrhiza glabra*, and *Althaea officinalis* extracts on *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus flavus* species. Journal of Medicinal Plants Research, 6(2), 309-313.

Rassin, N. K., Al-judy, N. J., and Dheeb, B. I. (2015). Molecular Identification of *Aspergillus fumigatus* Using ISSR and RAPD Markers. *Iraqi Journal of Science*, *56*(4A), 2788-2797.

Reddy, K. R. N., Nurdijati, S. B., and Salleh, B. (2010). An overview of plant-derived products on control of *mycotoxigenic* fungi and *mycotoxins*. Asian Journal of Plant Sciences, 9(3), 126.

Richard J.L .(2007). Some major *mycotoxins* and their *mycotoxicosesAn* overview. Int. J. Food Microbiol, 119:3- 10

Roseanu, A.; Jecu, L.; Badea, M. and Evans, R. W. (2010). *Mycotoxins*: An Overview on their quantification methods. Romanian J. Biochemistry, 47(1): 79-86.

Sari, F. M., Oztas, E., Ozden, S., and Ozhan, G. (2020). Liquid chromatographic determination of *citrinin* residues in various meat products: A pioneer survey in Turkey. Journal of the Faculty of Pharmacy of Istanbul University, 50(3), 195-202.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., and Frisvad, J. C. (2004). Introduction to food-and airborne fungi (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Samson, R.A., and Varga, J. (2008). *Aspergillus* systematics in the genomic era (Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre)

Schulz, M. C. (2020). Modulation der nierenschädigenden Wirkung von *Ochratoxin* A durch simultane Exposition mit Citrinin und durch tubulo interstitielle Kommunikation

Selcuk, N., and Erkan, M. (2014). Changes in antioxidant activity and postharvest quality of sweet pomegranates cv. Hicrannar under modified atmosphere packaging. Postharvest Biology and Technology, 92, 29-36.

Shalaby, M.E. and El-Nady, M.F.(2008). Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugarbeet plants.Acta Biologica Szegediensis, 52(2):271- 275.

Shtayeh , M.S.A. and Abu-Ghdeib , S.I. (1999). Antifungal Activity extract Against dematophytes. J. Mycoses., 42:665-672.

Singh, A., Shukla, A. K., and Meghwal, P. R. (2020). Fruit cracking in pomegranate: extent, cause, and management–A Review. International Journal of Fruit Science, 20(sup3), S1234-S1253.

Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., and Catalan, C. A. (2006). Studies on essential oils, Part 41. Chemical composition,

antifungal, antioxidant and sprout suppressant activities of coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil and its oleoresin. Flavour and fragrance journal, 21(3), 472-479.

Solhaug, A., Eriksen, G. S., and Holme, J. A. (2016). Mechanisms of action and toxicity of the mycotoxin *alternariol*: A review. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, *119*(6), 533-539.

Stool , M. , Begerow , D. and oberwinkler , F.(2005). molecular phylogeny of ustilago , sporisorium , and related taxa based on combined analysis of Rdna Sequences . myco . 109 : 342 – 356 .

Sumalan, R. M., Alexa, E., Popescu, I., Negrea, M., Radulov, I., Obistioiu, D.,and Cocan, I.(2019). Exploring ecological alternatives for crop protection using *Coriandrum sativum* essential oil. Molecules, 24(11), 2040.

Tekiner, N., Kotan, R., Tozlu, E., and Dadaşoğlu, F. (2020). Biological control of Coniella granati Saccardo in pomegranate. Universal Journal of Agricultural Research, 8(1), 18-24..

Teksur, P. K. (2015). *Alternative* technologies to control postharvest diseases of pomegranate. Stewart Postharvest Rev, 11, 1-7.

Toma, M. A., Nazir, K. N. H., Mahmud, M. M., Mishra, P., Ali, M. K., Kabir, A., ... and Alim, M. A. (2021). Isolation and identification of natural colorant producing soil-borne *Aspergillus niger* from Bangladesh and extraction of the pigment. *Foods*, *10*(6), 1280.

Thomidis, T. (2015). Pathogenicity and characterization of *Pilidiella granati* causing pomegranate diseases in Greece. *European journal of plant pathology*, *141*, 45-50.

Tongdee, S. C.(1994). Sulfur dioxide fumigation in postharvest handling of fresh longan and lychee for export. In ACIAR Proceedings (Vol. 58, pp. 186-189).

Tsang, C. C., Xiong, L., Poon, R. W., Chen, J. H., Leung, K. W., Lam, J. Y., ... and Woo, P. C. (2016). Gordonia hongkongensis sp. nov., isolated from blood culture and peritoneal dialysis effluent of patients in Hong Kong. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(10), 3942-3950.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., and Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. STUDIES IN MYCOLOGY, 78, 343-371

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., and Taylor, J.(1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1): 315-322.

Xavier, K. V., Kc, A. N., and Vallad, G. E. (2020). Fungicide application timing essential for the management of leaf spot and fruit rot on pomegranate (*Punica granatum* L.) in Florida. Plant disease, 104(6), 1629-1637.

Yahyaabadi, S., Zibanejad, E., and Doudi, M. (2011). Effect of some of plant extracts on the growth of two *Aspergillus species*. Journal of Medicinal Herbs,, 2(1), 69-81.

Yehia, H. M. (2013). Heart rot caused by *Aspergillus niger* through splitting in leathery skin of pomegranate fruit. *African Journal of Microbiology Research*, *7*(9), 834-837.

Yan, X., Chen, H., Du, G., Guo, Q., Yuan, Y., and Yue, T. (2022). Recent trends in fluorescent aptasensors for *mycotoxin* detection in food: Principles, constituted elements, types, and applications. *Food Frontiers*, *3*(3), 428-452.

Zahra, N., Saeed, M. K., Sheikh, A., Kalim, I., Ahmad, S. R., and Jamil, N. (2019). A review of mycotoxin types, occurrence, toxicity, detection methods and control: review: review of mycotoxin types. *Biological Sciences-PJSIR*, *62*(3), 206-218.

Zahedi, S. M., Hosseini, M. S., Karimi, M., Gholami, R., Amini, M., Abdelrahman, M., and Tran, L. S. P. (2023). Chitosan-based Schiff base-metal (Fe, Cu, and Zn) complexes mitigate the negative consequences of drought stress on pomegranate fruits. Plant Physiology and Biochemistry, 196, 952-964.

Zhang$_2$, J., Xu, Y., Hu, T., Sun, C., and Wu, W. (2021). Experimental Study on the Status of Maize *Mycotoxin* Production in Farmers' Grain Storage Silos in Northeastern China. Toxins, 13(11), 741.

Zou, D., Ji, J., Ye, Y., Yang, Y., Yu, J., Wang, M., Zheng, Y., and Sun, X.(2022). Degradation of *Ochratoxin* A by a UV-Mutated *Aspergillus niger* Strain. Toxins, 14(5), 343

7: الملاحق

ملحق (1): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Alternaria alternata isolate Fatima-1*
في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Alternaria alternata isolate Fatima-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PP467583.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       PP467583                 558 bp    DNA     linear   PLN 16-MAR-
2024
DEFINITION  Alternaria alternata isolate Fatima-1 internal transcribed spacer
            1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   PP467583
VERSION     PP467583.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Alternaria alternata
  ORGANISM  Alternaria alternata
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae;
            Pleosporaceae; Alternaria; Alternaria sect. Alternaria;
Alternaria
            alternata complex.
REFERENCE   1  (bases 1 to 558)
  AUTHORS   Abudzaid,F.H. and Alhumairy,Y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-MAR-2024) Plant Protection Department, Agriculture
            College/University of Kerbala, City center, Kerbala, Kerbala
56001,
            Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..558
                     /organism="Alternaria alternata"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Fatima-1"
                     /db_xref="taxon:5599"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="2023"
     misc_RNA        <1..>558
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ctgcggaggg acattacaca aatatgaagg cgggctggaa cctctcgggg ttacagcctt
       61 gctgaattat tcacccttgt cttttgcgta cttcttgttt ccttggtggg ttcgcccacc
      121 actaggacaa acataaacct tttgtaattg caatcagcgt cagtaacaaa ttaataatta
      181 caactttcaa caacggatct cttggttctg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat
      241 aagtagtgtg aattgcagaa ttcagtgaat catcgaatct ttgaacgcac attgcgccct
      301 ttggtattcc aaagggcatg cctgttcgag cgtcatttgt accctcaagc tttgcttggt
      361 gttgggcgtc ttgtctctag ctttgctgga gactcgcctt aaagtaattg gcagccggcc
      421 tactggtttc ggagcgcagc acaagtcgca ctctctatca gcaaaggtct agcatccatt
      481 aagccttttt ttcaactttt gacctcggat caggtaggga tacccgctga acttaagcat
      541 atcataggcc ggaaggaa
```

ملحق (2): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus flavus isolate y.n.190.Fatima*
في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus flavus isolate y.n.190.Fatima internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ034725.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       PQ034725                556 bp    DNA     linear   PLN 21-JUL-
2024
DEFINITION  Aspergillus flavus isolate y.n.190.Fatima internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   PQ034725
VERSION     PQ034725.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus flavus
  ORGANISM  Aspergillus flavus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 556)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N. and Abd-Zaid,F.H.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-JUL-2024) faculty of Agriculture, University of
            Karbala, Alaskan street, karbala, city center DDac18, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..556
                     /organism="Aspergillus flavus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="y.n.190.Fatima"
                     /host="pomegranate"
                     /db_xref="taxon:5059"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="22-Sep-2023"
                     /collected_by="Alhamiri"
     misc_RNA        <1..>556
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 atttacgagt gtagggttcc tagcgagccc aacctcccac ccgtgtttac tgtaccttag
       61 ttgcttcggc gggcccgcca ttcatggccg ccgggggctc tcagccccgg gcccgcgccc
      121 gccggagaca ccacgaactc tgtctgatct agtgaagtct gagttgattg tatcgcaatc
      181 agttaaaact ttcaacaatg gatctcttgg ttccggcatc gatgaagaac gcagcgaaat
      241 gcgataacta gtgtgaattg cagaattccg tgaatcatcg agtctttgaa cgcacattgc
      301 gccccctggt attccggggg gcatgcctgt ccgagcgtca ttgctgccca tcaagcacgg
      361 cttgtgtgtt gggtcgtcgt cccctctccg gggggggacgg gccccaaagg cagcggcggc
      421 accgcgtccg atcctcgagc gtatggggct ttgtcacccg ctctgtaggc ccggccggcg
      481 cttgccgaac gcaaatcaat cttggtccag gttgacctcg gatcaggtag ggatacccgc
      541 tgaacttaag catata
```

ملحق (3): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus niger isolate y.n.191.Fatima*
في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus niger isolate y.n.191.Fatima internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ034726.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       PQ034726                571 bp    DNA     linear   PLN 21-JUL-
2024
DEFINITION  Aspergillus niger isolate y.n.191.Fatima internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   PQ034726
VERSION     PQ034726.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus niger
  ORGANISM  Aspergillus niger
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 571)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N. and Abd-Zaid,F.H.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-JUL-2024) faculty of Agriculture, University of
            Karbala, Alaskan street, karbala, city center DDac18, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..571
                     /organism="Aspergillus niger"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="y.n.191.Fatima"
                     /host="pomegranate"
                     /db_xref="taxon:5061"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="22-Sep-2023"
     misc_RNA        <1..>571
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 taaggagcgg ggaggtcttt gggcccacct cccatccgtg tctattgtac cctgttgctt
       61 cggcgggccc gccgcttgtc ggccgccggg ggggcgcctc tgccccccgg gcccgtgccc
      121 gccggagacc ccaacacgaa cactgtctga aagcgtgcag tctgagttga ttgaatgcaa
      181 tcagttaaaa ctttcaacaa tggatctcgg ggttccggca tcgatgaaga acgcagcgaa
      241 atgcgataac taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgagtctttg aacgcacatt
      301 gcgccccctg gtattccggg gggcatgcct gtccgagcgt cattgctgcc ctcaagcccg
      361 gcttgtgtgt tgggtcgccg tccccctctc cgggggggacg ggcccgaaag gcagcggcgg
      421 caccgcgtcc gatcctcgag cgtatggggc tttgtcacat gctctgtagg attggccggc
      481 gcctgccgac gttttccaac cattctttcc aggttgacct cggatcaggt agggataccc
      541 gctgaactta agcatatcaa taagcggagg a
```

ملحق (4): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus ochraceus isolate y.n.192.Fatima* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus ochraceus isolate y.n.192.Fatima internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ034727.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       PQ034727                519 bp    DNA     linear   PLN 21-JUL-
2024
DEFINITION  Aspergillus ochraceus isolate y.n.192.Fatima internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   PQ034727
VERSION     PQ034727.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus ochraceus
  ORGANISM  Aspergillus ochraceus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 519)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N. and Abd-Zaid,F.H.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-JUL-2024) faculty of Agriculture, University of
            Karbala, Alaskan street, karbala, city center DDac18, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..519
                     /organism="Aspergillus ochraceus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="y.n.192.Fatima"
                     /host="pomegranate"
                     /db_xref="taxon:40380"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="22-Sep-2023"
     misc_RNA        <1..>519
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ccacccgtgt ataccgtacc ttgttggttc ggcgagcccg ccccctttt cttttagggg
       61 gcacagcgct cgccggagac accaacgtga acactgtctg aagttttgtc gtctgagtcg
      121 attgtatcgc aatcagttaa aactttcaac aatggatctc ttggttccgg catcgatgaa
      181 gaacgcagcg aaatgcgata attaatgcga attgcagaat tcagtgaatc atcgagtctt
      241 tgaacgcaca ttgcaccccc tggtattccg gggggtatgc ctgtccgagc gtcattgctg
      301 ccctcaacca cggcttctgt gttgggtcgt cgtcccccccc caggggacg ggcccgaaag
      361 gcagcggcgg caccgcgtcc ggtcctcgag cgtatgttgc tttgtcaccc gctcttgtag
      421 gcccggccgg ctgctggccg acgctgaaga gcaaccaact atttttccag gttgacctcg
      481 gatcaggtag ggatacccgc tgaacttaag catatcaat
```

Abstract

The study aimed to conduct an environmental and biological survey of the extent of pomegranate fruit infection with pomegranate fruit rot disease and to identify the fungi causing these cases in Kerbala and Babylon governorates, and to isolate and diagnose pathogenic fungal isolates that have the ability to produce mycotoxins, in addition to evaluating the effect of some plant extracts, agricultural pesticides and yeast *Saccharomyces cervisiae* in protecting pomegranate fruits from attack by pathogenic fungi in the field and warehouse.

The results of isolation and diagnosis showed that all samples taken from infected pomegranate fruits, which belong to five different areas of Kerbala Governorate and three areas of Babylon Governorate, were contaminated with different fungal isolates with a contamination rate of 100%. The results of isolation and diagnosis showed the detection of 450 fungal isolates belonging to several fungal genera, the most contaminated of which was the *Aspergillus* spp genus, followed by the Penicillium spp genus, and in third place came the *Alternaria* spp genus, which is a fungus that produces mycotoxins. The results also showed the percentage frequency of fungal species, as the species *Aspergillus. niger* outperformed with a frequency percentage of 21.35%, followed by the species *A. flavus* with a frequency percentage of 4.72%. The species *Alternaria alternata* achieved a percentage of 3.37%, excel the species *Aspergillus. ochraceus*, which recorded a percentage of 2.70%, respectively and a number of them showed great virulence in causing the disease. It was found that four fungal isolates appeared that were the most virulent with a 100% infection rate within the scratching treatment, namely *Aspergllus niger* 4 (KTAN), *Aspergillus flavus* 1 (KHAF), *Aspergillus ochraceous* 2 (KRAO) and *Alternaria alternata* 2 (KCAA).

The results of nucleotide sequence analysis of 4 fungal isolates, which were isolated from different pomegranate fruit rot cases and showed high virulence in causing pomegranate fruit rot disease under controlled conditions, were diagnosed under different species. The results of nucleotide sequence analysis showed that the isolates belong to the fungi: *Alternaria alternata, Aspergillus niger, Aspergillus flavus*, and *Aspergillus ochraceus*. All isolates were registered in the National Center for Biotechnology

Information (NCBI) under the special codes (PP467583.1, PQ034725.1, PQ034726.1, and PQ034727.1) respectively. The molecular nucleotide sequences achieved The highest matching rate was, ranging from 99.82 to 98.65%, with the ITS gene region when compared with the equivalent nucleotide sequences retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank using the BLAST program for each fungal isolate individually.

The results of the storage experiment showed that coriander extract was superior and significantly superior in reducing the percentage of infection severity to 8.06% compared to the pathogen treatment only, which reached 25.88%, and with an average fungal inhibition rate of infection severity of 68.85%, followed by the treatment with *Salvia officinalis*, which reduced the percentage of infection severity by 9.98% and with an inhibition rate of 61.43%. While the treatments of the plant-based pesticide *Palizin* and the biological agent (*Saccharomyces cervisiae*) came last, with a reduction rate of infection severity of 10.04% and 11.06% respectively and an inhibition rate of 61.20% and 57.26% compared to the control treatment.

While the results showed that treating stored pomegranate fruits with *Coriandrum sativum* extract inhibited the pathogen's ability to attack pomegranate fruits. This caused a partial reduction in the levels of mycotoxin production. Treatment with coriander extract reduced the production rate of *Alternariol* produced by *Alternaria alternata* to 65.9 µg/kg compared to the control treatment, which amounted to 93.7 µg/kg. While it reduced the production rate of *Aspergillus Ochratoxin* produced by *Aspergillus niger* by 57.8 µg/kg compared to the control treatment, which amounted to 62.10 µg/kg. While it reduced the production rate of *A. Ochratoxin* produced by *A. ochrecaus* by 20.6 µg/kg compared to the control treatment of 58.9 µg/kg. It also reduced the production an average of *Aflatoxin* B1 produced by *Aspergillus flavus* by 32.5 µg/kg compared to the control treatment, which amounted to 69.8 µg/kg.

The results of the field experiment confirmed that the plant-based pesticide Palizin was significantly superior in reducing the percentage of infection severity to 6.30% compared to the pathogen-only treatment, which reached 32.41% and with an average fungal inhibition rate of infection severity of 80.56%, followed by the *Coriandrum sativum* treatment, which

reduced the percentage of infection severity by 7.57% and with an inhibition rate of 76.64%. While the *Salvia officinalis* and the biological agent (yeast *Saccharomyces cervisiae*) treatments came last, with an infection severity reduction rate of 8.98% and 10.31% respectively and an inhibition rate of 72.29% and 68.18% compared to the control treatment.

Karbala University
College of Agriculture
Plant Protection

Evaluating the efficiency of some biological agents, plant extracts, and some chemical pesticides in combating some pathogenic fungi that cause pomegranate fruit rot *Punica granatum*, in the field and store, and the extent of their production of mycotoxins

A Thesis submitted to the Council of the Faculty of Agriculture / Karbala University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree in Plant Protection

By

Fatima Haider Abd Zaid Al-Fatlawi

Supervised by
Prof. Dr. Yasir Naser Hussein Alhamiri

1446 A.H **2024 A.D**

جامعة كربلاء
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

تقييم كفاءة بعض العوامل الحيوية والمستخلصات النباتية وبعض المبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفطريات المرضية المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان *Punica granatum* في الحقل والمخزن ومدى انتاجها للسموم الفطرية

رسالة مقدمة الى مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في الزراعة/ وقاية النبات

من قبل
فاطمة حيدر عبد زيد الفتلاوي
بإشراف
أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري

2024 م 1446 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(وَأَلْقَيْتُ عَلَيْكَ مَحَبَّةً مِنِّي)

صَدَقَ اللَّهُ العَلِيُّ العَظِيمِ

سورة طه : الآية 39

الإهداء

بسم الذي علّم الأنسان ما لم يعلم .

إلى . . مدينة العلم الذي جاء بالحق بشيراً ونذيراً **رسولنا الأكرم محمد (ص)**

إلى .. من وضع بين أيدينا حكمة (الْعَامِلُ بِجَهْلٍ كَالسَّائِرِ عَلَى غَيْرِ طَرِيقٍ، فَلَا يُجْدِيهِ جِدُّهُ فِي السَّيْرِ إِلَّا بُعْداً عَنْ حَاجَتِهِ") . مبين أمة رسول الله وباب حكمته ، **سيد الفقهاء أمير المؤمنين علية السلام**

إلى . . رفيق هذه الرحلة الأنيس الذي أفاض ببركته عليّ **القائم المهدي (عج)**

إلى . . مَن اهداني ألوان الحياة ،وعلمني صُنع لوحةِ خاصتي **(أبي)**

إلى . . من أسبغت عليّ خطوات الوصول بالدعاء ، وشيّدت لي سماء تخصّني **(أمي)**

أهدي هذا الجهد المتواضع . . .

فاطمة حيدر

شكر وتقدير

الحمد لله والشكر له رب العالمين الخالق العظيم من بيده مجرى الامور وبه نستعين وعليه توكلي ومستجيب دعائي ورافع عني الهم والغم وصعاب الامور حمداً على نعمه التي لا يحصيها غيره، حمدا ابلغ به رضاه ، والصلاة والسلام على خاتم النبيين وسيد المرسلين وشفيع الامه حبيب اله العالمين نبي الرحمة محمد وعلى أله الطاهرين المنتجبين أئمة الهدى والرحمة.

اتقدم بالشكر الجزيل والثناء الجميل إلى استاذي ومشرفي الأستاذ الدكتور ياسر ناصر حسين الحميري بما قدمه من توجيهات وبذل جهد كبير في المتابعة والمراجعة وابداء ملاحظات ونصائح علمية قيمة دعمتني طول مدة عملي واغنت الرسالة في جوانبها المختلفة فكان ابأُ ناصحا وموجها حريصا فجزاه الله عني خير الجزاء ونسأل الله له التوفيق و دوام الصحة والعافية بحق محمد وأل محمد.

اتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية الزراعة منتسبيها كافة لما قدموه من تسهيلات لإتمام الرسالة . وأتقدم بخالص الشكر للسيد رئيس قسم وقاية النبات الدكتور علي عبد الحسين المحترم وجميع التدريسين والمنتسبين واخص بالذكر الدكتورة رجاء غازي والدكتور عبد الزهرة جبار علي والدكتور محسن عبد علي محسن والدكتور عدنان عبد الجليل لهوف والدكتور عقيل نزال والأستاذ علاء طالب والاستاذ بريـر كًماز والأستاذة نور كاظم لما قدموه من مساعدة ودعم خلال مدة الدراسة. كما أتقدم بوافر الشكر والامتنان إلى رئيس وأعضاء لجنة المناقشة لتفضلهم بقبول قراءة ومناقشة موضوع الرسالة. كما اشكر كل من الاستاذ علاء جدوع ، الاستاذ بشيرجابر، ست مياده محمود لمساعدتهم لي في مرحلة جمع العينات. والشكر الجزيل إلى جميع زملائي وزميلاتي اللذين هم بمثابة اخوتي الذين ساندوني خلال مدة الدراسة وخصوصاً ضحى عايد، أيمان عباس، سندس قحطان،شهب علي،نور الهدى محمود. نسأل الله لهم دوام الموفقية والصحة والسلامة. الشكر والثناء إلى اهلي والدتي واخوتي لما قدموه لي من سند بعد الله سند معنوي ومادي كانوا حاضرين في جميع مراحل دراستي وما احاطها من ظروف.

اقرار المشرف

أشهد بأن الرسالة الموسومة (تقييم كفاءة بعض العوامل الحيوية والمستخلصات النباتية وبعض المبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفطريات المرضية المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان *Punica granatum* في الحقل والمخزن ومدى انتاجها للسموم الفطرية) التي قدمتها الطالبة (فاطمة حيدرعبد زيد) قد تم اعدادها بإشرافي في كلية الزراعة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية / وقاية النبات.

التوقيع :

الاسم : أ. د. ياسر ناصر حسين الحميري

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية الزراعة

توصية رئيس القسم

بناءًا على توصية الاستاذ المشرف ، ارشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. علي عبد الحسين كريم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

اقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الرسالة والموسومة (تقييم كفاءة بعض العوامل الحيوية والمستخلصات النباتية وبعض المبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الفطريات المرضية المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان *Punica granatum* في الحقل والمخزن ومدى انتاجها للسموم الفطرية) التي قدمتها الطالبة (فاطمة حيدر عبد زيد) وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية (وقاية النبات).

رئيس اللجنة
أ.د. عبد الزهرة جبار علي
كلية الزراعة/ جامعة كربلاء

عضواً
أ.م.د. أسامة عبد الكريم عبد المنعم
كلية الزراعة / جامعة الكوفة

عضواً
أ.م.د. محسن عبد علي محسن الموسوي
كلية الزراعة / جامعة كربلاء

عضواً ومشرفاً
أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري
كلية الزراعة / جامعة كربلاء

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة – جامعة كربلاء

الدكتور
أ.د. صباح غازي شريف
عميد كلية الزراعة / جامعة كربلاء

الخلاصة

هدفت الدراسة الى التحري عن الفطريات المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان في محافظتي كربلاء وبابل، وتحديد اكثر الفطرية الممرضة التي تمتلك المقدرة على انتاج السموم الفطرية وتقييم تأثير بعض المستخلصات النباتية والمبيدات الزراعية والخميرة *Saccharomyces cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة الفطريات الممرضة في الحقل والمخزن.

بينت نتائج العزل والتشخيص تلوث جميع العينات المأخوذة من ثمار الرمان المصابة والتي تعود لخمسة مناطق مختلفة من محافظة كربلاء وثلاث مناطق من محافظة بابل، بعزلات فطرية مختلفة بنسبة تلوث 100%، اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 450 عزلة فطرية عائدة لعدة اجناس فطرية، كان أكثرها تلوثا هو جنس *Aspergillus* spp يليه جنس *Penicillium* spp وفي المرتبة الثالثة يأتي جنس *Alternaria* sp، وهي من الفطريات المنتجة للسموم الفطرية، كما أظهرت نتائج النسبة المئوية لتردد الأنواع الفطرية، اذ تفوق الفطر *Aspergillus niger* بنسبة تردد بلغت 21.35%، ليأتي بعده النوع *Aspergillus flavus* بنسبة 4.72%.ثم كان *Alternaria alternata* نسبة بلغت 3.37% متفوقاً على النوع *Aspergillus ochraceus* الذي الذي سجل نسبة بلغت 2.70% على التوالي، والتي أظهرت عدد منها ضراوة كبيرة في احداث المرض فقد تبين ظهور اربع عزلات فطرية كانت الاكثر ضراوة بنسبة إصابة 100% ضمن معاملة التخديش وهي 4 *Aspergillus niger* (*KTAN*) و*1 Aspergillus flavus* (*KHAF*) و2 *Aspergillus ochraceous* (*KRAO*) و *2 Alternaria alternata*(*KCAA*).

اكدت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي لـ لأربع عزلات فطرية، التي تم عزلها من حالات تعفن ثمار الرمان المختلفة والتي أظهرت ضراوة شديدة في احداث مرض تعفن ثمار الرمان تحت ظروف مسيطر عليها، تم تشخيصها تحت انواع متباينة، فقد اظهرت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي بان العزلات تعود الى الفطريات:*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* , *Aspergillus flavus* , *Aspergillus ochraceus* اذ تم تسجيل جميع العزلات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوي (NCBI) وتحت الرموز الخاصة (*PP467583.1* و*PQ034725.1* و*PQ034726.1* و*PQ034727.1*) على التوالي. اذ حققت التسلسلات النيوكليوتيدية الجزيئية اعلى نسبة تطابق تراوحت ما بين 99.82 – 98.65 % مع المنطقة الجينية ITS عند مقارنتها مع التسلسلات النيوكليوتيدية المكافئة المسترجعة من بنك الجينات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) بأستخدام برنامج الـ (BLAST) ولكل عزلة فطرية .

بينت نتائج التجربة الخزنية ان مستخلص الكزبرة قد تفوق وبفارق معنوي كبير بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة الى 8.06% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 25.88% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من شدة احداث الإصابة بلغ 68.85%، تلتها المعاملة بمستخلص نبات الميرمية بخفض النسبة المئوية لشدة حدوث الاصابة بمعدل 9.98% وبمعدل تثبيط بلغ 61.43%. في حين جاءت معاملتي المبيد ذو الأصل النباتي Palizin والعامل الحيوي (الخميرة *Saccharomyces cervisiae*) أخيرا، بمعدل خفض لنسبة شدة احداث الإصابة بلغت 10.04% و11.06% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 61.20% و57.26% مقارنة بمعاملة السيطرة.

بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة الكحولي أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وهذا ما سبب باختزال جزئي لمستويات انتاج السموم الفطرية. اذ خفضت المعاملة بمستخلص الكزبرة معدل انتاج *Alternariol* المنتج من الفطر*Alternaria alternata* الى 65.9 ميكروغرام / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 93.7 ميكروغرام/كغم. بينما خفضت معدل انتاج *Ochratoxin A* المنتج من الفطر *Aspergillus niger* بمعدل 57.8 ميكروغرام / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 62.10 ميكروغرام/كغم. في حين خفضت معدل انتاج *Ochratoxin A* المنتج من الفطر *Aspergillus ochrecaus* بمعدل 20.6 ميكروغرام / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 58.9 ميكروغرام/كغم. كذلك عملت على خفض معدل انتاج *Aflatoxin B1* المنتج من الفطر *Aspergillus flavus* بمعدل 32.5 ميكروغرام / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 69.8 ميكروغرام/كغم.

أكدت نتائج التجربة الحقلية ان المبيد ذو الأصل النباتي Palizin قد تفوق وبفارق معنوي كبير بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة الى 6.30% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 32.41% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من شدة احداث الإصابة بلغ 80.56%، تلتها المعاملة بمستخلص نبات الكزبرة بخفض النسبة المئوية لشدة الاصابة بمعدل 7.57 % وبمعدل تثبيط بلغ 76.64%. في حين جاءت معاملتي مستخلص الميرمية والعامل الحيوي (الخميرة *Saccharomyces cervisiae*) أخيرا، بمعدل خفض لنسبة شدة الإصابة بلغت 8.98 % و10.31% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 72.29% و68.18% مقارنة بمعاملة السيطرة.

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
-1	**المقدمة (Introduction)**	1
-2	**مراجعة المصادر (Litreature Review)**	4
1-2	الاهمية الاقتصادية لمحصول الرمان :	4
2-2	مرض تعفن ثمار الرمان	6
3-2	الاعراض المرضية و دورة مرض تعفن ثمار الرمان	8
4-2	السموم الفطرية (Mycotoxins) المصاحبة لفاكهة ثمار الرمان:	11
5-2	السموم الفطرية المنتجة من قبل الفطر *Alternaria* والفطر *Aspergillus* :	13
6-2	طرق مكافحة مرض تعفن ثمار الرمان	17
1-3-2	المكافحة الكيميائية	18
2-3-2	المكافحة الميكانيكية	18
3-6-2	المكافحة الحيوية:	18
7-2	تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطريات المدروسة	20
8-2	التطبيقات الزراعية للسيطرة على مرض تعفن ثمار الرمان	21
1-8-2	تطبيقات ما قبل الحصاد	21
2-8-2	تطبيقات بعد الحصاد	22
9-2	طرق تخزين ثمار الرمان وطرق المكافحة بالمخزن للسيطرة من امراض تعفن الثمار	23
10-2	الكشف عن السموم الفطرية بطريقة الكروماتوغرافي السائل عالي الاداء High performance Liquid chromatographic (HPLC)	24
3	**المواد وطرائق العمل Materials and Methods**	25
1-3	الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب .	25
2-3	تحضيرالأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات	27
1-2-3	وسط البطاطا سكروز اكار Potato Sucrose Agar (P.S.A) .	27
2-2-3	وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز .Potato Dextrose Agar P.D.A	27
3-2-3	وسط Nutrient Yeast Dextrose Broth	27
3-3	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لتعفن ثمار الرمان	28
1-3-3	جمع العينات	28
2-3-3	عزل الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان	29
3-3-3	تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة من ثمار الرمان.	29

4-3	حفظ العزلات الفطرية	30
5-3	اختبار المقدرة الامراضية للعزلات الفطريات المعزولة من ثمار الرمان	30
1-5-3	تحضير لقاح الفطريات .(العالق الفطري)	30
2-5-3	اختبار المقدرة الامراضية	30
3-5-3	حساب النسبة المئوية للإصابة وشدة الاصابة لثمار الرمان	31
6-3	التشخيص الجزيئي Molecular identification	32
	أولا: استخلاص و تنقية الـ DNA DNA extraction and purification	32
	ثانياً: تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)	34
	ثالثاً: تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية	35
7-3	تحضير المستخلصات النباتية الكحولية لبعض النباتات المنتخبة	35
8-3	تقييم كفاءة عدد من المستخلصات النباتية والمبيدات الكيميائية والعامل الاحيائي (الخميرة *S.cervisiae*) ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.	36
1-8-3	تنشيط الخميرة *S.cervisiae* واختبار فاعليتها في تثبيط نمو العزلات الفطرية	36
2-8-3	أختبار تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	37
3-8-3	اختبار كفاءة بعض المبيدات ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	37
9-3	أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في المخزن	38
9-3	الكشف عن قابلية العزلات الفطرية الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان	40
1-9-3	استخلاص السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A	40
2-9-3	استخلاص السم الفطري Alternariol (AOH)	41
3-9-3	الكشف النوعي والتقدير الكمي للسموم الفطرية Aflatoxin B1 و Ochratoxin A و Alternariol (AOH) بتقانة HPLC للعزلات الفطرية	42
10-3	أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في الحقل	43
10-3	التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية	45
-4	**النتائج والمناقشة (Results and Discussion)**	46
1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان	46
2-4	الوصف المظهري لاهم العزلات الفطرية المرافقة لعينات الدراسة	49
3-4	المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المدروسة	52
4-4	تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطريات المعزولة	55

1-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.alternata Isolate Fatima-1* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	56
2-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.flavus . Y.n.190.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	57
3-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.niger . Y.n.191.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	59
2-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	60
5-4	تقييم كفاءة عدد من المستخلصات النباتية والمبيدات الكيميائية والعامل الاحيائي (الخميرة *S.cervisiae*) ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.	63
1-5-4	تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	63
2-5-4	اختبار كفاءة بعض المبيدات ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	64
6-4	أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في المخزن	68
7-4	الكشف عن قابلية الفطريات الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان ودور عامل المكافحة في السيطرة على انتاجها في المخزن	75
1-7-4	الكشف عن قابلية الفطر *A.alternate* على انتاج السم الفطري *Alternariol* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن	76
2-7-4	الكشف عن قابلية الفطر *A.niger* على انتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن	79
3-7-4	الكشف عن قابلية الفطر *A.ochrecaus* على انتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن	81
4-7-4	الكشف عن قابلية الفطر *A.flavus* على انتاج السم الفطري *Aflatoxin* B1 في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن	83
8-4	أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد	86

	(*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في الحقل	
5-	**الاستنتاجات والتوصيات**	**94**
5-1	الاستنتاجات	**94**
5-2	التوصيات	**95**
6-	**المصادر**	**96**
6-1	المصادر العربية	**96**
6-2	المصادر الأجنبية	**98**
7	**الملاحق**	**121**

رقم الجدول	الموضوع	رقم الصفحة
1	الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب .	**25**
2	المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة	**26**
3	الفطريات الممرضة المستخدمة بالدراسة	**26**
4	نوع العينات وترميزها ومكان وتاريخ جمعها	**28**
5	الدليل المرضي المستخدم في حساب النسبة المئوية لشدة الإصابة لتعفن ثمار الرمان	**31**
6	البوادئ المستخدمة في تقنية Polymerase chain reaction (PCR)	**34**
7	أسماء النباتات المنتخبة لعمل المستخلصات النباتية منها واهم المواد الفعالة بها	**36**
8	المعاملات المطبقة على ثمار الرمان الملوثة بالفطريات الممرضة	**39**
9	المعاملات المطبقة على ازهار الرمان الملوثة بالفطريات الممرضة بالحقل	**43**
10	الفطريات المعزولة من ثمار الرمان المصابة بمرض تعفن الثمار	**46**
11	النسبة المئوية لظهور وتردد الفطريات المعزولة من ثمار الرمان	**47**
12	النسبة المئوية للإصابة في اختبار المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المنتخبة	**53**
13	النسبة المئوية لشدة الإصابة في اختبار الامراضية للعزلات الفطرية المنتخبة	**54**
14	التشخيص الجزيئ لعزلات الفطريات المعزولة باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و GenBank Accession Number	**55**
15	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة	**56**

	الفطر *A.alternata Isolate Fatima-1* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	
16	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.flavus . Y.n.190.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	58
17	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.niger . Y.n.191.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	59
18	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	61
19	تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	63
20	اختبار كفاءة المبيدين Palizin و Tondexir ضد نمو العزلات الفطرية مختبريا	65
21	اختبار كفاءة الخميرة *S. cervisiae* ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا	66
22	تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن	69
23	تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لشدة الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن	70
24	قابلية الفطريات الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان ودور عامل المكافحة (مستخلص الكزبرة) في السيطرة على انتاجها في المخزن	86
25	تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في الحقل	87
26	تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لشدة الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن	89

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	مراحل تنفيذ التجربة الخزنية لتقييم كفاءة المعاملات في تثبيط المسببات المرضية	39
2	مراحل تنفيذ التجربة الحقلية على أشجار الرمان	44
3	نماذج من مستعمرات اهم الفطريات المعزولة	51
4	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.alternata Isolate Fatima-1*	57
5	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.flavus . Y.n.190.Fatima*	58
6	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.niger . Y.n.191.Fatima*	60
7	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima*	61
8	نماذج لأفضل معاملات التضاد المستخدمة ضد *Alternaria sp* و *Aspergillus sp* مختبريا	67
9	انماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.alternate* في المخزن	72
10	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.niger* في المخزن	73
11	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.flavus* في المخزن	74
12	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.ochraceus* في المخزن	75
13	تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.alternate* في انتاج سم *Alternariol*	77
14	الكشف عن قابلية الفطر *A.alternate* على انتاج السم الفطري *Alternariol*	78
15	تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.niger* في انتاج سم *Ochratoxin A*	79
16	الكشف عن قابلية الفطر *A.niger* على انتاج السم الفطري Ochratoxin A	80
17	تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.ochrecaus* في انتاج سم *OchratoxinA*	81
18	الكشف عن قابلية الفطر *A.ochraceous* على انتاج السم الفطري Ochratoxin A	82
19	تاثير مستخلص الكزبرة في *A.flavus* على انتاج السم Aflatoxin B1	84
20	الكشف عن قابلية الفطر *A.flavus* على انتاج السم الفطري Aflatoxin B1	85
21	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.alternate* في	90

	الحقل	
22	ا نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.niger* في الحقل	91
23	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.flavus* في الحقل	92
24	نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.ochraceus* في الحقل	93

1- المقدمة

يعد الرمان *Punica granatum* L أحدى أقدم الثمار التي عرفها الانسان، وأدرك قيمتها الغذائية والعلاجية مبكراً واهتم بزراعتها لفوائده الغذائية والصحية، فهو صيدلية متكاملة لعلاج الامراض والوقاية منها (Ge واخرون،2021) وذلك لما يحتويه من المركبات النشطة بيولوجيا مثل المعادن والفلافونويدات والفيتامينات، وكذلك العناصر الغذائية فهو يحتوي على كميات كبيرة من السكر تبلغ 16% بالإضافة الى البروتينات حوالي 9% ومواد دهنية تصل الى 7% كما يحتوي العصير على حمض الستريك وبعض الاملاح المعدنية وخاصة الحديد (أبو النجا وسكر، 2022). ويعتبر محصول فاكهة ذو أهمية اقتصادية كبيرة للمناطق الاستوائية وشبه الاستوائية في العالم. ولقد حدثت زيادة هائلة في المساحة والإنتاج والتصدير في جميع أنحاء العالم على مدى العقود الماضية (Singh واخرون، 2020).

تتعرض ثمار الرمان الى المهاجمة من مسببات الامراض المختلفة في مرحلة ما قبل او بعد الحصاد، حيث له تأثير كبير على جودة الفاكهة وعمر التخزين مما يؤدي الى تلف الانسجة ويجعل الفاكهة غير قابلة للبيع , اذ تهاجم العديد من مسببات الامراض الفطرية محدثة العديد من الامراض اهمها مرض تعفن ثمار الرمان ولعل من اهم هذه المسببات هي أنواع الفطر *Alternaria* spp وأنواع الفطر *Aspergillus* spp (Munhuweyi واخرون، 2016).

يعد الفطر *Alternaria alternata* المسبب الرئيسي لمرض تعفن ثمار الرمان إذ يصيب الرمان في مرحلة مبكرة من النضج، وينمو وينتشر داخل الثمرة أثناء نموها. فان أبواغ الممرض التي تكون محمولة جواً تحدث عدوى الازهار قبل ظهور الثمار، يمكن أن تظل العدوى كامنة لمعظم موسم النمو حتى تهيئة الظروف الملائمة (Aloi واخرون، 2021). يهاجم الثمرة عن طريق إنتاج إنزيمات محللة للبشرة والجدار الخلوي، يؤدي التفاعل بين الممرض والمضيف إلى حدوث تغييرات في العمليات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية نظرًا لأن مسبب مرض القلب الأسود ينمو داخل الثمرة دون التأثير على القشرة الخارجية للثمرة، فإن الفحص البصري لا يكون عادةً فعالاً في التعرف عليه. (Nouri واخرون، 2020).

بعض أنواع الفطر *Alternaria* قادرة على إنتاج العديد من مركبات الايض الثانوية السامة، المعروفة باسم السموم الفطرية، التي تلوث السلع الغذائية المخزنة (Andersenواخرون، 2006) ومنها هي سموم *Alternariol* وهي من السموم الرئيسية والاكثر انتشاراً في ثمار الرمان ذات تـأثيرات مهمة وسلبية على الانسان عند تناول الفاكهة او الغذاء الملوث بها (Bacha واخرون، 2023).

بينما تعد أنواع الفطر *Aspergillus* spp من الفطريات المهمة الموجودة في جميع أنحاء العالم وفي جميع الأنظمة البيئية ومن مسببات مرض تعفن ثمار الرمان الذي يصيب الثمار ويسبب تلفها ويصيب الازهار وبالتالي لا يمكن للمزارع خلال موسم النمو تميزه. وغالباً القشرة الخارجية سليمة ولكن محتواها الداخلي اجوف وتالف (khan واخرون،2021 وNirmal واخرون،2023). تشير الدراسات إلى أن أنواع *Aspergillus* spp وخاصة الأنواع المنتجة للسموم الفطرية مثل الافلاتوكسينات والاوكراتوكسينات لا تشكل فقط مجموعة من الفطريات المرتبطة بمرض تعفن ثمار الرمان المسؤولة عن تدهور الفاكهة، ولكنها تشكل أيضًا عامل خطر صحي لمستهلكي الثمار او المنتجات المصنعه من الرمان (Kanetis واخرون، 2015).

ولتقليل الخسائر الاقتصادية الكبيره المتسببة عنها المسببات المرضية لذا تم اللجوء الى استخدام الطرق الحيوية والمستحدثة في المكافحة على الرغم من فعالية المبيدات إلا ان هذا الاتجاه لا ينسجم مع الاستراتيجيات الحديثة التي تعمل على تقليل استخدام المبيدات لما لها من آثار سلبية على البيئة والأحياء غير المستهدفة وصحة الأنسان فضلاً عن ظهور السلالة المقاومة لفعلها ، لهذا ركزت معظم الدراسات على الكشف عن طرائق بديلة تمتاز بكفاءتها والمحافظة على النظام البيئي ومنها اللجوء الى الأحياء المضادة للمسببات المرضية والعمل على تطوير كفاءتها كاستراتيجية بديلة وقد تركزت معظم الدراسات الى استحداث دور الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* في مقاومة هذه الأمراض واظهرت هذه العوامل كفاءتها العالية ضد الاحياء الممرضة تحت الظروف المختبرية و الحد من تأثير المسببات المرضية تحت ظروف الحقل والمخزن (Naher واخرون، 2014).

ومن طرائق المكافحة الأخرى التي تستخدم حاليا في مقاومة المسببات المرضية لأمراض ما بعد الحصاد هي المستخلصات النباتية بوصفها بدائل واعدة عن طرائق المقاومة الكيميائية إذ اثبت العديد منها فاعلية في مقاومة المسببات الفطرية والبكتيرية وغيرها لكونها رخيصة الثمن وآمنة الاستخدام ولا تترك أية متبقيات سمية على النبات والثمار بالإضافة إلى سهولة الحصول عليها لتوفرها بكثرة في الطبيعة (كاظم واخرون، 2015).

ضمن المحاور الاتية :

- عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لمرض تعفن الثمار بالاعتماد على التشخيص المظهري
- تحديد اهم العزلات الفطرية المسببة للمرض والتي كانت أكثر ضراوة في احداث مرض تعفن ثمار الرمان، لاستخدامها في التجارب
- تحديد اكثر العزلات الفطرية انتاجا للسموم الفطرية وحفظها وتنميتها لإنتاج السموم .
- التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان. بطريقة الكشف عن تتابع القواعد النتروجينية لهذه العزلات ومقارنة تسلسلاتها مع تسلسلات العزلات العالمية باستعمال برنامج BLAST .
- تقييم كفاءة بعض العوامل الاحيائية والمبيدات ذات الأصل النباتي والمستخلصات النباتية ضد مهاجمة مسببات مرض تعفن ثمار الرمان (بالمختبر والحقل والمخزن)

2- مراجعة المصادر

2 -1: الاهمية الاقتصادية لمحصول الرمان :

يُعد الرمان احدى أقدم الثمار التي عرفها الانسان، وأدرك قيمتها الغذائية والعلاجية مبكراً، وقد ورد ذكره في القرآن الكريم في اكثر من سورة فذُكر في سورة الأنعام **((وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّاتٍ مَعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أُكُلُهُ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُتَشَابِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۚ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَآتُوا حَقَّهُ يَوْمَ حَصَادِهِ ۖ وَلَا تُسْرِفُوا ۚ إِنَّهُ لَا يُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ))** ﴿١٤١﴾ قال تعالى في سورة الرحمن **((فِيهِمَا فَاكِهَةٌ وَنَخْلٌ وَرُمَّانٌ))** ﴿٦٨﴾ على انه فاكهة اهل الجنة لفوائده الغذائية والصحية(المفلحي والزمير، 2016).

الاسم الإنكليزي لنبات الرمان هو Pomegranate ويسمى علميا *Punica granatum* وينتمي الى العائلة الرمانية *Punicaceae* , تضم جنساً واحداً وهو *Punica* ونوعين .هما *P.granatum* وهو النوع الذي يعطي ثماراً صالحة للأكل والنوع *P.protopunica* وهو النوع الذي يزرع كأشجار زينة نظراً لجمال أزهاره المتعددة البتلات ذات اللون الأحمر الزاهي (Pantiora واخرون،2023). والموطن الأصلي له إيران، ومنها انتقل الى الجزيرة العربية ثم باقي الدول العربية فإسبانيا ثم أمريكا (Zahedi واخرون، 2023). يزرع الرمان حالياً باليمن ومصر والعراق ولبنان والسعودية وسوريا وفلسطين، ويلائم انتاج الثمار شتاء ملائم للبرودة وصيف حار(العواضي، 2018).

زاد انتشار الرمان بشكل ملحوظ، خاصة بعد أن اثبت أن له خصائص مضادة للميكروبات والفيروسات. وله خصائص مضادة للسرطان ومضادات الأكسدة القوية ومقاومة الطفرات، تتكون ثمرة الرمان من ثلاثة أجزاء: البذرة والعصير والقشر, على وجه الخصوص يُستخدم القشر تقليديًا كعلاج طبيعي للأمراض المعدية (Jurenka، 2008).

يبلغ اجمالي انتاج الرمان في جميع انحاء العالم حوالي 8.1 مليون طن والمنتجون الرئيسيون هم الهند والصين وايران الذين يمثلون 70% من التجارة العالمية (Mincuzzi واخرون، 2022) قدر انتاج الرمان241671 طن في العراق للموسم الصيفي 2020 بأرتفاع قُدر نسبته 9.94%، عن انتاج العام الذي قبله حيث قدر انتاج العام 2019 بمقدار 219822 طن.(الجهاز المركزي للإحصاء ، وزارة الزراعة ،2021).

وهنالك أهمية طبية كبيرة لاشجار وثمار الرمان، فقد تبين أن أجزاء مختلفة من النبات مثل اللحاء والأوراق والفاكهة ومستخلص الفاكهة أو العصير وقشرة الفاكهة تظهر أنشطة طبية مختلفة (Al-MuammarوKhan، 2012). تستخدم أجزاء النبات لعلاج الأمراض والاضطرابات المختلفة، على سبيل المثال: من القرحة، لدغات الأفاعي، تلف الكبد، الزحار، الإسهال، داء الديدان الطفيلية، الحماض، النزف ومشاكل الجهاز التنفسي (Lansky و Newman، 2007). يتم استخدام البراعم المجففة والمسحوقة لعلاج أمراض الجهاز الهضمي, كما يُستخدم رماد نبات الرمان كوسيلة وقائية ضد العدوى الجلدية. ويستخدم المسحوق المحضر من قشرته كمسحوق للأسنان ويستخدم أيضًا في الصناعات التجميلية. يُظهر المستخلص المائي لقشر ثمار الرمان نشاطًا في التئام الجروح. يحتوي عصير الفاكهة أيضًا على خاصية غنية لمنع البروتين الدهني منخفض الكثافة (Jurenka، 2008). تُظهر المكونات النباتية الموجودة في الرمان أنشطة مضادة للأكسدة، ومضادة للطفيليات، ومضادة للبلهارزيا، ومضادة لمرض السكر، ومضادة للفيروسات، ومضادة للبكتيريا، ومضادة للالتهابات ومضادة للسرطان (Dassprakash واخرون، 2012)

2-2-: مرض تعفن ثمار الرمان

تتعرض ثمار الرمان لخطر المهاجمة من قبل العديد من الفطريات الممرضة مسببة الكثير من الامراض عند التخزين لفترات طويلة. يتعرض الرمان الى المهاجمة من مسببات الامراض المختلفة في مرحلة ما قبل او بعد الحصاد، مما له تأثير كبير على جودة الفاكهة وعمر التخزين مما يؤدي الى تلف الانسجة وذلك يجعل الفاكهة غير قابلة للبيع (Munhuweyi واخرون، 2016). من اهم هذه المسببات المرضية هي *Alternaria.alternata*، وأنواع عديدة من الجنس *Aspergellus* spp اذ تسبب امراض مختلفة على ثمار الرمان في جميع انحاء العالم ومن اهم هذه الامراض هو مرض العفن الاسود في الرمان (القلب الاسود) (Mincuzzi واخرون، 2022).

تصيب مسببات الأمراض الكامنة الفاكهة المستقبلية خلال مرحلة الإزهار وتبقى كامنة حتى تسمح لها الظروف البيئية والفسيولوجية المثلى بالتطور عادة، يحدث هذا خلال مراحل ما بعد الحصاد. ومن الأمراض الرئيسية التي تنسب إلى هذه المجموعة هي، القلب الأسود والعفن الأسود، والتي تمثل حوالي 65٪ من إجمالي الإصابات. تنتمي النسبة المتبقية إلى مسببات أمراض الجروح التي تخترق قشر الرمان وتصيب الفاكهة بعد الأحداث الناجمة عن سوء التعامل (Mincuzz واخرون، 2023).

كشفت الدراسات المسحية عن تسجيل الأمراض التي تصيب بساتين الرمان في الفترة من 2014 إلى 2016 في جنوب شرق الولايات المتحدة أن العديد من الأنواع الفطرية كانت مرتبطة بأمراض تعفن ثمار الرمان (Xavier واخرون، 2020). بينما سجل حالات مختلفة لامراض تعفن ثمار الرمان في كاليفورنيا والهند والعديد من دول البحر الأبيض المتوسط، بما في ذلك قبرص واليونان ومصر وإيطاليا، واشار التقدير الاولي للخسائر الناجمة سنويًا عن تعفن ثمار الرمان في إيطاليا. وبحسب التقرير الأولي للمرض في إيطاليا فإن نسبة الإصابة به في البساتين التجارية تتراوح من 1 إلى 9% من الفواكه (Aloi واخرون، 2021).

ان مـرض تعفـن القلـب الاسـود فـي الرمـان، المتسـبب عنـه *Alternaria alternata* ، سـجل لأول مـرة فـي الولايـات المتحـدة الامريكيـة والمكسـيك، كمـرض مابعـد الحصـاد فـي اليونـان إذ يغـزو الثمـار خـلال موسـم التزهيـر ويتبعهـا نمـو الفطريـات وايضـاً عنـد عقـد الثمـار (yehia واخـرون، 2013) وهـو أحـد أمـراض الرمـان الرئيسـية المهمـة التـي تنـتج فـي جميـع أنحـاء العـالم، يـتم مهاجمـه معظـم الثمـار فـي البسـاتين بواسـطة الفطـر *A. alternata* ولكـن تظهـر الأعـراض علـى نسـبة صـغيرة فقـط مـن الثمـار المهاجمـة. لـوحظ أنـه داخـل بعـض البسـاتين كـان ظهـور أعـراض المـرض علـى ثمـار الرمـان مرتبطًـا بـالمظهر البصـري للأشـجار فالأشـجار التـي بـدت ضـعيفة بصـريًا تحمـل ثمـارًا مصـابة بـالمرض أكثـر مـن الأشـجار القويـة (Ezra واخـرون، 2019). ففـي دراسـة اجريـت فـي اوربـا تـم اختيـار 12 إلـى 22 شـجرة فـي كـل بسـتان، بنـاءً علـى مظهرهـا البصـري اعتبـرت الأشـجار القويـة مقاومـة مـن الناحيـة الفسـيولوجية لمـرض *A. alternata* والأشـجار الضـعيفة معرضـة مـن الناحيـة الفسـيولوجية للإصـابة. وبعـدها تـم جمـع فاكهـة الرمـان التـي يشـتبه فـي إصـابتها بعفـن القلـب (أي الفاكهـة المشـوهة ذات الـوزن الخفيـف) بـين عـامي 2008 و2013 فـي سـتة مراكـز تعبئـة الثمـار واجريـت التجربـة مختبريـا بتقطيـع الفاكهـة بسـكين معقـم، وتـم وضـع الحبـوب المصـابة علـى وسـط أجـار دكسـتروز البطاطـا (PDA) حضـنت الأطبـاق عنـد درجـة حـرارة 25 مئويـة. بعـد 3-5 ايـام نمـت الهايفـات مـن الفطريـات المعزولـة علـى PDA وتـم عـزل انـواع الفطـر *Alternaria* spp تـم تشخيصـها علـى أسـاس الخصـائص المورفولوجيـة والمجهريـة، وبـذلك تـم تحديـد حـدوث ظهـور أعـراض تعفـن القلـب علـى الأشـجار والجـذوع او الاشـجار المقاومـة مـن الناحيـة الفسـيولوجية فـي أربعـة بسـاتين تجاريـة للرمـان قبـل موسـم الحصـاد (Ezra واخـرون، 2019).

فـي يوليـو 2012 و2013 تـم اسـتخدام 12 عزلـة مـن *Alternaria* تمثـل مجموعـات مختلفـة مـن الفطـر الممـرض تـم حقـن المعلقـات الكونيديـة لهـا (5 مـل مـن 2 ×10^{-5} جـراثيم / مل/مـاء) بحقنـة لعمـق 2 سـم فـي منطقـة الكـأس لكـل ثمـرة وخمـس ثمـرات لكـل عزلـة. تـم التحقـق مـن أعـراض الاصـابة بـتعفن القلـب *Alternaria* عـن طريـق وجـود كونيـديا الممـرض أو عـن طريـق إعـادة عـزل الممـرض مـن جديـد والتأكـد مـن الخصـائص

المظهرية للفطريات المعزولة (Luo واخرون، 2017). وفي دراسة في ايطاليا لاختبارات الامراضية لعزلتين من الفطر *A.alternata* تم إجراء حقن معلق الفطر بتركيز 5×10^{-4} /بوغ مل (0.5 مل / ثمرة) في منطقة الكأس وتم تلقيح عشر ثمار سيطرة بـ SDW. وبعد 12 يومًا عند درجة حرارة 25 درجة مئوية، أظهرت جميع الفاكهة الملقحة بالفطر أعراضًا مشابهة لتلك التي لوحظت في الفاكهة المصابة طبيعيًا. فان كلا العزلتين احدثت تحلل الحبوب دون التأثير على أغشية القشرة. ولم تظهر على ثمار السيطرة أي أعراض للإصابة. تم إعادة عزل الفطر فقط من الثمار التي تظهر عليها الأعراض، مما يؤكد فرضيات كوخ (Thomidis، 2015) لذلك اعتبر هذا المرض إيطاليا مصدر قلق كبير لتوسع صناعة الرمان أيضا بسبب صعوبة فحص الفاكهة المصابة على أساس الأعراض الخارجية (Faedda واخرون، 2015).

3-2: الاعراض المرضية و دورة مرض تعفن ثمار الرمان

إن الاعراض المرضية لمرض تعفن ثمار الرمان تبدا بالانتشار من منطقة الكأس بينما تحتفظ القشرة الخارجية بمظهرها الطبيعي .أذ يمكن التعرف على الثمار المصابة بعفن القلب حسب لون قشرتها ووزنها الخفيف، عندما يتم ضرب هذه الثمار فإنها تصدر صوتاً أجوفا على عكس الصوت الباهت الصادر عن الثمار السليمة .في هذا الوقت لا توجد مراقبة فعالة في البساتين ،وفي كثير من الحالات تصاب الثمار ذات المظهر الصحي بالمرض اثناء التخزين (Ezra واخرون، 2015) يصاب الرمان في مرحلة مبكرة من النضج، وينمو وينتشر داخل الثمرة أثناء نموها. بعد اختراق الرمان، يهاجم الثمرة عن طريق إنتاج إنزيمات محللة للبشرة والجدار الخلوي ومركبات المقاومة لإزالة السموم الموجودة في انسجة جدار الثمار، يؤدي التفاعل المعزز بين العامل الممرض والمضيف إلى حدوث تغييرات في العمليات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية نظرًا لأن مرض القلب الأسود الفطري ينمو داخل الثمرة دون التأثير على القشرة الخارجية للثمرة، فإن الفحص البصري لا يكون عادةً فعالاً في التعرف عليه (Nouri واخرون، 2020).

خلال عمليات المسح البايولوجي في مناطق إنتاج الرمان والحمضيات الرئيسية في ألبانيا، لوحظت أعراض مميزة لمرض تعفن ثمار الرمان. اذ تميزت ثمار الرمان المصابة بالعفن البني إلى الأسود الناعم مع جفاف الثمار، ويمكن رؤيته عند قطع الثمرة. عادةً، كان التعفن محصوراً في بعض الانسجة الداخلية ولم يؤثر على القشرة والحواجز. في حين أظهر القشر الخارجي أعراضًا غير محددة تتوافق مع التعفن الداخلي، مثل تغير اللون إلى اللون الأحمر الداكن والتجاعيد. وكانت الثمار المتضررة بشدة غير متماثلة وأخف وزنا (Cara واخرون، 2022).

ان لخسائر الرمان اهمية اقتصادية كبيرة قد قدرت نسبة الخسائر المتسببة عن الامراض ومنها مرض تعفن القلب الاسود في الهند. اذ تم تقدير خسائر الانتاج بنسبة 35% في الحقل اما بعد الحصاد 10% وفي دراسة احدث اعطت نتائج مماثلة بشأن خسائر بعد الحصاد، وفي جنوب افريقيا كانت النسبة 18% من خسائر الرمان عند الحصاد بشكل رئيسي بسبب الاضرار غير الحيوية في حين حدثت بنسبة 23% ،21% من خسائر الرمان من الحصاد وحتى المرحلة الاولى من النقل ومن النقل الى التسويق على التوالي.بالرغم من ان العديد من العوامل الحيوية وغير الحيوية قد تؤثر على القدرة الامراضية للمسببات المرضية (Mincuzzi واخرون، 2022).

من انواع الفطريات المهمة التي تصيب الرمان هي *Alternaria* كعوامل مسببة لتعفن ثمار الرمان، وعلى أساس التشخيص المظهري لأبواغ الممرض التي تكون محمولة جواً تحدث عدوى الزهور قبل ظهور الفاكهة، يمكن أن تظل العدوى كامنة لمعظم موسم النمو حتى تهيئة الظروف الملائمة، نظرًا لأن الثمار المصابة أكثر عرضة للسقوط (Aloi واخرون، 2021).

ومن المسببات المرضية الأخرى لمرض تعفن ثمار الرمان هي الانواع العائدة الى جنس *Aspergillus* والذي يكون منتجًا للعديد من السموم الفطرية. وهو أحد العوامل الرئيسية المسؤولة عن التلوث الزراعي بالسموم الفطرية. يعد *A.flavus* و*A.parasiticus* من الأنواع الرئيسية المنتجة لسموم الأفلاتوكسين، بينما يرتبط إنتاج الأوكراتوكسين *A* بشكل رئيسي بأنواع *A.niger* و *A.carbonarius* و

A.ochraceus فقد أشار Neamah واخرون (2020) بان أشجار الرمان تصاب بالعديد من مسببات الأمراض الفطرية مثل فطر *Aspergillus niger* الذي يعد من الفطريات المهمة الموجودة في جميع أنحاء العالم والموجودة في جميع الأنظمة البيئية. هناك أنواع مختلفة من *Aspergillus* تسبب امراض لثمار الرمان، على سبيل المثال. من المعروف أن *A.flavus* و*A.niger* و*A.terreus* و*A.fumigatus* و*A.ochraceus* معروفة كمنتجي للسموم الفطرية. ولذلك، فإن التشخيص الدقيق والصحيح لهذه الأنواع أمر مهم جداً لأن ذلك سيوفر دليلاً على أنواع السموم الفطرية المنتجة في الثمار.

يعتبر *A. niger* من بين اهم أنواع الفطر *Aspergillus* spp انتشارا وضررا فهو العامل الممرض الأكثر شيوعًا والمسؤول عن تلف ما بعد الحصاد في الفواكه والخضروات والعديد من المحاصيل ومن المعروف أيضًا أنه العامل المسبب للعفن الأسود لثمار الرمان (plascencia-Jatomea واخرون، 2014).

وكذلك ايضا أنواع *Alternaria* تعتبر من المسببات الرئيسة لمرض تعفن القلب الاسود في الرمان وبالتالي تسبب انخفاضات كبيرة في المحاصيل الزراعية ، وهذا يؤدي الى خسائر اقتصادية كبيرة ، ترجع أهمية هذا الجنس أيضًا إلى إنتاج أكثر من 70 نوعاً من مركبات الايض الثانوية والسموم الفطرية المسببة لإضرار بالغة على الانسان (Cara واخرون، 2022).

اشارات دراسة عدة ان *A.alternata* هو العامل الممرض الاكثر شيوعا وإمراضيه والمسبب عن تلف الرمان ماقبل وبعد الحصاد ، إن جميع العزلات التي تم اختبارها لكل من *A.alternata* و *A.arborescens* كانت مسببة للأمراض وتسببت في أعراض نموذجية لتعفن القلب في ثمار الرمان واكدت ان *A.alternata* و *A. arborescens* هما المسؤولان عن مرض تعفن القلب في الرمان في جنوب إيطاليا (Aloiواخرون، 2021).

وفي كاليفورنيا، زادت حالات الإصابة بعفن القلب الاسود مع زيادة الإنتاج في السنوات الأخيرة وقد تم وصف مسببات الامراض على انها *Alternaria*

A.arborescens E. G. Simmons, A. alternata (Fr.) Keissl. tenuissima (Kunze) Wiltshire, Alternaria sp *Alternaria* spp. *Similarly* في كاليفورنيا تم تشخيص *Alternaria alternate* على انه المسبب الرئيسي من خلال التشخيص المظهري بالاعتماد على حجم وشكل البوغ والسلاسل والتفرعات (Luo واخرون، 2017).

4-2: السموم الفطرية (Mycotoxins) المصاحبة لفاكهة ثمار الرمان:

هي مركبات أيض فطرية ثانوية ذات اوزان جزيئة منخفضة تمتاز بأنها شديدة الثابتية لدرجات الحرارة العالية وكذلك مقاومة للأشعة فوق البنفسجية. وهي منتجات ضارة لها تأثيرات اقتصادية كبيرة (Yunواخرون،2022) وتعتبر سموم طبيعية لها مخاطر على الصحة تنتجها أنواع مختلفة من الفطريات تحت ظروف بيئية معينة وهي مواد سمية ومسرطنة للكبد واغلب أعضاء الجسم .تنتج السموم الفطرية تحت درجات الحرارة والرطوبة المرتفعة تنقسم السموم الفطرية على نطاق واسع الى مجموعتين رئيسيتين على أساس الفطريات المنتجة للسموم الفطرية ،أي فطريات تغزو في الحقل قبل الحصاد والفطريات التي تغزو بعد الحصاد اثناء التخزين(Zahraواخرون،2019). ويمكن ان تدخل سلسلتنا الغذائية اما مباشرة من خلال المكونات الغذائية الملوثة بالسموم الفطرية او عن طريق التلوث غير المباشر من نمو الفطريات السامه على الغذاء (Alshannaq واخرون، 2017).

يعتمد تأثُّير السموم الفطرُّية Mycotoxins على نوع السم واستقلابه وتراكم السموم الفطرُّية وظروف التعرض والعمر والجنس والحالة الصحية للفرد المعرض، وإن وجودها فَّي طعام الإنسان وعلف الحيوانات تمثل مصدر قلق كبير، لُّيس فقط بسبب التأثُّير السلبَّي على صحة الانسان والحيوان، ولكن ايًضا للتأثُّير العميق لخسائر المحاصيل الملوثة على الاقتصاد العالمَّي(Lopez –Arceوآخرون, 2020).

تصاب فاكهة الرمان بالعديد من الفطريات قبل وبعد الحصاد والتي تكون لها القدرة على انتاج السموم الفطرية، فطريات ما بعد الحصاد والتخزين الشائعة للفواكه هي *Penicillium* spp ،*Fusarium* spp ،*Aspergillus* spp. ،*Alternaria* spp.

الفطريات الرئيسية المنتجة للسموم الفطرية ليست مسببات الأمراض العدوانية في النباتات ومع ذلك يتم إنتاج السموم الفطرية بواسطة عدة أجناس في النباتات خلال موسم النمو عندما تكون الظروف البيئية مناسبة، ويستمر إنتاجها أو البدء بها في منتجات ما بعد الحصاد والمخزن. يتم إنتاج غالبية هذه السموم عن طريق الفطريات من أجناس *Aspergillus* و*Penicillium* و*Fusarium*. غالبًا ما يتم تصنيف أنواع *Alternaria*و*Fusarium* السامة على أنها فطريات حقلية لأنها تتطلب محتوى رطوبة عاليًا للنمو وانتاج السموم الفطرية. كما تنمو فطريات التخزين، وخاصة أنواع *Aspergillus* ، و*Penicillium* بشكل جيد عند انخفاض نسبة الرطوبة (Ammar و El-Naggar، 2017).

اشارات دراسة في قبرص الى وجود انواع من السموم الفطرية وجدت في الرمان منها *Alternariol (AOH)*، *alternariol monomethyl-ether (AME)* ، *ochratoxin A (OTA) and fumonisin tentoxin (TEN)*

السموم الفطرية الأكثر شيوعًا التي تنتجها *Alternaria* spp. هي (AOH) (TEA) (TEN) (ALT) (AME)وقد تم اكتشافها في العديد من المواد الغذائية على الرغم من أن السمية الحادة للسموم الفطرية *Alternaria* تعتبر منخفضة في الثدييات، إلا أن هناك أدلة قوية على انها قد تكون مسببة للطفرات ومسرطنة (López واخرون، 2016) وكذلك سموم *Ochratoxin* الذي يكون المنتج الرئيسي لها هو *niger Aspergillus* والتي تعتبر من السموم الفطرية المهمة لكون لها تأثيرات سلبية على صحة الانسان من خلال تأثيراته على الجهاز المناعي والكبد والكلى وتشوية الجينات (Heperkan واخرون، 2023).

5-2 : السموم الفطرية المنتجة من قبل الفطر *Alternaria* والفطر *Aspergillus*

يعتبر *Alternaria* من اهم انواع الفطريات الممرضة للنباتات التي تصيب مدى واسع من المحاصيل المهمة والفواكه قبل الحصاد (بالحقل) وبعد الحصاد (اثناء التخزين) ولكنه يعيش أيضا في تكافل بدون أعراض باعتباره ينمو داخليًا للعديد من

النباتات ونظرًا لانتشار النمو الداخلي من المهم جدا السيطرة على التغييرات البيئية غير الحيوية التي قد تتسبب في تحول العدوى بدون أعراض إلى التطفل (DeMers،2022).

تعتبر بعض أنواع الفطر *Alternaria* قادرة على إنتاج العديد من مركبات الايض الثانوية السامة، المعروفة باسم السموم الفطرية التي تلوث السلع الغذائية المخزنة نظرًا لقدرتها على النمو وإنتاج السموم في درجات حرارة منخفضة، فإنها يمكن أن تكون ملوثات خطيرة للمواد الخام الزراعية أو المنتجات المصنعة والمحاصيل بعد الجني حتى في ظل ظروف التبريد (Andersen واخرون، 2006).

تعد سموم *Alternariol* من السموم الرئيسة والاكثر انتشاراً في ثمار الرمان وذات تأثيرات مهمة وسلبية محتملة على الانسان عند تناول الفاكهة او الغذاء الملوث والمنتج الرئيسي لها هو الفطر *Alternaria* هذه السموم يمكن ان تسبب مشاكل صحية حادة ومزمنة ويكون اكتشاف سموم *Alternariol* وتشخيصها امراً صعب بسبب تراكيزها واوزانها الجزيئية المنخفضة (Bachaواخرون، 2023).

قدرت تراكيز سموم الـ *Alternariol* في ثمار الرمان الملقحة صناعيًا بعزلات مختلفة من أنواع *Alternaria alternata* والمعروفة بإنتاج السموم الفطرية المستهدفة في المزارع النقية، وتم العثور على تركيزات *Alternariol* تتراوح من 0.3 إلى 50.5 ميكروغرام / غرام و*Alternariol Monomethyl ether* من 0.5 إلى 32.3 ميكروغرام / غرام (Myresiotis واخرون، 2015).

تعددت الدراسات حول الطفرات والسمية الجينية للألترايول وإيثر مونوميثيل الألترناريول. تم التعرف على Alternariol باعتباره قد يساهم في إضعاف سلامة الحمض النووي في خلايا سرطان القولون البشرية. تعتمد الطرق التحليلية لتحديد سموم *Alternaria* إلى حد كبير على الإجراءات التي تتضمن التنظيف عن طريق تقسيم المذيبات أو استخلاص الطور الصلب، تليها تقنيات الفصل الكروماتوغرافي بالاشتراك مع الأشعة فوق البنفسجية والفلورية والكشف الكهروكيميائي والطيف الكتلي. تم الإبلاغ عن وجود عدد كبير من مستقلبات الألترناريول بشكل طبيعي في

السلع الغذائية (مثل الفواكه والخضروات والحبوب والنباتات الزيتية) (Ostry، 2008).

بينما يعد الفطر *Aspergillus* من اهم انواع الفطريات الممرضة للنباتات التي تصيب مدى واسع من المحاصيل المهمة والفواكه قبل الحصاد وبعد الحصاد له أنواع مختلفة، على سبيل المثال. *A.flavus*، *A.niger* ، *A.terreus*، *A. fumigatus* هم من منتجي السموم الفطرية المشهورين(Neamah واخرون، 2020).

العديد من أنواعه قادرة على إنتاج مجموعة واسعة من السموم الفطرية الضارة بالبشر والحيوانات التي تستهلكها. السموم الفطرية الرئيسية المرتبطة بأنواع ا *Aspergillus* في الفواكه والخضروات هي الأفلاتوكسينات التي تنتج بشكل رئيسي عن طريق سلالات *A.flavus* و *A.*parasiticus في التين والتمر، والأوكراتوكسين A(OTA)الذي تنتجه *A.Carbonarius* وغيرها من *Aspergillus* المولدة للسموم في العنب والكرمة المجففة والفواكه والرمان تعتبر بعض السموم الفطرية التي تنتجها أنواع *Aspergillus* خلال مراحل نموها في الفواكه والخضروات من أهم السموم الفطرية المسرطنة وهي سموم الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين (2008,Barkai).

يعتبر سم OTA من أكثر أنواع *Ochratoxin* أنتشارا وسمية(Liu وWei، 2022) غالباً ما يتم العثور علّيه فًي العدّيد من السلع الغذائية بما فًي ذلك الحبوب والمكسرات والفواكه المجففة (Zhang واخرون،2020) التي تعد من أهم العوامل المساهمة فًي التعرض الغذائي المزمن للاوكوتوكسين(EFSA واخرون، 2020) وبالتالي فهو جزء من السم الذي يتم تناوله يوميا مما جعل التقييم الصحيح للمخاطر أمرا ضروريا (Schulz، 2020) فان سموم الأوكراتوكسين تعتبر ملوثا طبيعيًا للأغذية والأعلاف المتعفنة. تشكل التأثيرات السامة المتعددة لـ OTA تهديدًا حقيقيًا للإنسان وصحة الحيوان. على سبيل المثال، يمكن أن يسبب OTA اضرار على الانسان او أن يصاب البشر المعرضون لـ OTA (لا سيما عن طريق الاستنشاق في تطور الفشل الكلوي الحاد خلال 24 ساعة) بمجموعة من الاضطرابات المزمنة مثل

سرطان الظهارة البولية العلوي، كما يلعب OTA دورًا رئيسيًا في التسبب في بعض أمراض الكلى بما في ذلك اعتلال الكلية المتوطن في دول البلقان وأورام الكلى يحدث في بعض المناطق المستوطنة في شبه جزيرة البلقان، واعتلال الكلية الخلالي المزمن الذي يحدث في بلدان شمال أفريقيا ومن المحتمل أن يحدث في أجزاء أخرى من العالم. يؤدي OTA إلى تكوين مقارب الحمض النووي، وهو معروف بسميته الجينية وتسببه في السرطان (Malirواخرون، 2016).

في دراسة اجريت في قبرص واليونان لتحديد قدرة الفطريات على انتاج السموم الفطرية المرتبطة بعفن ثمار الرمان قبل وبعد الحصاد فقد تم فحص إمكاناتها في إنتاج السموم الفطرية، تم تقديرتراكيز الأوكراتوكسين A OTA والفومونيزين B2 FB2 داخل*Aspergillus* التي تم تحديدها بشكل عام أنتجت 89% من عزلات الإلترناريا AOH وAME في المختبر، في حين تم إنتاج TEN بنسبة 43.9% فقط. في الجسم الحي، تم تقييد إنتاج AOH وAME إلى 54.2% و31.6% فان الفطريات *Alternaria* و*Aspergillus* ذات السموم الفطرية لا تشكل فقط مجموعة من الفطريات المرتبطة بعفن ثمار الرمان المسؤولة عن تدهور الفاكهة، ولكنها تشكل أيضا عامل خطر صحي محتمل لمستهلكي المنتجات المعتمدة على الرمان (Kanetis واخرون، 2015).

بينما حضيت سموم الأفلاتوكسين باهتمام أكثر لما عرفت به من قابليتها المسرطنة للإنسان والحيوان، وأن أغلب حالات التسممات الحادة والمزمنة بهذه السموم ترجع إلى تلوث المنتجات الغذائية النباتية بالفطر *flavus*. *A* و *A.parasiticus* في الحقل أو خلال الحصاد والخزن وبخاصة عندما تكون هذه المنتجات مخزونة تحت ظروف رطبة (Kitigwa، 2023). ينتج الفطر *flavus*. *A* الأفلاتوكسينات B1 و B2 أما الفطر *A.parasiticus* فينتج أيضاً G1 و G2 والأفلاتوكسين B1 هو الأكثر خطورة إذ هو المسرطن والمسبب لتلف الكبد للإنسان والحيوان وعلى الرغم من أن عملية تكوين السموم الفطرية مسيطر عليها وراثياً إلا أنها تعتمد اعتماداً مباشراً على المواد الأولية المغذية وعلى العوامل البيئية Environmental factors ويبدو أن وجود

حلقة اللاكتون في جزيئة الأفلاتوكسين هي المسؤولة عن الثبات الكيميائي والحراري للجزيئة (Kitigwa، 2023).

وتعد كل من درجة الحرارة والرطوبة في الثمار المخزونة أهم عاملين يحددان نمو الفطر وإنتاج الأفلاتوكسين وتعتبر الرطوبة المناسبة 85% فأعلى أما أقل درجة حرارة ينمو فيها الفطر فهي 12م والمثلىْ27م وأعلى درجة كانت من 40-42ْم أن إنتاج الأفلاتوكسين يتم عند وجود رطوبة نسبية عالية ودرجات الحرارة تتراوح بين 25-30ْم ، ويمكن أن تنتج هذه السموم عند درجة حرارة 8-10ْم بكميات قليلة وبوقت أطول هذا وان حدوث التلوث بالافلاتوكسين لا يقتصر على المخزن فقط لكنه يحدث أيضاً في الحقل وعلى مدى واسع من النباتات (FAO/WHO،2002) وذهبت دراسات أخرى إلى أن التلوث بالأفلاتوكسين يحدث في الحقل وأثناء الحصاد والتجفيف والنقل والخزن وأثناء عملية تصنيع المنتجات الزراعية (Abdel-Sater واخرون،2017).

إن الحد المسموح بتواجد الأفلاتوكسين في الأغذية حسب توصيات المنظمات العالمية يجب إلا يزيد عن 10 مايكروغرام/كغم ، وهذا ما أدى إلى التفكير الجاد في البحث عن طرائق فعالة للسيطرة على انتاج الأفلاتوكسين والتخلص من آثاره في الأغذية والأعلاف وحماية الإنسان والحيوان من مخاطر هذه السموم فإن الإدارة الصحيحة للمنتجات الزراعية والمراقبة والإشراف الواسعين لا تمثل الحل الوحيد لمشكلة التلوث ، لذلك فان حماية الأغذية والأعلاف من التلوث بالأفلاتوكسين أصبح موضوعاً ملحاً وضرورياً وكان لابد من تطوير آليات مفيدة وفعالة لتحطيم الأفلاتوكسين وتضمنت هذه الآليات المعالجات الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية (FAO/WHO،2002).

6-2 : طرق مكافحة مرض تعفن ثمار الرمان

تسبب أمراض النبات خسائر فادحة في الإنتاج الزراعي وتؤثر بشكل مباشر على اقتصاد العديد من البلدان اذ انخفض انتاج المحاصيل والفواكه بشكل كبير متأثرة بمسببات الأمراض (Asad،2022) لا يزال الرمان يعتبر محصولًا ثانويًا لذا فإن

مبيدات الفطريات التقليدية والبديلة المسجلة لهذا المحصول تكون نادرة. هذا له عائد مهم بعد الحصاد وخسائر اقتصادية تتعلق بشكل رئيسي بالأمراض الفطرية. الخسائر تكون واضحة في مرحلة ما بعد الحصاد إلا أن معظم الإصابات تبدأ في الحقل خلال مرحلة الإزهار لذلك هناك حاجة إلى ادارة متكاملة ما قبل الحصاد للسيطرة عليها. تحدث العدوى المتبقية بسبب مسببات أمراض الجروح التي تهاجم الفاكهة من خلال الإصابات إن آثار الممارسات الزراعية الجيدة، ومعاملات ما قبل الحصاد خلال مرحلة الإزهار وفرز الفاكهة على طول سلسلة الإنتاج وظروف التخزين المثالية وظروف النظافة الجيدة تقلل من حدوث تعفن الرمان بعد الحصاد وتزيد من توافر الرمان التجاري تعني المكافحة البديلة مهمة جدا للحد من حالات الإصابة بمرض الرمان بعد الحصاد والدفاع عن صحة الإنسان والحيوان من خلال بقايا مبيدات الفطريات والسموم الفطرية وضمان اتباع نهج الصحة الواحدة لتوفير إنتاج الطعام (Mincuzzi واخرون، 2023).

أشارت دراسة أخرى أنه يمكن أن يكون تطبيق ما بعد الحصاد فعالاً في الحد من الإصابات الأولية التي تسببها مسببات أمراض الجروح والإصابات الثانوية. تم تسليط الضوء على أهمية توقيت التطبيق وفقا لمسببات الأمراض المستهدفة من قبل (Pala واخرون، 2009) الذين قاموا بتقييم، لمدة عامين متتاليين، لمبيدات الفطريات نفسها في برنامجين مختلفين مجدولين، لا سيما أن رش الرمان بشكل رئيسي خلال مرحلة الإزهار كان أكثر فعالية في السيطرة على الفطر *Alternaria* وغيرها من مسببات الامراض (Mincuzzi واخرون، 2023).

2-6-1: المكافحة الكيميائية

وهي طريقة فعالة وعملية، لكن نظرًا للآثار السلبية لمبيدات الفطريات على البيئة وصحة الإنسان ومشاكل متبقياتها على المخلفات وبالتالي تؤثر على الحيوان، أصبح البحث عن طرق مكافحة بديلة امنة إلزاميًا في السنوات الأخيرة، أصبحت هناك إمكانية كبيرة استخدام المضادات الميكروبية، الصديقة للبيئة وصحة الإنسان والمستخلصات النباتية أو المضادات الحيوية، والمواد الشبيهة بالإنزيمات التي تنتجها،

والتي قد تكون بديلاً للمكافحة الكيميائية مع عدم ترك متبقيات في التربة ولا خطر على الدوام (Tekinerواخرون، 2020).

2-6-2: المكافحة الميكانيكية

احدى طرق الممارسات الزراعية الوقائية هي هز الأشجار قبل الحصاد. يعد التحديد الدقيق للعامل المسبب لتعفن ثمار الرمان أمرًا بالغ الأهمية لجميع الجوانب المتعلقة بعلم الأوبئة وإدارة المرض. لسوء الحظ، فإن تصنيف الفطر *Alternaria* يمثل مشكلة وقد خضع لعدة مراجعات وترتبط الصعوبات في تحديد هذا الجنس على مستوى الأنواع بالطرق المورفولوجيا لمعظم أنواعها (Aloi واخرون، 2021).

3-6-2: المكافحة الحيوية:

تم تطوير المكافحة البيولوجية في الآونة الاخيرة كبديل لمبيدات الفطريات الكيميائية وتم تحقيق نجاح كبير من خلال استخدام الكائنات الحية الدقيقة المضادة للسيطرة على أمراض ما بعد الحصاد (Gholamnejad واخرون، 2009). وعلى الرغم من فعالية المبيدات إلا ان هذا الاتجاه لا ينسجم مع الاستراتيجيات الحديثة التي تعمل على تقليل استخدام المبيدات لما لها من آثار سلبية على البيئة والأحياء غير المستهدفة وصحة الأنسان فضلاً عن ظهور السلالة المقاومة لفعلها ، لهذا ركزت معظم الدراسات على الكشف عن طرائق بديلة تمتاز بكفاءتها والمحافظة على النظام البيئي ومنها اللجوء الى الأحياء المضادة للمسببات المرضية والعمل على تطوير كفاءتها كاستراتيجية بديلة وقد تركزت معظم الدراسات على انواع الفطر . *Trichoderma* spp والذي شخصت انواع عدة منه مثل *T.harziau* و *T.Pseudokoningii* بالإضافة الى استحداث دور الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* في مقاومة هذه الأمراض واظهرت هذه العوامل كفاءتها العالية ضد احياء التربة الممرضة تحت الظروف المختبرية و الحد من تأثير المسببات المرضية تحت ظروف البيت الزجاجي والحقل (Naher واخرون، 2014).

استعملت خميرة *S. cerevisiae* في العديد من البحوث لسهولة التعامل معها وقدرتها على النمو في رقم هيدروجيني واسع المدى وكذلك تنمو في الظروف الهوائية واللاهوائية إلا إن النمو في الظروف اللاهوائية اقل سرعة منه في الظروف الهوائية (Persons واخرون، 2013) تنمو خميرة *S.cerevisiae* بصورة جيدة بدرجة حرارة 37ْم وتتراوح درجة الحرارة المثلى لها بين 25 – 30ْم للخميرة دور مهم في ايض السكريات إلى غاز ثنائي اوكسيد الكربون CO2 وماء H2O في الظروف الهوائية أما في الظروف اللاهوائية فتؤدي إلى إنتاج الكحول الاثيلي نتيجة تخمرات السكر وتكون الطاقة المنتجة في الظروف الهوائية أكثر من تلك المنتجة في الظروف اللاهوائية (El-Nady وShalaby ، 2008) .

إذ نالت المكافحة الحيوية للمسببات المرضية الكامنة في التربة اهتماما واسعا من العديد من الباحثين و من بين الكائنات الحية المستخدمة في مجال المكافحة الأحيائية التي حضت باهتمام خاص هي الخميرة ومن طرائق المكافحة الأخرى التي تستخدم حاليا في مقاومة المسببات المرضية هي المستخلصات النباتية بوصفها بدائل واعدة عن طرائق المقاومة الكيميائية إذ اثبت العديد منها فاعلية في مقاومة المسببات الفطرية والبكتيرية وغيرها لكونها رخيصة الثمن وآمنة الاستخدام ولا تترك أية متبقيات سمية على النبات بالإضافة إلى سهولة الحصول عليها لتوفرها بكثرة في الطبيعة (كاظم واخرون، 2015).

2-7: تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطريات الممرضة

تعد النباتات الطبية مصدراً مهماً للمركبات الحيوية الفعالة ذات القيمة العلاجية للعديد من الأمراض استخدمت النباتات الطبية ومنذ العصور القديمة كمواد حافظه للمواد الغذائية لما تمتلكه من خصائص ضد التلوث فضلا عن أنها مطهرة(Al- Niaame وAziz،2013) تحتوي النباتات الطبية والعطرية على مركبات عديدة مثل الفينولات والفلافونويدات والقلويدات والبروتينات ومشتقات استبدال الأوكسجين (Cowan، 1999) تعود فاعلية المستخلصات النباتية للنباتات الطبية والعطرية لاحتوائها على مواد فعالة تؤثر في نمو الميكروبات والفطريات والبكتريا المسببة للأمراض وهذه

المركبات الفعالة ناتجة عن عملية التمثيل الضوئي (Doughariواخرون،2008) في حين بينت نتائج دراسة أخرى أن المستخلصات النباتية لنبات الكزبرة ذات فعالية تثبيطيه عالية بلغت 78.16% تجاه الفطريات وحقق المستخلص الكحولي أكثر فاعلية في تثبيط نمو الفطريات الممرضة المدروسة مقارنة بالمستخلصات الإستونية والمائية وكان للتركيز 20 ميكرولتر/مل للمستخلصات الثالثة فعالية عالية في تثبيط نمو الفطريات. كما ظهر فطر *Aspergillus* أكثر حساسية للمستخلصات الإستونية والإيثانولية مقارنة بالفطرين *Fusarium* و *Penicillium* (محمد،2019).

لقد أُجريت العديد من الدراسات التي تشير الى فعالية المستخلصات النباتية تجاه نمو الفطرين *Aspergillus* و *Alternaria* وانتاج السموم فقد أشار Pundriو Jain(2010). إلى أنّ المستخلص الكحولي لنبات القرنفل يمتلك فعالية تثبيط تجاه نمو هايفات الفطر*A.flavus*. في حين اثبت تأثير عدة انواع من الزيوت الطيارة منها الزيت الطيار لنبات الدارسين والزعتروالكمون التي ثبطت نمو الفطر *A. parasiticus* والزيوت الطيارة لكل من الكزبرة والفلفل الاسود فعالة ايضا في تأثيرها على انتاج الافلاتوكسين وفعالة في تثبيط عملية تخليق الافلاتوكسين اكثر من فعاليتها ضد نمو الفطر, وقد وجد ان الزيوت المستخلصة من الزعتروالدارسين ثبطت نمو انواع من جنس *Aspergillus* (زعيط وابوالغيث، 2021).

تمت دراسة التأثير التثبيطي للمستخلصات الكحولية لنباتي الميرمية *Salvia officinalis* والنعناع *Mentha longifolia*. تم اختبار خمس تراكيز لكل نوع من هذه المستخلصات (5%، 10%، 15%، 20%، 25%) لتأثيرها في تثبيط النمو الفطري لأربعة أنواع من الفطريات الخيطية المعزولة من التربة *A.niger*، *P.chrysogenum*، *F.solani*، *A.alternata*على الوسط الغذائي SDA في المختبر، أظهرت النتائج أن لمستخلصات الإيثانول من النباتين كلاهما تأثير مثبط لنمو الفطريات على الوسط الغذائي،حيث أعطى مستخلص نبات النعناع بتركيز 25% أعلى نسبة تثبيط للفطر *A. niger* إذ بلغت 61.09%، كما أن التأثير التثبيطي لكلاهما المستخلصين النباتيين يزداد مع زيادة التركيز، وأظهرت اختبارات الكشف الكيميائي فعاليتهما. باحتوائها على مواد فعالة مضادة ومثبطه لنمو الفطريات مثل الفلافونويد،

والجليكوسيدات، والزيوت الطيارة جاءت التوصية باستخدام هذه المستخلصات النباتية كبديل لمبيدات الفطريات الكيميائية بسبب فعاليتها وانخفاض التكلفة، وتطبيقها الآمن، وعدم وجود آثار ضارة على البيئة (AhamdiوAbuaziza،2023).

2-8: التطبيقات الزراعية للسيطرة على مرض تعفن ثمار الرمان

2-8-1: تطبيقات ما قبل الحصاد

تبدأ العدوى في البستان. وبالتالي، فإن ممارسات إدارة مرض ما قبل الحصاد مهمة جدًا للسيطرة على أمراض ما بعد الحصاد على الرمان تعتبر أنظمة الري مهمة لتقليل الشقوق حتى الجروح الدقيقة، والتي يمكن أن تكون فرصا لعدوى مسببات أمراض الجروح. إذا تم إجراء التقليم المناسب في البستان فإنه يؤدي إلى تحسين التهوية مما يقلل من الرطوبة التي ثبت أنها تمنع العدوى عن طريق مسببات الأمراض الفطرية. يعد التسميد المتوازن لتجنب الإفراط في النيتروجين ممارسة معروفة لتقليل الأمراض التي تصيب العديد من المحاصيل ومع ذلك فإن التغذية بالكالسيوم لها أهمية كبيرة لعمر تخزيني طويل وصحي للرمان يُعد التطبيق المباشر لرش الكالسيوم على الأشجار خلال موسم النمو وسيلة فعالة لزيادة محتوى الكالسيوم في الفاكهة لتأخير تعفن الفاكهة المخزنة (Conway واخرون،2001) يؤدي رش مبيدات الفطريات في وقت التزهير إلى تقليل حالات العدوى الكامنة بواسطة *Botrytis.cinerea* و*Alternaria* spp. والتي قد تساعد في تقليل امراض ما بعد الحصاد. يتم رش مبيدات الفطريات لاحقًا قبل أسبوع إلى أسبوعين من الحصاد، مما يقلل من امراض ما بعد الحصاد (Kinayواخرون، 2012).

2-8-2: تطبيقات بعد الحصاد

يعد الرمان فاكهة غير مناخية، فيجب قطفه عندما ينضج تمامًا للحصول على أفضل نكهة Teksur(2015)ولإطالة عمر ثمار الرمان بعد الحصاد يتم بالفعل تطبيق بعض ممارسات ما بعد الحصاد بشكل شائع في بعض البلدان، يتم تخزين الرمان دون معالجات ما بعد الحصاد (الغسيل والتشميع ومبيدات الفطريات). يتم فرز الثمار

المحصودة بلطف وتنعيم الأجزاء التاجية في بعض المنشآت ثم تغليفها في أكياس مغطاة بالبولي إيثيلين أو وضعها في صناديق لتأخير فقدان الرطوبة والوزن، وبعد تبريدها تحفظ في درجات حرارة باردة. يتم التخلص بعناية من الفاكهة التي بها اضطرابات مثل القشور المحروقة بالشمس، أو الانقسامات، أو الشقوق، أو حرق القشور، لأنها يمكن أن تكون فرصًا للعدوى لمسببات الأمراض المتعفنة. من الأمور المهمة المتعلقة بتطبيقات ما بعد الحصاد الرطوبة، إذا تم غسل الفاكهة في غرف التعبئة لتطهير السطح، أن الأجزاء الزهرية من الفاكهة تصبح مبللة بسبب بنية الزهرة المفتوحة. إذا لم يتم تجفيفها بعد الغسيل، فإن الرطوبة تحفز العدوى أثناء التخزين اللاحق، وخاصة العفن الرمادي، وفي بعض الحالات قد تسبب التخمر داخل الفاكهة (Selcukو Erkan، 2014).

2-9: طرق تخزين ثمار الرمان وطرق المكافحة بالمخزن للسيطرة من امراض تعفن الثمار

أن فاكهة الرمان يتم إنتاجها في فترة قصيرة من العام، فإن اعتماد ظروف التخزين المثلى أمر أساسي: على سبيل المثال، يمكن وضع الفاكهة في كيس بلاستيكي مثقوب بشكل دقيق وتنظيمها في طبقة واحدة، ويفضل أن يكون ذلك في صناديق من الورق المقوى (Arendse، 2014). وعلاوة على ذلك، اعتمادا على الأصناف، فإن درجة الحرارة 7-8 درجة مئوية، والرطوبة النسبية 90-95٪ ينبغي أن تسمح بفترة تخزين تتراوح بين 4 و 6 أشهر. تعتبر هذه المرحلة الأخيرة حرجة حيث قد تحدث خسائر فادحة، ناجمة بشكل رئيسي عن مسببات الأمراض الفطرية (Selcukو Erkan، 2014).

في دراسة في ايران تم جمع الرمان من مزرعة في أصفهان وتم تخزينه على الفور في ظروف التبريد قبل التجارب. تم اختيار الثمار بشكل جيد وموحد الحجم وغسلها في محلول الكلور (200 ميكرولتر / لتر) لمدة عشر دقائق، ثم غسلها بالماء المقطر وأخيراً تجفيف الثمار بالهواء المضغوط. تم حفظ العينات بدون أي تغليف في مكان مظلم عند درجة حرارة 4 درجات مئوية ورطوبة نسبية 90٪ أثناء التخزين. ثم

تم توزيع الثمار بشكل عشوائي .فأدى الى منعها من مسببات تعفن الثمار بشكل كامل (Lotfi واخرون،2022).

استخدام المعالجات الحرارية بعد الحصاد للسيطرة على التحلل الفطري بعد الحصاد له أهمية متزايدة كبديل لمبيدات الفطريات التقليدية. اذ يتم تطبيق الحرارة عن طريق الهواء الدافئ أو يتم استخدام الماء الساخن. بشكل عام، للسيطرة على التحلل الفطري , يتم تطبيق الماء الساخن على الفواكه والخضروات عن طريق غمسها في الماء الساخن , وبالفعل طبقت المعالجة الحرارية على ثمار الرمان بعد الحصاد في بعض الدراسات بالاشتراك مع مبيدات الفطريات أو أملاح البيكربونات وكانت النتائج تشير الى فعالية هذه الأساليب ضد الفطريات المسببة لمرض تعفن ثمار الرمان (Selcuk وErkan ، 2014).

تظهر ظروف التخزين المثالية لفاكهة الرمان اختلافات طفيفة باختلاف الأصناف،حيث ظروف التخزين الموصى بها لـ Mollar و"Wonderful" هي تخزين حوالي 2-3 أشهر،(Küpper واخرون, 1994) بينما بالنسبة لـ "Hicaznar" يوصى بدرجة حرارة 6 درجات مئوية مع رطوبة نسبية تبلغ حوالي 90-95٪ لتقليل فقدان الوزن للتخزين طويل المدى لمدة تصل إلى 5 أشهر (Artés واخرون , 2000).

2-10: الكشف عن السموم الفطرية بطريقة الكروماتوغرافي السائل عالي الاداء (HPLC) High performance Liquid chromatographic

هي عبارة عن اداة تحليلية جديدة للسموم الفطرية تعتمد على التركيب الكيميائي والتركيب الفيزياوي لتلك السموم ويتم الفصل والتقنية على اساس الاقطاب تتم باستخدام نوعين من الاعمدة تستخدم الاعمدة الصغيرة للعينات اما الكبيرة تستخدم لمستخلصات السموم الفطرية .وتعتمد هذه الطريقة على نشر العينة المراد فحصها بين طورين احدهما متغير ويكون سائلاً او صلباً. وتعد من الطرق ذات الحساسية والدقة العالية للتشخيص النوعي والتقدير الكمي للسم . تتطلب هذه الطريقة معدات مكلفة بالاضافة الى عمليات التنظيف المستمرة ولقد استعملت هذه الطريقة في العديد من

الابحـاث مثـل تحليـل التواجـد الطبيعـي للسـموم HPLC وكانـت مسـتويات هـذه السـموم لجميـع السـنوات المدروسـة يتـراوح بـين 2525-4528 ميكروغـرام\كغم (Garrido واخرون، 2012).

3: المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1: الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب .

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من الأجهزة والأدوات المختلفة الخاصة بهذه الدراسة والمواد الكيميائية لتنفيذ الدراسة المختبرية

الجدول (1) الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب .

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	جهاز التعقيم البخاري Autoclave	LabTech	Japan
2	الحاضنة Incupoubator	Memmert	Germany
3	مجهر ضوئي مركب Compund light microscope	Olympus	Japan
4	فرن كهربائي Electrical oven	Memmert	Germany
5	ثلاجة Refrigerater	L.G	Korea
6	اطباق بتري Petri Dishes	Afco	Jordan
7	ميزان حساس Sensitive Balance	Sartorius	U.K.
8	الرجاج VORTEX	Memmert	Germany
9	أوراق ترشيح Filter paper	BioBasic Inc.	Korea
10	مطحنة كهربائية Electric grinder	Mammanlex	China
11	Millipore Fillter	Sartorius Stedim	Germany
12	Loop	----	----
13	أسطوانة Cylider	Lap	Germany
14	محقنة طبية Medical Syringe		England
15	Slider and cover slide	Whatman 4	England
16	دوارق زجاجية مختلفة الاحجام Flasks	Unisonic LTD	England
17	غرفة العزل Hood	Tianjin Taisite	China
18	ثاقب فلين Cork Borer	-	China
19	Glass Beaker	-	Germany

الجدول (2) المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة

ت	المادة الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Antibiotics	Samarra	Iraq
2	Ethyl alcohol	-	Iraq
3	Sodium hupochlorite	Glorox Original	India
4	Chloroform ($CHCL_3$)	SRL	India
5	Formalin	-	India
6	Methanol (CH_4O)	Sigma Aldrich	Germany
7	Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$	Thomas Baker	India
8	Potassium Chloride (KCL)	CDH	India
9	Sillica gel	-	Germany
10	Tri-chloroacetic acid (TCA)	Sigma-Aldrich	Germany
11	Ellman's reagent (DTNB)	MedChemExpress	China
12	AST Kit	Sanymed	Italia
13	ALT Kit	Sanymed	Italia
14	Alternariol Standard	Sigma-Aldrich	Germany
15	Aflatoxin B1 Standard	Sigma-Aldrich	Germany
16	Ochratoxin A Standard	Sigma-Aldrich	Germany

الجدول (3) الفطريات الممرضة المستخدمة بالدراسة

ت	الفطريات	مكان العزل او مكان الحصول علية
1	*Alternaria alternata*	ثمار الرمان
2	*Aspergillus flavus*	ثمار الرمان
3	*Aspergillus niger*	ثمار الرمان
4	*Aspergillus ochraceous*	ثمار الرمان

2-3: تحضير الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات .

استخدمت في هذه الدراسة أوساط زرعيه مختلفة . لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها وكذلك لغرض أجراء التجارب الخاصة بها وكما يأتي :

3-2-1: وسط البطاطا سكروز اكار(P.S.A)Potato Sucrose Agar

حضر الوسط بأخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة والمقطعة إلى قطع صغيرة وغليها بالماء المقطر بحجم 500 مل لمدة 20 -30 دقيقة في دورق زجاجي وبعد إنتهاء مدّة الغليان رشح الخليط في دورق زجاجي بقطعة من الشاش للحصول على الراشح , اذيب 10 غم من سكر السكروز و17 غم من الاكار في 500 مل اخرى ثم اضيف إليها راشح البطاطا واكمل الحجم إلى واحد لتر, وزع الوسط في دوارق زجاجية بحسب الحاجة واغلقت فوهاتها بسدادات من القطن وعقمت بجهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق قبل وصول درجة الحرارة 45 مْ، ثم اضيف 250 ملغم / 1لتر من المضاد الحيوي Tetracyclin، وقبل التصلب تم صب الوسط في اطباق بتري حسب التجربة المطلوبة او حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال

3-2-2: وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز(P.D.A) Potato Dextrose Agar

حضر بإذابة 39 غم في واحد لتر من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب اضيف إليه المضاد الحيوي Tetracycline, ثم صب الوسط في اطباق بتري حسب التجربة المطلوبة أو حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

3-2-3: وسط Nutrient Yeast Dextrose Broth

حضر هذا الوسط لتنشيط وتنمية الخميرة *S.cervisiae* . اذ أذيبت 50 غم مكونات الوسط في 1000 مل الماء المقطر ، وعقمت بالمؤصدة على درجة 121م وضغط 1.5 كغم / سم لمدة 20 دقيقة لقحت الدوارق بالخميرة *S.cervisiae* وتحضنت في درجة حراره 25م 2 لمدة يومين .

3-3 : عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لتعفن ثمار الرمان

1-3-3 : جمع العينات

جُمعت عينات ثمار الرمان(جدول 4) من ثمان مواقع جغرافية مختلفة جمعت ثمار الرمان المحلية بصورة عشوائية من عدد من بساتين الفاكهة بينما جمعت الثمار المستوردة من بعض الأسواق المحلية المختصة ببيع الفاكهة والخضار تمت تغطية مساحة واسعة من المواقع الزراعية شملت محافظتي كربلاء وبابل للتأكد من ان المسح يمثل جميع حالات تعفن الثمار في الرمان اذ تضمن المسح خمسة مواقع من محافظة كربلاء وهي قضاء الحسينية وقضاء المركز والحر والهندية وعين التمر بينما تضمنت محافظة بابل قضاء المسيب وناحية سدة الهندية والمشروع لشهري أيلول وتشرين الأول 2023 بواقع ثلاث عينات فرعية لِكُل موقع وبمعدل 3-2 كغم للعينة وضعت في أكياس سُجل عليها : رمز العينة , الموقع المأخوذ منه العينة وتاريخ الجمع نقلت إلى مختبر الأمراض والسموم الفطرية في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة كربلاء

الجدول(4): نوع العينات وترميزها ومكان وتاريخ جمعها

ت	رمز العينة	تاريخ الجمع	المحافظة	مكان الجمع	تفاصيل الجمع	نوع العينة
1	KH	2023/9/8	كربلاء	قضاء الحسينية	عدد من بساتين الحسينية وحقول كلية الزراعة جامعة كربلاء	ثمار محلية
2	KR	2023/10/1	كربلاء	قضاء الحر	عدد من بساتين قضاء الحر	ثمار محلية
3	KC	2023/10/4	كربلاء	قضاء المركز	احد بساتين البوبيات + الأسواق التجارية	ثمار محلية + ثمار مستوردة
4	KA	2023/10/7	كربلاء	قضاء عين التمر	عدد من بساتين قضاء عين التمر	ثمار محلية
5	KT	2023/10/9	كربلاء	قضاء الهندية	عدد من بساتين قضاء الهندية	ثمار محلية
6	BH	2023/10/12	بابل	ناحية سدة الهندية	احد بساتين سدة الهندية	ثمار محلية
7	BM	2023/10/16	بابل	قضاء المسيب	احد بساتين قضاء المسيب	ثمار محلية
8	BS	2023/10/22	بابل	المشروع	احد بساتين مشروع المسيب	ثمار محلية

3-3-2 عزل الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان

عزلت الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان المصابة اذ غسلت الحبوب المصابة جيدا, تم عقمت سطحيا باستخدام بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% لمدة دقيقة واحدة , بعدها غسلت جيدا بالماء المقطر المعقم لإزالة بقايا المحلول المعقم ثم ازيل الماء الزائد منها باستعمال ورق ترشيح معقم , بعدها نقلت الاجزاء المعقمة بواسطة ملقط معقم إلى اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي P.D.A . وبواقع خمس حبات لكل طبق وبواقع 100 حبة رمان للعينة , حضنت الاطباق في درجة حرارة 25±2 م ° وبعد اربعة ايام تم فحص المستعمرات الفطرية النامية وفحصت تحت المجهر لغرض تشخيصها وحفظها (Lacey وآخرون،1999).

تم حساب النسب المئوية للظهور Occurence ولتردد Frequency العزلات الفطرية Krebs (1978) وفقًا للمعادلات الاتية :

$$\text{النسبة المئوية لظهور العزلات الفطرية} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{العدد الكُلي للعينات}} \times 100$$

$$\text{النسبة المئوية لتردد عزلات الفطر} = \frac{\text{عدد عزلات الفطر الواحد}}{\text{عدد العزلات الكلية في العينات}} \times 100$$

3-3-3: تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة من ثمار الرمان.

بعد عزل الفطريات من ثمار الرمان, تم تنقيتها بطريقة البوغ المنفرد باستخدام طريقة التخطيط على عدد من الاطباق (Streak-plate method) او بطريقة طرف خيط الهايفه بواسطة أبره ذات حلقة دائرية (Loop) معقمة في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي PDA المعقم ورمزت ورقمت ثم حضنت الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25±2°م لمدة يومين بعدها تم اخذ المستعمرات النابتة منها ونقلت إلى اطباق جديدة حاوية على الوسط نفسه وحضنت لمدة خمسة أيام (Samson وآخرون، 2004) فحصت المستعمرات الفطرية التي ظهرت باستخدام المجهر الضوئي المركب ثم شخصت مظهرياً اعتمادا على الصفات المظهرية والمجهرية وبأتباع المفاتيح التصنيفية التي ذكرها كل Pandian وآخرون (2016) و-Dıaz Najerag وآخرون (2021)

3-4: حفظ العزلات الفطرية

حفظت العزلات الفطرية التي سجلت اعلى نسبة مئوية في الظهور والتردد . والتي كانت تابعة للأجناس الفطرية *Aspergillus* spp , *Alternaria* sp , على الوسط الزرعي P.D.A صب فِي انابيب زجاجية معقمة حجم (25 مل) وضعت بشكل مائل حتى التصلب ثم لقحت الانابيب بقرص قطر 0.5سم مأخوذ من العزلات الفطرية النقِّية المعزولة سابقاً بواقع ثلاث مكررات لِكل عزلة حضنت الانابيب في درجة حرارة 25 م° وحفظت فِي درجة حرارة 4- م° لحين الاستخدام مع تجديدها كلما دعت الحاجة لذلك.

3-5: اختبار المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المعزولة من ثمار الرمان

3-5-1: تحضير لقاح الفطريات. (العالق الفطري)

نفذت هذه التجربة بتنمية الفطريات على وسط PDA ولمدة سبعة ايام عند درجة حرارة 25 + 2 م ومن ثم حصدت الأبواغ الفطرية بإضافة 10 مل من الماء المقطر المعقم لكل طبق من الاطباق المنمى عليها الفطر ومن ثم مرر قضيب زجاجي معقم على سطح المستعمرات لتسهيل عملية فصل الأبواغ عن الحوامل الكونيدية بعد ذلك جمعت العوالق البوغية وتم حساب اعدادها باستعمال شريحة الهيموسايتوميتر وتم ضبط تركيز الابواغ لنوع الفطر عند (10^{6-} وحده تكوين مستعمرة/ مل/ ماء).

3-5-2: اختبار المقدرة الامراضية

تم اجراء اختبار المقدرة الامراضية على 18 عزلة فطرية تم انتخابها من ضمن الفطريات المعزولة بهذه الدراسة من ثمار الرمان وفقا الى النسبة المئوية للظهور والتردد وذلك لتقليل عددها واختيار الاكثر ضراوة منها وذلك لاستخدامها بالاختبارات والتجارب الحقلية اللاحقة اذ تم اجراء التجربة الامراضية في غرفة الخزن المبردة في كلية الزراعة جامعه كربلاء. آخذت ثمار رمان سليمة ووضعت في صواني من المعدن المغلفة بـ ورق الزبدة (البرشمان). والتي تعتبر وحدة تجريبية إذ تحوي كل وحدة تجريبية على خمسة ثمرات من الرمان السليم تم تعقيم الثمار لمدة ثلاث دقائق في محلول NaOCl 1% وشطفها في ماء مقطر معقم (SDW).

تم اجراء عملية التلقيح الصناعي لثمار الرمان بالعزلات الفطرية بطريقتين مختلفتين . الطريقة الأولى تضمنت حقن معلق كل عزلة فطرية بتركيز 5×10^{-4}بوغ / مل/ماء (0.5 مل / ثمرة) في الثمرة من منطقة الكأس بواقع ثلاثة مكررات باستخدام محقنة قياس 15 مل. والطريقة الثانية عن طريق تخديش الثمار ورش العالق الفطري (عمل جروح بسيطة بأغلفة الثمرة دون الوصول الى الحبوب) بواقع ثلاث مكررات وبمعدل خمسة ثمار للمكرر الواحد حيث تم تلقيح الثمار بالفطربرش 1مل لكل ثمره من العالق الفطري.تم حقن ورش ثلاث مكررات كمعاملة سيطرة بـ SDW. وبعد 21 يومًا عند درجة حرارة 22 درجة مئوية، تم حساب نتائج الاختبارين.

3-5-3: حساب النسبة المئوية للإصابة وشدة الاصابة لثمار الرمان

قدرت نسبة الاصابة بمرض تعفن ثمار الرمان وذلك عن طريق حساب عدد الثمار الظاهرة عليها اعراض الاصابة بعد اجراء اختبار المقدرة الامراضية في التجربة المخزنية إذ حسبت النسبة المئوية للإصابة وفق المعادلة الآتية

$$\text{النسبة المئوية للإصابة} = \frac{\text{عدد الثمار التي ظهرت عليها الاصابة}}{\text{عدد الثمار الكلي}} \times 100 \quad (\text{Tongdee، 1994})$$

وتم حساب شدة الاصابة للثمار المصابة عن طريق توزيع الثمار الموجودة في التجربة الى خمس درجات اصابة بالاعتماد على مظهر الاصابة وحسب الدليل المرضي الاتي جدول (5):

الجدول(5) الدليل المرضي المستخدم في حساب النسبة المئوية لشدة الإصابة لتعفن ثمار الرمان

الدرجة	المعيار	مظهر الاصابة
0	0 % تعفن	لا توجد اصابة
1	1-25 % تعفن	وتغير نسبي في لون حبات الرمان
2	25-50 % تعفن	وتغير لون ورائحة في حبات الرمان
3	50-75 % تعفن	ظهور تعفنات واضحة بالوان داكنة
4	75-100 % تعفن	تقريبا تعفن كامل الثمرة وفقدان الوزن

بالاعتماد على المعادلة الموضوعة من قبل Mckinny (1923) تم حساب النسبة المئوية لشدة الاصابة :

$$\text{شدة الاصابة} = \frac{(\text{عدد الثمار في الدرجة } 1\times 1)+...+(\text{عدد الثمار في الدرجة} 5\times 5)}{\text{عدد الثمار المفحوصة } \times 5} \times 100\%$$

3-6: التشخيص الجزيئي Molecular identification

تم اجراء التشخيص الجزيئي وفحص (PCR) لأربع عزلات فطرية لغرض تأكيد التشخيص المظهري لها , والتي كانت ثلاث عزلات تابعة للجنس *Aspergillus* spp. وعزلة فطرية تابعة للجنس *Alternaria* sp. والمعزولة من من ثمار الرمان المصابة والتي أظهرت مقدرة امراضية عالية بإصابة ثمار الرمان اذ تم تشخيصها جزيئياً وكما يأتي:

أولا: استخلاص و تنقية الـ DNA extraction and DNA purification

جرت عملية استخلاص وتنقية للـDNA من مستعمرات الفطر النقية باستخدام العدة التجارية DNeasy Plant Kits المجهزة من شركة QIAGEN الألمانية ومن خلال اتباع الخطوات التالية:

1) جمعت 100-200 ملغم من المستعمرة النقية للفطر الممرض بعمر 10 أيام ونقلت الى أنبوب اختبار (Eppendrof tube) معقم سعة 1.5 مل واضيف اليها 400 مايكروليتر من المحلول الدارئ AP1 بعدها سحقت العينة باستخدام المدقة البلاستيكية الصغيرة (Micropestle) المعقمة مع رج العينة عدة مرات باستخدام جهاز الهزاز (Vortex) والتأكد من سحق العينة بصورة جيدة. لقد كان الغرض من هذه الخطوة هو تحطيم الخلايا الفطرية.
2) حضنت الانبوبة الحاوية على الخليط في حمام مائي بدرجة حرارة 65 م° لمدة 10 دقائق مع الحرص على رج الانبوبة يدويا 2-3 مرات اثناء فترة التحضين وكانت هذه الخطوة لغرض تحليل الخلايا الفطرية.

3) إضيف 130 ميكرولتر من المحلول الدارئ P3 إلى الانبوبة الحاوية على الخليط ثم مزجت المحتويات بصورة جيدة باستخدام جهاز الهزاز وحضنت بعدها لمدة 5 دقائق على الثلج. ان هذه الخطوة تترسب فيها المنظفات الخاصة بالمحاليل الدارئ والبروتينات والسكريات المتعددة الخاصة بالفطر.
4) أجريت عملية طرد مركزي للأنبوبة بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ثم نقل المحلول الطافي الى انبوبة نوع QIAshredder Mini spin column ذات اللون الارجواني التي تحوي على مرشح خاص وأيضا أجريت لها عملية طرد مركزي بالسرعة نفسها المذكورة أنفاً ولكن لمدة دقيتين. ويعمل مرشح هذه الانبوبة على إزالة معظم الرواسب وحطام الخلايا الفطرية.
5) نقل الراشح إلى أنبوب اختبار جديدة معقمة سعة 2 مل واضيف اليه 700 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW1 ومزجت المحتويات مباشرة بواسطة الماصة الصغيرة.
6) نقل بعدها 650 ميكرو لتر من الخليط بواسطة الماصة الصغيرة الى انبوبة نوع DNeasy Mini spin column ذات الون الأبيض والتي تحوي أيضا على مرشح خاص لغرض تنقية الـDNA وأجريت للأنبوبة عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة، تم التخلص بعدها من الراشح ونقل المتبقي من الخليط الى الانبوبة نفسها وأجريت عملية طرد مركزي بالسرعة نفسها والفترة الزمنية مع التخلص من الراشح أيضا.
7) أضيف 500 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW2 الى نفس الانبوبة أعلاه مع أجراء عملية طرد مركزي لها بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح ثم اضيف مرة أخرى لنفس الانبوبة 500 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW2 وأجريت لها عملية طرد مركزي بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين وأيضا تم التخلص من الراشح. أن الغرض من هذه الخطوة هو لتنقية الـDNA العالق بالمرشح.
8) وضعت الانبوبة DNeasy Mini spin column بداخل انبوبة اختبار معقمة سعة 2 مل واضيف الى غشاء مرشح الانبوبة مباشرة 100 ميكرو لتر من المحلول الدارئ TE وحضنت بعدها الانبوبة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة للحصول على الراشح الذي يحوي على الـ DNA الكلي. ان الغرض من هذه الخطوة هو إزالة الـ DNA العالق بغشاء مرشح الانبوبة ليكون مع الراشح.
9) حفظت الانبوبة الحاوية على الـDNA الكلي تحت درجة حرارة 20-م° لحين الاستخدام.

ثانياً: تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

استخدم الـDNA الذي تم استخلاصه من المسبب المرضي الذي عزل من ثمار الرمان المصابة كقالب في تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) القياسي الخاص بالكشف عن الفطريات باستخدام العدة Ready-To-Go PCR Beads المجهز من شركة/ GE Healthcare البريطانية. كان الحجم النهائي للتفاعل 25 مايكرو ليتر ويحتوي على المكونات الأساسية المتمثلة بـ 1 مايكرو ليتر من كل من البادئات ITS1 و ITS4 الموضحة أدناه (جدول 6) والتي تستهدف مضاعفة منطقة Internal transcribed spacer (ITS) التي تقع ضمن جينات الوحدة الصغيرة والوحدة الكبيرة المكونة للرايبوسومات في الكروموسومات الفطرية (White واخرون،1990) كما أضيف للتفاعل 2 مايكرو ليتر من الـ DNA الكلي المعزول من الفطريات أعلاه ومن كلى الطريقتين.

الجدول (6) البوادئ المستخدمة في تقنية Polymerase chain reaction (PCR)

Primer	Sequence 5⟶ 3		PCR product size
ITS1	F	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	500-800 bp
ITS4	R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

لقد كان برنامج التضاعف الخاص بالـ PCR يبدأ بخطوة التفكك Denaturation ، لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 95 مْ ثم 35 دورة تتكون من ثلاثة مراحل: تبدأ بالتفكك لمدة 40 ثانيه وبدرجة حرارة 95مْ ثم الالتصاق Annealing لمدة 40 ثانيه بدرجة حرارة 55مْ بعدها التمدد Extensionلمدة دقيقة بدرجة حرارة 72 مْ. بعدها تبدأ الخطوة الأخيرة للتفاعل المتمثلة بالتمدد النهائي Final extension لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 72 مْ. ناتج التفاعل رحل باستخدام الترحيل الكهربائي على وسط Agrose تركيز 1.5% بعد إضافة 5مايكرو ليتر من صبغة بروميد الاثيديوم وبعدها استخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية لغرض فحص نتائج التفاعل.

ثالثاً: تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية

بعد اجراء عملية التضاعف الـPCR أرسلت النواتج إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية لغرض تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لكل عينة فطرية، تم تقييم وتحليل البيانات المستلمة من الشركة بالاستعانة ببرنامج Chromas، ولغرض معرفة التشابه بين الفطر المدروس والفطريات المسجلة عالميا تم الاستعانة ببرنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) التابع لموقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية نتائج البحث National Center for Biotechnology Information (NCBI) تم رسم شجرة التحليل الوراثي (Phylogenetic trees analysis) بأستخدام برنامج MEGA X (Kumar واخرون، 2018).

3-7: تحضير المستخلصات النباتية الكحولية لبعض النباتات المنتخبة

حُضرت المستخلصات النباتية الكحولية(جدول 7) لعدة نباتات وهي الميرمية (*Salvia officinalis*) والدارسين(*Cinnamomum cassia*) والكزبرة (*sativum Coriandrum*) والزعتر(*Thymus vulgaris*) والقرنفل(*Syzygium aromaticum*) والسمسم (*Sesamum indicum*) بوزن 20 غم من المسحوق النباتي لكل من هذه النباتات بشكل منفرد في دورق زجاجي حجم 500 مل وأضيف إليه 200 مل من الكحول الأثيلي بتركيز 70%، ووضع بعدها المزيج في جهاز الهزاز لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 35م° بعدها رشح المزيج بواسطة ورق الترشيح نوع Whatman No.1 ، وضع المستخلص في بيكرات زجاجية قطر 10 سم وجفف الكحول في الفرن (oven) تحت درجة حرارة 40م° الى أن تبخر الكحول كليا وضع مسحوق المستخلص الكحول في أنابيب معتمة ومحكمة الغلق ظلت في المجمدة بدرجة حرارة - 18 م لحين الاستعمال . (Abu ghadeibو Shtayeh، 1999)

الجدول (7) أسماء النباتات المنتخبة لعمل المستخلصات النباتية منها واهم المواد الفعالة بها

النبات	الاسم العلمي	المادة الفعالة	الجزء المستخدم
القرفة	*Cinnamomum verum*	زيوت عطرية و الفينيل والبروبانوبدات	اللحاء النباتي
الكزبرة	*Coriandrum sativum*	القلويدات،الصابونينات، الفلافونويدات،الستيرويدات، ترايتيربينويدات، والجليكوسيدات.	البذور
الميرمية	*Salvia officinalis*	تربينويدات والبوليفينول	الاوراق
السمسم	*Sesamum Indicum*	البوليفينول،القلويدات، الفلافانويدات،التربينويدات، والجليكوسيدات.	البذور
القرنفل	*Syzygium aromaticum*	ترايتيربين فلافونيدات	البراعم الزهرية
الزعتر	*Thymus vulgaris*	زيت الزعتر 55% ومواد فينولية ومواد رارنجية	المجموع الخضري

3-8: تقييم كفاءة عدد من المستخلصات النباتية والمبيدات الكيميائية والعامل الاحيائي (الخميرة *S.cervisiae*) ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.

3-8-1: اختبار كفاءة بعض المبيدات ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

اختبرت فعالية المبيدين الزراعيين المبيد الكيميائي Palizin 65%SL ذو الاصل النباتي ، ومبيد مستخلص الفلفل الاحمرTondexir 80%EC ضد نمو العزلات الفطرية المدروسة الممرضة حضر الوسط الزرعي PDA في دوارق زجاجية بحجم 250 مل وعقم بجهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121م وضغط 15 باوند / إنج لمدة 20 دقيقة، بعد انتهاء التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45م وقبل التصلب اضيف المبيد بالتراكيز المقاربة للتركيز الموصى به من قبل الشركة المصنعة وهي 1 غم / لتر ، 2 غم / لتر و3غم / لتر لكل مبيد. رج الوسط جيداً وصب كل منهما في أطباق بتري. وبعد تصلب الوسط لقحت الأطباق بوضع قرص 0.5 ملم من العزلات الفطرية المستخدمة في الدراسة باستخدام ثاقب فليني في مركز الوسط الممزوج مع المبيد مع عمل مقارنة في طبق يحتوي على وسط زرعي بدون

اضافة أي مبيد. حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 25 مْ ولمدة اسبوع بالنسبة للعزلات الفطرية الممرضة وتم قياس معدل قطر المستعمرة النامية وحسبت نسبة التثبيط والتي على اساسها تم اختيار التركيز والمبيد الأكثر فعالية وتثبيط باستخراج النسبة المئوية للتثبيط (دخيل، 2021).

3-8-2 : أختبار تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

تم أختبار تأثير ست مستخلصات نباتية (الميرمية والكزبرة والدارسين والزعتر والسمسم والقرنفل) مختلفة ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة المعزولة من ثمار الرمان المتعفنة إذ تم مزج المستخلصات النباتية المحُضرة مسبقا (بعد اذابتها بـ 10 مل من الكحول الايثيلي) مع الوسط PDA المبرد إلى درجة حرارة 45 مْ بتركيز 2 مل / 100 مل وسط ، وبمعدل ثلاث مكررات وبعد تصلب الوسط الغذائي تم وضع قرص 0.5 ملم من العزلات الفطرية المستخدمة في الدراسة باستخدام ثاقب فليني في الوسط الممزوج مع المستخلص النباتي مع عمل مكررات معاملة السيطرة (بإضافة 2مل كحول اثيلي الى 100مل وسط الزرعي وصبه في اطباق , ولقحت بالفطريات) حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25±2 مْ ولمدة أسبوع (عند اكتمال نمو السيطرة) وتم قياس معدل قطر المستعمرة النامية وسجلت النتائج وحسبت النسبة المئوية للتثبيط والتي على اساسها اختيرت المستخلصات النباتية الاكثر فعالية وتثبيطا

3-8-3: : تنشيط الخميرة *S.cervisiae* واختبار فاعليتها في تثبيط نمو العزلات الفطرية

استعملت الخميرة *S. cervisiae* تركية المنشأ نميت على الوسط الزرعي Nutrient Yeast Dextrose Broth اذ تضمنت الطريقة اضافة واحد مل من عالق الخميرة المنماه على وسط NYDB السائل عمرثلاث أيام (من التخفيف السادس والثامن والعاشر) الى طبق بتري حاو على الوسط الزرعي PSA وتحريك الطبق بحركة رحوية لنشر عالق الخميرة ثم وضع قرص قطر 0.5 سم من مزرعة الفطر الممرض عمر سبعة ايام بمركز كل الطبق استعملت ثلاث اطباق لكل معاملة وتركت ثلاث أطباق من دون إضافة الخميرة كمقارنة. حضنت الأطباق (25±2 مº لمدة سبعة أيام) وتم حساب معدل نمو الفطريات الممرضة والنسبة المئوية للتثبيط. لاختيار افضل تركيز مثبط للفطريات (Al-Hamiri، 2016).

3-9 : أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (Palizin) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في المخزن

بعد إجراء الأختبارات المختبرية السابقة تم أنتخاب المبيد الأفضل تاثيراً من بين المبيدات ، وهو المبيد (Palizin) واكفأ مستخلصين نباتيين وهما ، مسخلص نبات الميرامية ومستخلص نبات الكزبرة والتخفيف السادس الفعال من الخميرة *S.cervisiae*. اختبر تأثير المستخلصين النباتين المستخدمة في الدراسة والخميرة S.cervisiae مع المبيد (Palizin) ضد نمو العزلات الفطرية وحماية ثمار الرمان من مهاجمتها، اذ تم تهيئة وتحضير العالق الفطري للعزلات الفطرية الأربعة وعالق الخميرة *S.cervisiae* والمستخلصات النباتية وتركيز المبيد الكيميائي كما مر بنا بالتجارب المختبرية السابقة. وبنفس الوقت تم تهيئة وتعقيم المخزن المبرد في كلية الزراعة/جامعه كربلاء، وتجهيزه بالوحدات التجريبية من الرمان السليم بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة وخمسة ثمار للمكرر الواحد. نفذت التجربة حسب المعاملات المذكورة في جدول (8) اذ تم تخديش (تجريح) ثمار الرمان ومعاملتها بجميع عوامل المكافحة كلا بشكل منفرد قبل عدوى ثمار الرمان بعالق العزلات الفطرية الممرضة بـ 24 ساعة ليتسنى لها الاستقرار على جميع سطح الثمار. وفي اليوم التالي تمت العدوى او التلقيح الصناعي لثمار الرمان بالعزلات الفطرية (واحد مل رشا من العالق الفطري/ ثمرة). اذ تركت ثلاث مكررات كمعاملة سيطرة بدون أي إضافة في كل مجموعة.

الجدول (8) المعاملات المطبقة على ثمار الرمان الملوثة بالفطريات الممرضة

ت	رمز المعاملة	وصف المعاملة المختبرة
1	Control	ثمار رمان مخدشه فقط بدون أي معاملة
2	(Path) only	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض فقط
3	(Path)+(ex.*S.o*)	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض + مستخلص الميرمية
4	(Path)+(ex.*C.s*)	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض + مستخلص الكزبرة
5	(Path)+(*Palizin*)	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض + المبيد الكيميائي (*Palizin*)
6	(Path)+(*S.cervi.*)	ثمار رمان مخدشه معاملة بالفطر الممرض + (الخميرة *S.cervisiae*)

وبعد 21 يوم من تنفيذ التجربة حسبت النتائج , اذ تم حساب النسبة المئوية للإصابة والنسبة المئوية لشدة الإصابة لكل من العوامل المستخدمة ومقارنتها بمعاملة السيطرة والفطر الممرض فقط لتحديد افضل المعاملات المستخدمة .

مرحلة تخديش ثمار الرمان

مرحلة رش ثمار الرمان بعوامل التجربة

مرحلة إضافة اللقاح الفطري لكل من العزلات الأربع المنتخبة

الشكل(1):مراحل تنفيذ التجربة الخزنية لتقييم كفاءة المعاملات في تثبيط المسببات المرضية

3- 9: الكشف عن قابلية العزلات الفطرية الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان

بعد انتهاء التجربة الخزينة وتقييم دور عوامل المكافحة بالسيطرة على مهاجمة ثمار الرمان وتسببها بأمراض تعفن الثمار. اجري هذ الاختبار للكشف عن قابلية هذه العزلات المرضية على انتاج السموم الفطرية في معاملة الممرض فقط ومقارنتها مع دور عوامل المكافحة بالسيطرة على الممرضات وتثبيطها من انتاج السموم الفطرية بالمعاملات الأخرى .

3-9-1 : استخلاص السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A

سحقت حبوب ثمار الرمان بعد تجفيفها , والناتجة من معاملات التجربة الخزنية والمنمى عليها العزلات الفطرية الممرضة باستخدام مطحنة كهربائية للحصول على جزيئات دقيقة ومتجانسة ثم وزن 10 غم من مسحوق كُل عينة أُضيف إلى محلول الاستخلاص (ميثانول CH_4O : كلوريد البوتاسيوم KCL 4%) وبواقع (1:9) وبحجم 60 مل , يتجانس الخليط المتحصل عليه باستخدام هزاز كهربائي Shaker (45 دقيقة , 200 دورة في الدقيقة , بدرجة حرارة الغرفة) رشح الخليط بعد مرور 24 ساعة بورق ترشيح Watman no.2 (راشح أولي) أخذ منه 30 مل وخلط جيدًا مع 30 مل محلول كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ 30% , ثم رشح مرة أخرى بنفس الطريقة (Hackbart وآخرون،2012).

تمت تنقية المستخلص الاولي للسموم باستخدام عمود الكروماتوغرافي (50 cm × 12 mm) حُضر حسب الطريقة المتبعة من قبل (العكيلي، 2022) بتنشيط السليكا جل عن طريق التسخين في فرن كهربائي (130 °م , 45 دقيقة) وضعت في قاعدتهِ كرة من الصوف الزجاجي ثم أضيف 0.5 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) لإعطاء قاعدة متساوية لسيلكا جل بعد ذلك أضيف $CHCL_3$ حتى يصبح العمود نصف ممتلئ تقريبا ثم أضيف ببطء 2.0 غم سليكا جل مع غسل جوانب العمود بالكلوروفورم $CHCL_3$ حرك الخليط بقضيب زجاجي لإزالة فقاعات الهواء المتكونة ولِرص السليكا سُحب $CHCL_3$ إلى الأسفل وتركت مسافة 3 سم فوق السليكا جل لتفادي جفاف العمود بعد ذلك أضيف 0.5 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) وبهذا أصبح العمود جاهزًا للاستخدام.

أضيف المستخلص المُحضر سابقًا ووضع ببطء في العمود ثم جُمع الراشح الأخير في vials معتمة (25 mL) تم الفصل بإضافة 50 مل كلوروفورم $CHCL_3$ وضع المزيج في قمع الفصل ورج جيدًا مع مراعاة فتح الصمام بين فترة واخرى لتفريغ الغازات المتكونة وترك على الحامل ليتم الفصل أهملت الطبقة العليا وكررت العملية مرتين ثم مرر الراشح فوق 10 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4). تم تبخير المذيب بدرجة حرارة 50 °م وحفظ الراشح في Vilas معتمة (2.0 mL, بدرجة حرارة -20 °م) لحين اجراء الكشف النوعي والكمي (Hackbart وآخرون،2012).

2-9-3 : استخلاص السم الفطري (AOH) *Alternariol*

تم استخلاص السموم الفطرية للفطر *Alternariol Alternaria* في المختبر حسب الطريقة الموضحة من قبل Ntasiou واخرون (2015). اذ تم استخلاص السم الفطري (AOH) *Alternariol* من سحق 20 غم حبوب الرمان المتعفنة واستخلاصها بـ 100 مل من الأسيتونيتريل الذي يحتوي على 1٪ (حجم / حجم) حمض الأسيتيك و 7.5 مل من الماء البارد على التوالي. بواسطة هزاز لمدة اربعة دقائق. ، تمت إضافة لهذا المقدار 10 غرام من كلوريد الصوديوم، ثم تم رج الخليط لمدة ثلاث دقائق وطرد مركزي لمدة ستة دقائق عند 7500 دورة في الدقيقة. اخذ 40 مل من الطور العضوي العلوي إلى أنبوب يحتوي على اثنان غرام ethylamine (CH3CH2NH2) و ستة غم من مسحوق كبريتات المغنيسيوم اللامائي ، تم رج المستخلص لمدة دقيقتين ونبذ بالطرد المركزي عند 4000 دورة في الدقيقة لمدة خمسة دقائق. كان الحجم الناتج 25 مل من المادة الطافية يتركز حتى يجف باستخدام تيار النيتروجين عند درجة حرارة 30 درجة مئوية تم إعادة اذابتها في اثنان ملي لتر من الميثانول، وتم ترشيحها خلال 0.45 ميكرومتر (من مرشحات الملي بور) وأصبحت جاهزة لتحليلها بواسطة نظام HPLC

3-9-3 : الكشف النوعي والتقدير الكمي للسموم الفطرية *Aflatoxin* B1 و*Ochratoxin* A و*Alternariol* (AOH) بتقانة HPLC للعزلات الفطرية

أُجري التحليل الكروماتوغرافي في وزارة العلوم والتكنلوجيا / دائرة بحوث وتكنلوجيا البيئة والمياه باستخدام نظام كروموتوغرافي سائل عالي الأداء high performance liquid chromatographic (HPLC) (Germany,SYKAMN) مُقترن بـ RF-10A XL fluorescence detector , تم إجراء الفصل الكروماتوغرافي باستخدام عمود Phenomenex HPLC ذي الطور العكسي (C18,250mm x 4.6 mm, 5µm) مع الطور الناقل من الأسيتونيتريل : ماء : 2-بروبانول (30:65:5, v/v/v, ph 2.95) بمعدل جريان واحد1 مل/دقيقة -1 تم الاحتفاظ بدرجة حرارة العمود عند 25 درجة مئوية. كانت حالة الكشف عن التألق عند 330 nm للتوهج و500 nm للانبعاثات في تحليل Afla(Sari وآخرون،2020) أما ظروف تحليل OTA :باستخدام عمود طور المعكوس C18 (150mm × 4.6 mm, 3.5 µm) , كاشف الفلوريسنت : (FLD, exc=333 nm , em=460 nm ; gain=100) تمت تصفية العينة بمعدل الجريان 1 مل/دقيقة وكان حجم الحقن 10 ميكرولتر . الطور المتحرك عبارة عن خليط من أسيتونتريل/ماء/حامض أسيتيك (v/v/v , 2:99:99) وكانت درجة حرارة العمود 30 م˚ (Zou وآخرون,2022).

تم حساب التركيز من خلال المعادلة :

$$\text{C sam} = \frac{C\ st * A\ sam}{A\ st} * \frac{D.F}{Wt}$$

(تركيز العينة)*C sam = Concentration of sample

(تركيز المادة القياسية) C st = Concentration of standard

(مساحة العينة) A sam = sample area

(مساحة المادة القياسية) A st = standard area

(وزن العينة) Wt = weight of sample

(معامل التخفيف) D.F = dilution factor

3-10: أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في الحقل

بعد اجراء التجربة الخزنية لتقييم دور بعض عوامل المكافحة في السيطرة على المسببات المرضية من مهاجمة ثمار الرمان واصابتها بأمراض تعفن الثمار وتثبيط العزلات الفطرية من انتاج السموم الفطرية فيها تم تنفيذ التجربة الحقلية وهي تطابق جميع معاملات التجربة الخزنية (جدول 9) ولكن نفذت في احد حقول الرمان في قضاء الحسينية على أشجار الرمان بمراحل مبكرة من التزهير وعقد الثمار وعززت المعاملات بعد 14 يوم لضمان العدوى والمعاملات. وبعد ثلاثة اشهر سجلت النتائج بحساب النسبة المئوية للإصابة والنسبة المئوية لشدة الإصابة والنسبة المئوية للتثبيط.

الجدول (9) المعاملات المطبقة على ازهار الرمان الملوثة بالفطريات الممرضة بالحقل

ت	رمز المعاملة	وصف المعاملة المختبرة
1	Control	ازهار رمان فقط بدون أي معاملة
2	(Path) only	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض فقط
3	(Path)+(ex.*S.o*)	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض + مستخلص الميرمية(20%)
4	(Path)+(ex.*C.s*)	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض + مستخلص الكزبرة (20%)
5	(Path)+(*Palizin*)	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض + المبيد الكيميائي (*Palizin*)
6	(Path)+(*S.cervi.*)	ازهار رمان معاملة بالفطر الممرض + (الخميرة *S.cervisiae*)

الشكل (2): مراحل تنفيذ التجربة الحقلية على أشجار الرمان

3-10: التصاميم الإحصائية للتجارب المختبرية والحقلية

استعمل التصميم تام التعشية Complete randomized design (CRD) لجميع التجارب التي اجريت تحت ظروف مسيطر عليها التجارب المختبرية وتجارب البيوت البلاستيكية، بينما تم تحليل التجارب الحقلية العاملية باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة وحللت البيانات Simple Randomized Compelete Block Design (RCBD) ببرنامج (Statistical Analysis System (SAS ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار اقل فرق معنوي .L.S.D. تحت مستوى معنوية 0.05.

4 :النتائج والمناقشة

4-1: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان

بينت نتائج العزل والتشخيص تلوث جميع العينات المأخوذة من ثمار الرمان المصابة (جدول 10) والتي تعود لخمسة مناطق مختلفة من محافظة كربلاء , وثلاث مناطق من محافظة بابل , بعزلات فطرية مختلفة بنسبة تلوث 100% اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 450 عزلة فطرية عائدة لعدد من لأجناس الفطرية كان أكثرها تلوثا هو الفطر*Aspergillus*.spp يليه الفطر *Penicillium* spp اما المرتبة الثالثة جاء الفطر *Alternaria* sp من الفطريات المنتجة للسموم الفطرية.

الجدول (10) الفطريات المعزولة من ثمار الرمان المصابة بمرض تعفن الثمار

ت	الفطريات المعزولة	محافظة كربلاء						محافظة بابل			مجموع العزلة الفطرية
		قضاء الحسينية	قضاء الهندية	عين التمر	قضاء المركز	قضاء الحر	سدة الهندية	المسيب	المشروع		
		KH	KT	KA	KC	KR	BH	BM	BS		
1	*Aspergillus.spp*	15	13	16	14	13	16	17	18		122
2	*A. niger*	12	14	12	0	15	14	12	16		95
3	*A. flavus*	2	4	0	0	5	9	0	1		21
4	*A.ochraceus*	2	0	3	1	3	3	0	0		12
5	*Aspergillus terreus*	2	0	0	2	0	1	0	0		5
6	*Alternaria.alternata*	3	0	2	8	0	0	2	0		15
7	*Penicillium spp*	13	12	7	12	12	9	11	8		84
8	*P.expansum*	1	0	3	0	0	2	0	0		6
9	*Botrytis* sp	0	0	2	2	0	6	0	2		12
10	*Rhizopus* sp	7	5	6	1	7	1	8	7		42
11	*Cladosporium*	3	3	1	1	0	3	0	0		11
12	*Fusarium* spp.	0	0	1	0	1	0	1	0		3
13	*Phoma* sp	0	0	0	1	0	0	1	0		2
14	*Colletotrichum*	0	0	2	2	0	0	1	0		5
15	*Mucor* spp	0	2	3	0	2	0	3	0		10
	المجموع	60	53	58	44	58	64	56	52		450

اتفقت هذه النتائج مع ما اشارااليه Munhuweyi واخرون (2016) بأن ثمار الرمان تتعرض لخطر المهاجمة من قبل العديد من الفطريات الممرضة مسببة الكثير من الامراض عند التخزين لفترات طويلة اذ يتعرض الرمان الى المهاجمة من مسببات الامراض المختلفة في مرحلة ما قبل او بعد الحصاد مما له تأثير كبير على جودة الفاكهة وعمر التخزين مما يؤدي الى تلف الانسجة وذلك يجعل الفاكهة غير قابلة للبيع . وفي دراسة أخرى اكد Ezra واخرون (2015) بان اهم المسببات التي تهاجم ثمار الرمان هي .*Aspergillus* spp، *A.alternata* ، *Penicillium* spp.، *Botrytis* spp، و*Rizopus* spp. وتم عزل أنواع فطرية أخرى في عينات قليلة فقط .في حين اشار Mincuzzi واخرون (2022) ان من اهم هذه المسببات هي *Alternaria alternata* ،وانواع من جنس *Aspergellus* اذ تسبب امراض مختلفة على ثمار الرمان في جميع انحاء العالم.من اهم هذه الامراض هو مرض التعفن الاسود في الرمان (القلب الاسود)

بينما أظهرت النتائج ان النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة (جدول 11) سجلت اعلى نسبة ظهور 100% بالنسبة للاجناس *Aspergillus*.sp و*Penicillium* spp بينما سجل النوع *A. niger* اعلى نسبة ظهور بلغت 87.5% تلاه النوعين *A. flavus* و*A.ochraceus* بلغت 62.5% لكليهم بينما بلغت النسبة المئوية لظهور الفطر*A. alternata* 50% بالنسبة للفطريات المنتجة للسموم الفطرية. في حين أظهرت نتائج النسبة المئوية لتردد الأنواع الفطرية تفوق النوع *A. niger* بنسبة تردد بلغت 21.35% تلاه النوع *A. flavus* بنسبة 4.72%. وتفوق النوع *Alternaria alternata* على الفطر *A.ochraceus* اذ بلغ 3.37% و2.70 على التوالي.

وقد اتفقت النتائج مع دراسة Kanetis واخرون (2015) إذ تم عزل وتشخيص 57 عزلة فطرية مختلفة مرتبطة بمرض تعفن ما قبل الحصاد لفاكهة الرمان في اليونان وقبرص، اذ كانت العوامل الرئيسية لعفن ما قبل الحصاد الفطر *Aspergillus* spp. تم عزله بنسبة تردد 36.8% و51% في اليونان وقبرص على التوالي، في حين تم عزل الفطر *Alternaria spp*. وبلغت نسبة التردد 29.5% و 38٪ على التوالي اما *Pilidiella. granati* و *Botrytis* spp. كانا المسببين الثالث والرابع الأكثر.

الجدول (11) النسبة المئوية لظهور وتردد الفطريات المعزولة من ثمار الرمان

ت	الفطريات المعزولة	مجموع العزلة الفطرية	النسبة المئوية للظهور	النسبة المئوية للتردد
1	*Aspergillus.spp*	122	100	27.42
2	*A. niger*	95	87.5	21.35
3	*A. flavus*	21	62.5	4.72
4	*A.ochraceus*	12	62.5	2.70
5	*Aspergillus terreus*	5	37.5	1.12
6	*Alternaria alternata*	15	50	3.37
7	*Penicillium spp*	84	100	18.88
8	*P.expansum*	6	37.5	1.35
9	*Botrytis spp*	12	50	2.70
10	*Rhizopus spp*	42	100	9.44
11	*Cladosporium spp*	11	62.5	2.47
12	*Fusarium spp.*	3	37.5	0.67
13	*Phoma spp*	2	25	0.45
14	*Colletotrichum spp*	5	37.5	1.12
15	*Mucor spp*	10	50	2.25

كما اكد Neamah واخرون (2020) ان المسببات المرضية الرئيسية لهذا المرض هي الانواع العائدة الى جنس *Aspergillus* والذي يعد من الفطريات المهمة الموجودة في جميع أنحاء العالم والموجودة في جميع الأنظمة البيئية. هناك أنواع مختلفة من *Aspergillus* تسبب امراض لثمار الرمان اهمها *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, , *Aspergillus* ochreacus إذ اشارات دراسة Jatoi واخرون (2020) بأن *Aspergillus niger* يسبب مرض تعفن ثمار الرمان ويعد أحد أهم أمراض ما بعد الحصاد والتي قد تسبب خسائر كبيرة في بعض الحالات تصل إلى 94٪ لمزارعي الرمان. في باكستان،

يظهر هذا المرض دائمًا كل عام في بساتين الرمان مما يتسبب في خسائر كبيرة في الإنتاج والجودة .

هناك دراسه تشير ان يتم مهاجمه معظم الثمار في البساتين بواسطة*A. alternata* وبسبب تلوث وتعفن الثمار هو أحد أمراض الرمان الرئيسية المهمة التي تنتج في جميع أنحاء العالم (yehia واخرون، 2013). بينما تم التاكيد بان *A.alternata* هو العامل الممرض الاكثر شيوعا وامراضية والمسبب عن تلف الرمان ماقبل وبعد الحصاد إذ تمت إحالة العزلات المعزولة من ثمار الرمان ذات الصفات المظهرية المختلفة والعائدة الى منطقتين إنتاجيتين رئيسيتين في جنوب إيطاليا، بوليا وصقلية، واضحت النتائج بأن على الرغم من التباين المورفولوجي والجيني لهذه العزلات ، فإن جميعها كانت مسببة للأمراض وتسببت في أعراض نموذجية لتعفن القلب في ثمار الرمان واكدت ان عزلات الفطر *A.alternata* المختلفة المسؤولة عن مرض تعفن القلب في الرمان في جنوب إيطاليا (Aloi واخرون، 2021).

2-4: الوصف المظهري لاهم العزلات الفطرية المرافقة لعينات الدراسة

بينت النتائج التشخيص المظهري للعزلات الفطرية المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان(الشكل3) استنادًا إلى الصفات المظهرية والمجهرية للمستعمرات الفطرية النامية على وسط PDA وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية والصفات المظهرية. اذ أظهرت العزلات وجود عدة فطريات مرافقة لثمار الرمان حيث شخصت عدة انواع تابعة للفطر *Aspergillus* spp والتي تمتلك صفات مظهرية مميزة ومتباينة بطبيعة نمو المستعمرات الفطرية ولون المستعمرة وكثافة الخيوط الفطرية النامية في الوسط الزرعي PDA وبدون إضافة المضادات الاحيائية ، اذ اظهرت نتائج التشخيص المظهري ظهور مستعمرات الفطر*A.niger* ناعمة أو صوفية قليلا كان النمو الأولي أبيض اللون وأصبح فيما بعد اسود أو بني داكن والكونيدات كروية خشنة مصبغة بشكل غامق الى الاسود .تكون الحوصلة كروية الشكل , بنية داكنة وخشنة الجدران اتفقت النتائج مع ما ذكره (Toma وآخرون، 2021)

تفيد أظهرت النتائج بأن الغزل الفطري لمجموعة من عزلات الفطر *A.flavus* كان سريع النمو بلون اخضر والذي يمثل كونيدات الفطر وحافة صفراء مخضرة تكون مسطحة اما في

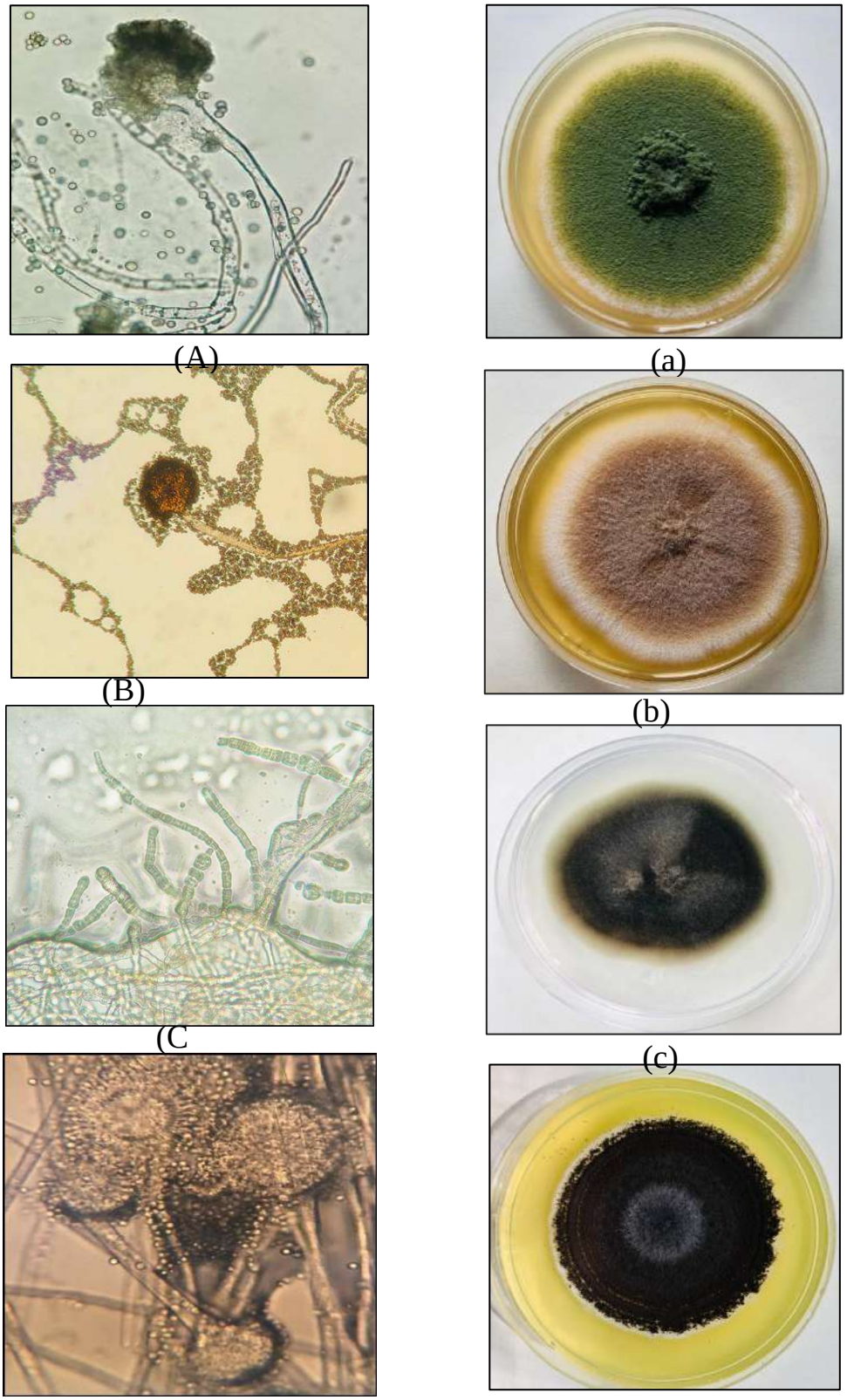
وسط المستعمرة يكون مرتفعا وبمرور الوقت تصبح المستعمرة داكنة (Amaike و Keller ،2011)

كان الغزل الفطري لعزلات الفطر *A.ochraceus* سريع النمو غالباً ما تبدو مستعمرة الفطر بلون اصفر ليموني إلى برتقالي واحيانا بلون وردي شاحب أو بنفسجي (Visagie واخرون ،2014)

وهذه النتائج تتفق مع العديد من الدراسات السابقة إذ اشار mateo وآخرون (2011) بأن انواعاً من فطر *Aspergillus* تنتشر وتنمو مستعمراتها بشكل سريع في المناطق الحارة أكثر من المناطق الباردة مثل الفطر *A.ochraceus* والفطر *A. flavus* وغيرها التي وتنمو بسرعة على الأوساط الغذائية الصناعية وتكون مستعمرات باشكال والوان مختلفة مميزة حسب النوع والتي على اساسها يسهل عملية تصنيفها الذي يعتمد به على الصفات المظهرية التي يمكن رؤيتها بالعين المجردة (samson وvarga، 2008).

كما ظهر الفطر *A.alternata* مستعمرة رمادية ومحاطة بحواف فاتحة والتي تتحول بتقدم العمر إلى مستعمرة ذات لون اسود او رمادي مسود وتحت المجهر يلاحظ تكون حوامل كونيدية قصيرة مقسمة بنية اللون تحمل الأبواغ الكونيدية كمثرية مقسمة طوليا وعرضيا بشكل مفرد أو سلاسل وتكون تصبغات سوداء بالجهة الخلفية للطبق . وقد يعزى اللون الأسود إلى افراز الفطر صبغة الميلانين ذات اللون الأسود(Kimura و Tsuge ،1993) وفي دراسة تم وصف شكل الجراثيم الكونيدية كمثري مع وجود تقسيمات عرضية وطولية والتقسيمات الطولية تكاد تتصل مع بعضها لتشكل خطأ عموديا متعرج قليلا(الحداد،2021). وتمتلك الجراثيم الكونيدية خلايا متعددة ذات انوية متعددة (Huang وآخرون،1996).

وتتوافق هذه النتائج مع دراسة أظهرت ان الفطر *A.alternata* عند الفحص المجهري وجد انه يكون مستعمرة رمادية فاتحة ومحاطة بحواف بيضاء التي تتحول بتقدم العمر إلى مستعمرة ذات لون أسود أو رمادي مسود، كون الفطر حوامل كونيدية قصيرة مقسمة بنية اللون تحمل الأبواغ الكونيدية بشكل مفرد أو سلاسل تتكون من 3-4 أبواغ في السلسلة، والأبواغ كبيرة الحجم عديدة الخلايا وقياس أبعادها 18.1-5.43×57.92-10.86 ميكرون فيها 0-3 حواجز طولية و1-8 حواجز عرضية، وعدد الخلايا من 17-2 خلية (Aljallad،2022).



الشكل (3): نماذج من مستعمرات اهم الفطريات المعزولة (A,a:Aspergillus *flavus*)
(B,b:A. *ochraceous*)(C,c:A.niger)(D,d:Alternaria.alternata)

اتفقت النتائج مع الكثير من الدراسات منها دراسة Bellaouchi واخرون (2021) التي تشير الى ان النمو المتميز للفطر *A. niger* يكون أبيض في البداية ، وسرعان ما يتحول إلى اللون الأسود . بينما اشار Mincuzzi واخرون (2023) الى امكانيه تنوع وتباين المستعمرات بالنسبة للفطر*Alternaria* في اللون (الأبيض، والبني، والأخضر العميق، و/أو الأسود) والملمس (المسطح، ورقيق، و/أو الصوفي) عند تعرضها لظروف بيئية مختلفة او تنميتها على أوساط زرعية مختلفة.

4-3: المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المدروسة

أظهرت النتائج تسجيل تباين كبير في المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية في أحداث مرض تعفن ثمار الرمان. اذ لوحظ وجود بعض الفروق المعنوية بين العزلات الفطرية المختبرة من حيث الضراوة المرضية فقد اظهرت أربع عزلات فطرية ضراوة مرضية عالية من بين 18 عزلة فطرية تم انتخابها على أساس معدلات التردد والظهور لعملية العزل والتشخيص اذ تم اختيار عزلة فطرية ممثلة لكل مجموعة عزلات النوع الواحد المعزولة من العينة نفسها المحددة ضمن أربع مجموعات من الفطريات (مجموعة *A.niger* و *A.flavus* و *A.ochraceous* و *A.alternata*).

اذ بينت النتائج بين العزلات الفطرية المختبرة والمعاملات المستعملة في طريقة التلقيح الصناعي (الحقن او التخديش) من حيث تأثيرها على النسبة المئوية لأحداث الاصابة لمرض تعفن ثمار الرمان. جدول (12) فقد تبين ظهور اربع عزلات فطرية كانت اكثر ضراوة بنسبة إصابة 100% ضمن معاملة التخديش وهي ***A.niger 4*** **(*KTAN*)** و ***A.flavus 1*** **(*KHAF*)** و ***A.ochraceous 2*** **(*KRAO*)** و***A.alternata 2*** **(*KCAA*)** بينما سجلت النسبة المئوية للإصابة في معاملة الحقن نسبة 100% لجميع العزلات الفطرية لذلك تم اعتماد طريقة التخديش في التلقيح الاصطناعي بالفطريات لثمار الرمان بالتجارب الخزنية اللاحقة.

تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي تشير ان الفطر *A.alternata* هو العامل الممرض الاكثر شيوعا وامراضية والمسبب عن تلف الرمان ما قبل وبعد الحصاد (Aloi واخرون،2021) ان العديد من أنواع الجنس *Alternaria* قادرة على إنتاج الانزيمات والسموم ، ونظرًا لقدرتها على النمو وإنتاج السموم في درجات حرارة منخفضة، فإنها يمكن أن

تكون ملوثات خطيرة للمواد الخام الزراعية والمحاصيل بعد الحصاد حتى في ظل ظروف التبريد. إذ اكدت الدراسات ان التفاوت بضراوة الفطريات باحداث المرض يعزى الى الاختلاف بالتركيب الوراثي للعزلات الفطرية والانزيمات المنتجة (Ezra واخرون، 2019).

الجدول (12) النسبة المئوية للإصابة في اختبار المقدرة الامراضية للعزلات الفطرية المنتخبة

ت	العزلة الفطرية	العينة المعزول منها	رمز العزلة الفطرية	% لنسبة الإصابة في معاملة الحقن	% لنسبة الإصابة في معاملة التخديش
1	***A.niger 1***	**KH**	***KHAN***	**100**	**80**
2	***A.niger 2***	**KR**	***KRAN***	**100**	**93.33**
3	***A.niger 3***	**KA**	***KAAN***	**100**	**86.66**
4	***A.niger 4***	**KT**	***KTAN***	**100**	**100**
5	***A.niger 5***	**BH**	***BHAN***	**100**	**73.33**
6	***A.niger 6***	**BS**	***BSAN***	**100**	**80**
7	***A.flavus 1***	**KH**	***KHAF***	**100**	**100**
8	***A.flavus 2***	**KR**	***KRAF***	**100**	**80**
9	***A.flavus 3***	**KT**	***KTAF***	**100**	**93.33**
10	***A.flavus 4***	**BH**	***BHAF***	**100**	**73.33**
11	***A.ochraceous 1***	**KH**	***KHAO***	**100**	**80**
12	***A.ochraceous 2***	**KR**	***KRAO***	**100**	**100**
13	***A.ochraceous 3***	**KA**	***KAAO***	**100**	**93.33**
14	***A.ochraceous 4***	**BH**	***BHAO***	**100**	**86.66**
15	***A.alternata 1***	**KH**	***KHAA***	**100**	**93.33**
16	***A.alternata 2***	**KC**	***KCAA***	**100**	**100**
17	***A.alternata 3***	**KA**	***KAAA***	**100**	**80**
18	***A.alternata 4***	**BM**	***BMAA***	**100**	**93.33**
L.S.D 0.05				**1.2524**	**1.3635**

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

فقد اكد Nouri واخرون (2020) ان هذه المسببات تهاجم الثمرة عن طريق إنتاج إنزيمات محللة للبشرة والجدار الخلوي ومركبات المقاومة لإزالة السموم الموجودة في انسجة جدار

الثمار يؤدي التفاعل المعزز بين العامل الممرض والمضيف إلى حدوث تغييرات في العمليات الفسيولوجية والكيميائية. في حين اكد Nallathambi وUmamaheswari (2009) ان الفطر *A. flavus* يقوم بإنتاج بعض الانزيمات لتحليل انسجة الثمار , فضلا عن انه يقوم بتخليق مجموعة من الأفلاتوكسينات في كل من وسط الاستزراع وفي ثمار الرمان المصابة بالإضافة إلى بعض المركبات الاخرى. إذ تم الكشف عن وجود الأفلاتوكسينات في ثمار الرمان المصابة بالفطر *A. flavus* .

وكذلك سجلت النتائج وجود الفروق المعنوية نفسها بين العزلات الفطرية المختبرة من حيث تأثيرها على النسبة المئوية لشدة الاصابة لمرض تعفن ثمار الرمان. جدول (13) فقد اظهرت العزلات الفطرية الأربع ضراوة عالية تمثلت بمعدلات شدة الإصابة بلغت 52% و 30% و26% و 24% على التوالي لمعاملة الحقن للعزلات و*A.alternata 2* (*KCAA*) و*A.niger 4* (*KTAN*) و*A.ochraceous 2* (*KRAO*) و *A.flavus 1* (*KHAF*) بينما سجلت النسبة المئوية لشدة الإصابة في معاملة التخديش نسبة العزلات الفطرية 44% و22% و20% و20% على التوالي للتسلسل السابق. إذ تم اختيار هذه العزلات الفطري الأربعة لاجراء التجارب اللاحقة تم انتخابها على أساس شدة ضراوتها واختلافها عن العزلات الأخرى.

وكذلك قد يعزى الاختلاف في قابلية الفطريات بأحداث المرض نتيجة الاختلاف درجات الحرارة والرطوبة العالية (Nargund واخرون، 2012).

الجدول (13) النسبة المئوية لشدة الإصابة في اختبار الامراضية للعزلات الفطرية المنتخبة

ت	العزلة الفطرية	العينة المعزول منها	رمز العزلة الفطرية	% لشده الإصابة في معاملة الحقن	% لشده الإصابة في معاملة التخديش
1	***A.niger 1***	**KH**	***KHAN***	**22**	**8**
2	***A.niger 2***	**KR**	***KRAN***	**19**	**17**
3	***A.niger 3***	**KA**	***KAAN***	**22**	**18**
4	***A.niger 4***	**KT**	***KTAN***	**30**	**22**
5	***A.niger 5***	**BH**	***BHAN***	**21**	**19**
6	***A.niger 6***	**BS**	***BSAN***	**20**	**18**
7	***A.flavus 1***	**KH**	***KHAF***	**24**	**20**
8	***A.flavus 2***	**KR**	***KRAF***	**20**	**18**
9	***A.flavus 3***	**KT**	***KTAF***	**17**	**15**
10	***A.flavus 4***	**BH**	***BHAF***	**20**	**16**
11	***A.ochraceous 1***	**KH**	***KHAO***	**22**	**14**
12	***A.ochraceous 2***	**KR**	***KRAO***	**26**	**20**
13	***A.ochraceous 3***	**KA**	***KAAO***	**15**	**12**
14	***A.ochraceous 4***	**BH**	***BHAO***	**20**	**7**
15	***A.alternata 1***	**KH**	***KHAA***	**18**	**16**
16	***A.alternata 2***	**KC**	***KCAA***	**52**	**44**
17	***A.alternata 3***	**KA**	***KAAA***	**20**	**26**
18	***A.alternata 4***	**BM**	***BMAA***	**22**	**14**
L.S.D 0.05				**0.5587**	**0.5676**

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

4-4: تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطريات المعزولة

اكدت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي لـ 4 عزلات فطرية التي تم عزلها من حالات تعفن ثمار الرمان المختلفة والتي أظهرت ضراوة شديدة في احداث مرض تعفن ثمار الرمان تحت ظروف مسيطر عليها، تشخيصها تحت انواع متباينة فقد اظهرت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي بان العزلات تعود الى الفطريات : *A.alternata* , *A.niger* , *A. flavus* , *A.ochraceus* . اذ تم تسجيل جميع العزلات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوي (NCBI) وتحت الرموز الخاصة المبينة ازاء كل منها في الجدول (14). اذ حققت التسلسلات النيوكليوتيدية الجزيئية اعلى نسبة تطابق تراوحت مابين 99.82 – 98.65 % مع المنطقة الجينية ITS عند مقارنتها مع التسلسلات النيوكليوتيدية المكافئة المسترجعة من بنك الجينات

في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) بأستخدام برنامج الـ (BLAST) ولكل عزلة فطرية بشكل منفرد. كما أُجريت التحاليل النيوكليوتيدية باستعمال برنامج (MEGA) لتحليل تتابع العزلات ورسم شجرة القرابة بين كل من هذه العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة بمركز (NCBI) حيث تم بناؤها من التسلسل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة ITS العائدة لكل من العزلات .

الجدول 14 : التشخيص الجزيئي لعزلات الفطريات المعزولة باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و GenBank Accession Number

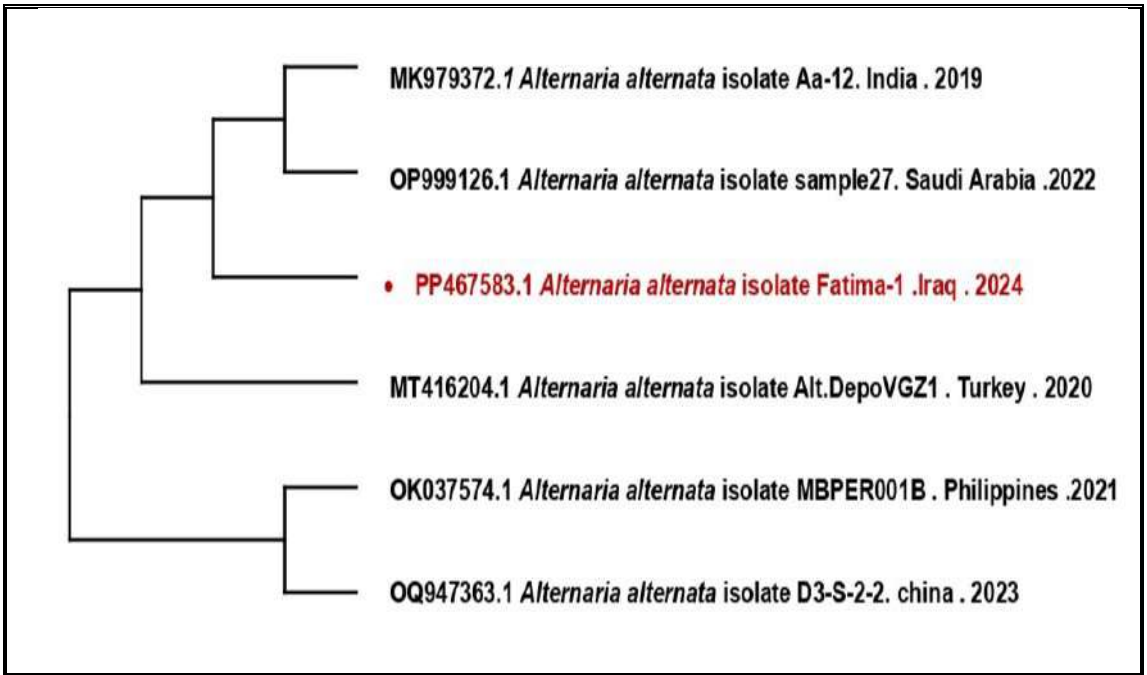
ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	Accession Number	رمز العزلات الفطرية
1	*Alternaria alternate*	*Isolate Fatima-1*	PP467583.1	*KCAA*
2	*Aspergillus flavus*	*Y.n.190.Fatima*	PQ034725	*KHAF*
3	*Aspergillus niger*	*Y.n.191.Fatima*	PQ034726	*KTAN*
4	*Aspergillus ochraceus*	*Y.n.192.Fatima*	PQ034727	*KRAO*

4-4-1: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.alternata Isolate Fatima-1* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية

لوحظ عن طريق مقارنة التتابعات النيوكلوتيدية لحزمة الحامض النووي للفطر *A.alternata Isolate Fatima-1* المعزول من ثمار الرمان مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابة الوراثي بلغت (99.82 – 99.46%) مع جميع عزلات الفطر *A.alternata* (جدول15). في حين أظهر الشكل (4) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة أظهرت تقارب وراثي كبير (نفس الانحدار الجيني) مع العزلتين السعودية والهندية المسجلة تحت ارقام إيداع (OP999126.1 و MK979372.1) على التوالي . في حين أظهرت تقارب مع العزلة التركية (MT416204.1) بانحدار جيني ثانوي . بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الفلبينية (OK037574.1) و والصينية (OQ947363.1) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 15: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.alternata Isolate Fatima-1* وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر نفسه المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	Accession Number	Sequence similarity	تأريخ التسجيل
1	*A.alternata*	Fatima-1	Iraq	PP467583.1	%100	2024
2	*A.alternata*	isolate Aa-12	India	MK979372.1	%99.82	2019
3	*A.alternata*	sample27	Saudi Arabia	OP999126.1	%99.64	2022
4	*A.alternata*	D3-S-2-2	China	OQ947363.1	%99.46	2023
5	*A.alternata*	Alt.DepoVGZ1	Turkey	MT416204.1	%99.46	2020
6	*A.alternata*	MBPER001B	Philippines	OK037574.1	%99.46	2021



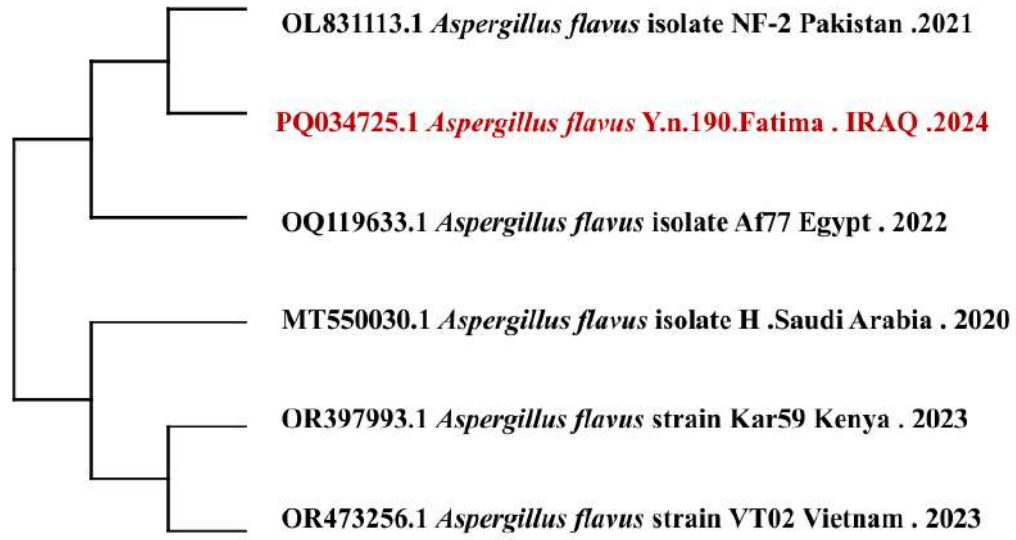
الشكل (4) الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.alternata Isolate Fatima-1*

4-4-2: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.flavus . Y.n.190.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية للفطر نفسه

لوحظ عن طريق مقارنة التتابعات النيوكلوتيدية لحزمة الحامض النووي للفطر *A.flavus . Y.n.190.Fatima* المعزول من ثمار الرمان مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.64 – 99.46%) مع جميع عزلات الفطر *A.flavus* (جدول16). في حين أظهر الشكل (5) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة أظهرت تقارب وراثي كبير (نفس الانحدار الجيني) مع العزل الباكستانية المسجلة تحت رقم الإيداع (**OL831113.1**). في حين أظهرت تقارب مع العزلة المصرية (**OQ119633.1**) بانحدار جيني ثانوي. بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الفيتنامية (**OR473256.1**) و الكينية (**OR397993.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 16: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.flavus . Y.n.190.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر نفسه المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	Accession Number	Sequence similarity	تأريخ التسجيل
1	***A.flavus***	***Y.n.190.Fatima***	**IRAQ**	**PQ034725**	**%100**	**2024**
2	***A.flavus***	**isolate NF-2**	**Pakistan**	**OL831113.1**	**%99.64**	**2021**
3	***A.flavus***	**isolate Af77**	**Egypt**	**OQ119633.1**	**%99.64**	**2022**
4	***A.flavus***	**Isolate H**	**Saudi Arabia**	**MT550030.1**	**%99.46**	**2020**
5	***A.flavus***	**strain VT02**	**Vietnam**	**OR473256.1**	**%99.46**	**2023**
6	***A.flavus***	**strain Kar59**	**Kenya**	**OR397993.1**	**%99.46**	**2023**



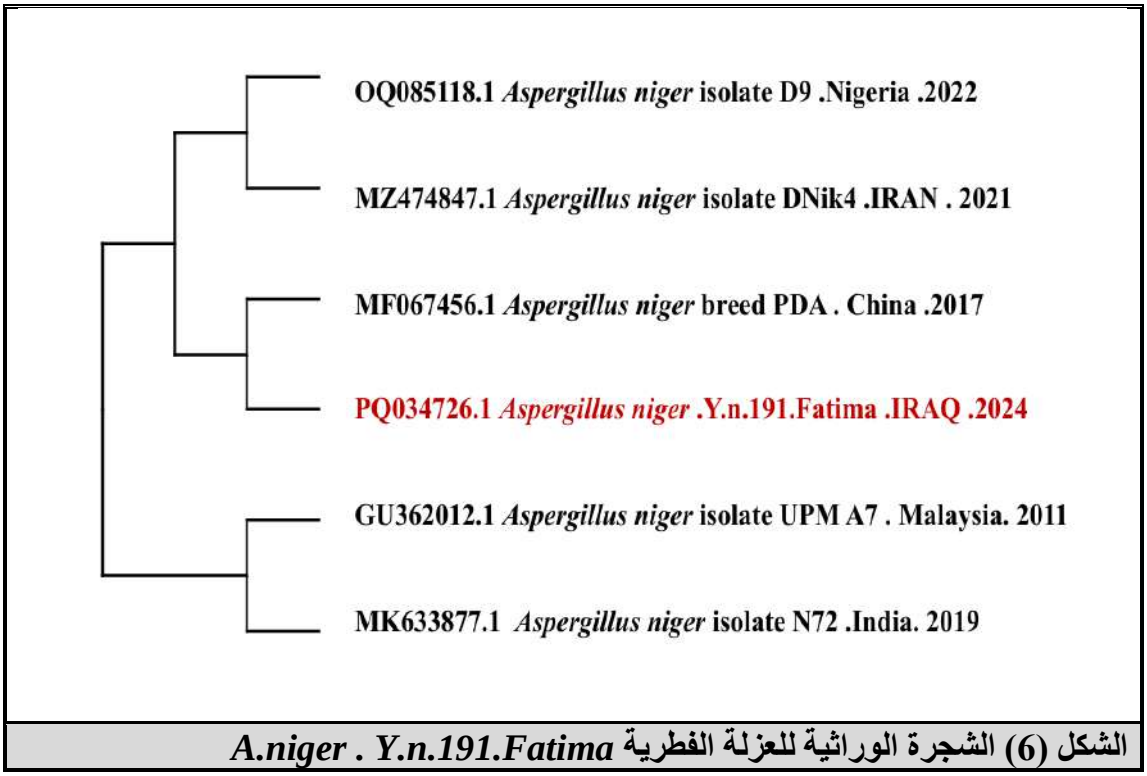
الشكل (5) الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.flavus . Y.n.190.Fatima*

3-4-4: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.niger . Y.n.191.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية للفطر نفسه

لوحظ عن طريق مقارنة التتابعات النيوكلوتيدية لحزمة الحامض النووي للفطر *A.niger . Y.n.191.Fatima* المعزول من ثمار الرمان مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.64 – 99.29%) مع جميع عزلات الفطر *A.niger* (جدول 17). في حين أظهر الشكل (6) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة أظهرت تقارب وراثي كبير (نفس الانحدار الجيني) مع العزل االصينية المسجلة تحت رقم الإيداع (**MF067456.1**) . في حين أظهرت تقارب ثانوي مع العزلتين الإيرانية (**MZ474847.1**) والنيجيرية (**OQ085118.1**) بانحدار جيني ثانوي . بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الهندية (**MK633877.1**) و الماليزية (**GU362012.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 17: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.niger . Y.n.191.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى للفطر نفسه المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	Accession Number	Sequence similarity	تأريخ التسجيل
1	*A.niger*	*Y.n.191.Fatima*	Iraq	PQ034726.1	%100	2024
2	*A.niger*	breed PDA	china	MF067456.1	%99.65	2017
3	*A.niger*	isolate DNik4	IRAN	MZ474847.1	%99.64	2021
4	*A.niger*	isolate D9	Nigeria	OQ085118.1	%99.29	2022
5	*A.niger*	isolate N72	India	MK633877.1	%99.46	2019
6	*A.niger*	isolate UPM A7	Malaysia	GU362012.1	%99.46	2011



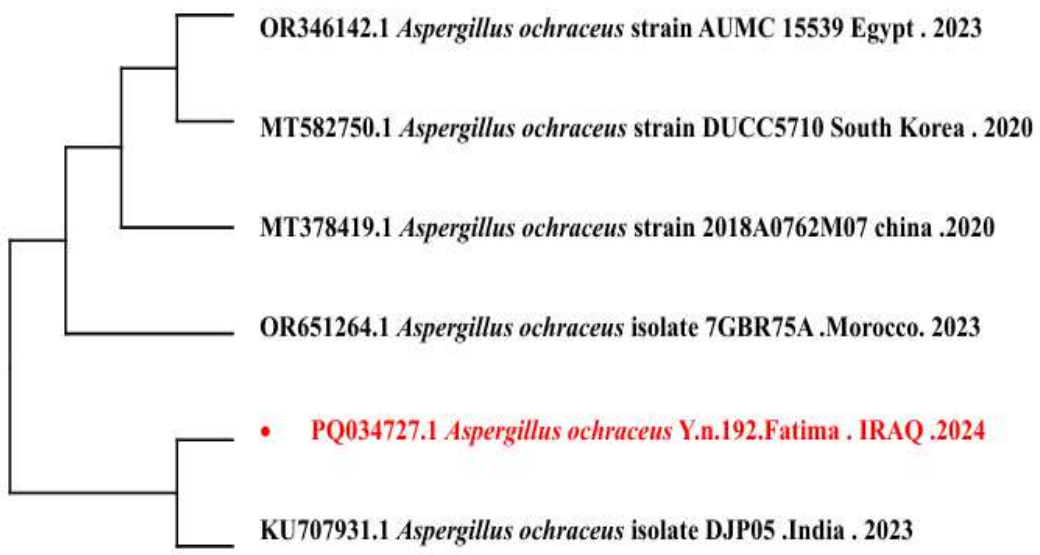
الشكل (6) الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.niger . Y.n.191.Fatima*

4-4-2: تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية للفطر نفسه

لوحظ عن طريق مقارنة التتابعات النيوكلوتيدية لحزمة الحامض النووي للفطر ***A.ochraceus . Y.n.192.Fatima*** المعزول من ثمار الرمان مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت (99.64 – 99.46%) مع جميع عزلات الفطر ***A.ochraceus*** (جدول18). في حين أظهر الشكل (7) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة أظهرت تقارب وراثي كبير (الانحدار الجيني نفسه) مع العزل الهندية المسجلة تحت رقم الإيداع (**KU707931.1**) في حين أظهرت تقارب ثانوي مع العزلة المغربية (**OR651264.1**) بانحدار جيني ثانوي. بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الكورية الجنوبية (**MT582750.1**) و المصرية (**OR346142.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 18: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima* وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر Fungal name	رمز العزلة Isolate name	مكان العزلة Origin	Accession Number	Sequence similarity	تأريخ التسجيل
1	*A.ochraceus*	*Y.n.192.Fatima*	Iraq	PQ034727.1	%100	2024
2	*A.ochraceus*	isolate DJP05	India	KU707931.1	%99.61	2016
3	*A.ochraceus*	strain DUCC5710	South Korea	MT582750.1	%98.65	2020
4	*A.ochraceus*	018A0762M07	china	MT378419.1	%98.65	2020
5	*A.ochraceus*	7GBR75A	Morocco	OR651264.1	%98.65	2023
6	*A.ochraceus*	AUMC 15539	Egypt	OR346142.1	%98.65	2023



الشكل (7) الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية *A.ochraceus . Y.n.192.Fatima*

استخدمت تقانة التشخيص الجزيئي بشكل واسع في العقود الأخيرة لتشخيص الفطريات وخاصة تلك الفطريات التي يصعب تشخيصها الى مستوى النوع وذلك لتقارب المظهري فيما بينها فضلاً عن عدم ثبات الصفات المظهرية نتيجة لتاثرها في البيئة، فقد استخدم التحليل النيوكليوتيدي للجين في تشخيص انواع الفطر *Aspergillus* sp بشكل كبير لصعوبة التشخيص المظهري (Alshehri وPalanisamy ، 2020).

إن التشخيص المعتمد على التركيب الوراثي يمتلك حساسية وتخصص عالي يصل إلى 100 % لتفسير النتائج والربط بين المجاميع المتقاربة وراثيا، وإن الطرائق التقليدية غير كفؤة في تميز الأنواع المتشابهة وراثياً فقد تصل حساسيتها وتخصصها إلى80 %، وبذا فإن كان هناك اختلاف في النمط المظهري لمجموعة الأنواع المنتمية إلى جنس واحد من الفطريات فالمحتوى الوراثي لهذه المجموعة يبقى متقاربا ولا يتغير إلا تحت ظروف معينة خلافا للنمط المظهري الخاضع لظروف بيئية معينة، ولذا يتوقع وجود اختلافات بين الأنواع المحددة بطرائق مختلفة (Pommerenke وآخرون، 2011).

أن المنطقة البينية المستنسخة (Internal Transcribed Spacer (ITS ما بين الجينات الرايبوسومية المحافظة خاصة الجين الرايبوسومي المحافظ rRNA أكثر ملاءمة

لتشخيص الأنواع والسلالات الفطرية وإمكانية دراسة العلاقة التطورية (Phylogenetic) للأنواع ذات الصلة الوثيقة والمتقاربة جـــــــــدا باستعمال هذة المنطقة (Rassin وآخرون، 2015) و ذكر Stool واخرون (2005) أن هذه المنطقة البينية (الفاصل) تقع بين جين s18 وجين 28 s rRNA ان فاصل ITS يقسم إلى فاصل 1 ITS والذي يفصل الجين الرايبوسومي المحافظ 18 s rRNA والجين5.8s ، وفاصل ITS2 الذي يفصل الجين 5.8 s rRNA و 28 S rRNA Tsang وأخرون(2016) لذا تعد المنطقة البينية (الفواصل) ITS محافظة بدرجة كبيرة نتيجة للقيود التطورية القليلة وبذلك فأنها تستعمل بنجاح في تمييز الأنواع ضمن الجنس الواحد للفطريات وأوضحوا إن تعاقبات ITS تقع بين الوحدات الثانوية الصغرى والكبرى من rDNA والفواصل غير المستنسخة Nontranscribed Spacer (NTS) التي تفصل بين مجموعات الجينات الرايبوسومية ذات التباين الكبير بين الأنواع على العكس من جينات rRNA التي تخضع لقيود تطورية وبذلك تكون أقل محافظة (Tsang، 2016).

4-5: تقييم كفاءة عدد من المستخلصات النباتية والمبيدات الكيميائية والعامل الاحيائي (الخميرة *S.cervisiae*) ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا.

4-5-1: تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

بينت النتائج ان هناك وجود فروق معنوية بين جميع المستخلصات النباتية التي عملت على تثبيط نمو العزلتين الفطريتين بنسب مختلفة حيث أظهر في بعض المستخلصات فعالية تثبيطية عالية وصلت النسبة المئوية للتثبيط إلى 100 % جدول (19) و شكل (8) فقد أظهرت النتائج أن مستخلص الميرمية ومستخلص الكزبرة تفوق معنويا في منع الفطريات من النمو بشكل نهائي، اذ سجل أعلى نسبة مئوية للتثبيط 100% مقارنة بمعاملة الفطر الممرض 0.00% وتلتها المستخلصات الأخرى اذ سجل مستخلص الزعتر والقرنفل ثم السمسم والدارسين نسبة تثبيط عالية ضد نمو الفطريات بلغت 89% و83% و75% و72% على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة 0.00% اذ تم اختيار مستخلصي الميرمية والكزبرة كأفضل المستخلصات النباتية المستخدمة لاستعمالها في التجارب اللاحقة.

الجدول (19) **تأثير المستخلصات النباتية ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا**

ت	المعاملة	النسبة المئوية لتثبيط الفطريات الممرضة		معدل المعاملة
		A.alternata	***A.niger***	
1	الممرض+ مستخلص الميرمية	100	100	100
2	الممرض+ مستخلص الكزبرة	100	100	100
3	الممرض + مستخلص الزعتر	94.44	83.33	89
4	الممرض + مستخلص الدارسين	77.77	66.66	72
5	الممرض + مستخلص القرنفل	88.88	77.77	83
6	الممرض + مستخلص السمسم	83.33	66.66	75
7	الممرض+ كحول فقط (control)	0.00	0.00	0
L.S.D 0.05		الفطر	المعاملة	التداخل
		2.4995	2.3231	4.8226

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

اتفقت هذه النتائج مع دراسات سابقة بتقييم فعالية المستخلصات النباتية , فقد اشارت (محمد (2019) الى ان التركيز 20 ميكروليتر\مل للمستخلص الكحولي لنبات الكزبرة (*Coriandere sativaen*) كان أكثر فاعلية في تثبيط نمو الفطريات الممرضة المدروسة *A*, *Aspregillus* , *Alternaria* في دراسة أخرى تمت دراسة التأثير التثبيطي للمستخلصات الكحولية لنبات الميرمية (*Salvia officinalis*) اذ تم اختبار خمس تراكيز لكل نوع من هذه المستخلصات (5%، 10%، 15%، 20%، 25%) لتأثيرها في تثبيط النمو الفطري لأنواع من الفطريات الخيطية المعزولة من التربة (*Aspregillus niger, Alternaria alternata*) أظهرت النتائج أن لمستخلص الميرمية الكحولي تأثير مثبط لنمو الفطريات على الوسط الغذائي اكثر من المستخلص المائي (Abuaziza وAhamdi، 2023).

4-5-2: اختبار كفاءة بعض المبيدات ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

بينت النتائج ان المبيد الكيميائي ذو الاصل النباتي Palizin اظهر فرق معنوي من حيث التثبيط فقد اعطى أعلى معدل تثبيط للعزلات الفطرية الممرضة بنسبة 88.89% جدول (20) والشكل (8) بينما سجل المبيد Tondexir معدل تثبيط بلغ 79.62% مقارنة بمعاملة السيطرة 0.00%.

في حين بينت النتائج ان هناك فروق معنوية بين المبيدين من حيث تأثر الفطر*A.alternata* بالمبيدين فقد اظهر تفوقا معنويا في ازدياد معدل التأثر كان اعلى من معدل تأثر الفطر *A.niger*اذ بلغت 86.11% و82.40% على التوالي.

وان التركيز 0.3% للمبيد Palizin قد منع من نمو الفطريات بشكل نهائي فكانت النسبة المئوية للتثبيط 100% مقارنة بمعاملة الفطر الممرض 0.00%. كما اعطى المبيد *Tondexir* نسبة تثبيط عالية بلغت 94.44% و 88.88% لنفس التركيز وللفطرين *A.alternata* و *A.niger* على التوالي.

إذ اثبتت دراسات سابقة ان استخدام المبيدات الفطريات ذو الاصل النباتي .تعتبر طرق امنة وبديلة بمكافحة الفطريات التي تصيب المحاصيل بعد الحصاد (Mohd Zainudin واخرون،2024) ذكرت العديد من الدراسات ان لبعض المبيدات ذات الأصل النباتي سمية عالية لا تقل عن مثيلتها من المبيدات الكيمياوية المصنعة الا انها تتحلل سريعا الى مواد طبيعية غير سامة بعد استعمالها بفترة زمنية قصيرة كما انها لا تترك تأثيًرا سلبيًا على البيئة (Kabiri و Amiri-Besheli،2012)

الجدول (20) اختبار كفاءة المبيدين Palizin و Tondexir ضد نمو العزلات الفطرية

المبيد	التركيز	النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر		معدل تأثير التركيز	معدل تأثير المبيد
		A.alternata	*A.niger*		
Palizin	%00	0.00	0.00	0.00	88.89
	%0.1	83.33	77.77	80.55	
	%0.2	88.88	83.33	86.11	
	%0.3	100.00	100.00	100.00	
Tondexir	%00	0.00	0.00	%0.00	79.62
	%0.1	66.66	66.66	66.66	
	%0.2	83.33	77.77	80.55	
	%0.3	94.44	88.88	91.66	
معدل تأثير الفطر		86.11	82.40		
L.S.D 0.05		المبيد	التركيز	الفطر	التداخل
		3.5653	2.2524	2.1154	7.9331

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

3-5-4: اختبار كفاءة الخميرة *S. cervisiae* ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

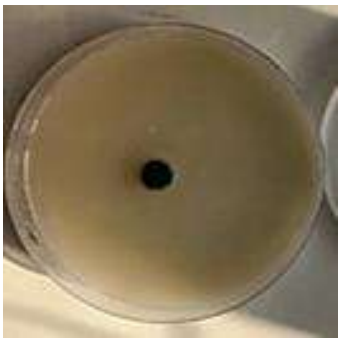
بينت النتائج ان **الخميرة *S. cervisiae*** اعطت معدل تثبيط عالي ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة وبمعدل 97 % مقارنة بمعاملة السيطرة 0.00% جدول (21) والشكل (8). في حين بينت التنائج وجود فرق معنوي من حيث تأثر الفطر *A.alternata* بتراكيز الخميرة المختلفة كان اعلى من معدل تأثر الفطر*A.niger* اذ بلغت 91% و 85% على التوالي. بينما اظهر التخفيف السادس من عالق الخميرة تفوق معنوي من حيث المقدرة على منع نمو عزلة الفطر *A.alternata* بشكل نهائي فكانت النسبة المئوية للتثبيط 100% مقارنة بمعاملة الفطر الممرض *A.niger* 94.44%.

بينما التخفيف الثامن والعاشر سجلا نسب تثبيط متباينة بمعدل 86% و81% على التوالي . لذلك تم اختيار التخفيف السادس لتطبيقة بالتجارب اللاحقة .

جدول (21) اختبار كفاءة الخميرة *S. cervisiae* ضد نمو العزلات الفطرية الممرضة مختبريا

المعاملة	التخفيف	النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر		معدل تأثير التخفيف	معدل التأثير
		A.alternata	*A.niger*		
S. cervisiae + *الممرض*	$1*10^{-6}$	100	94.44	97	88
	$1*10^{-8}$	88.88	83.33	86	
	$1*10^{-10}$	83.33	77.77	81	
(control) الممرض فقط		0.0	0.0	0.0	0.0
معدل تأثير الفطر		91	85		
L.S.D 0.05		المعاملة	التركيز	الفطر	التداخل
		1.8589	1.5571	1.8589	5.2749

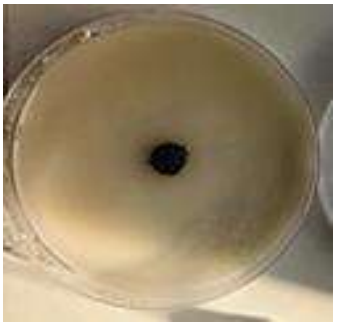
Aspergillus فقط (control)



Aspergillus + الخميرة *S.cervisiae*

Alternaria فقط (control)

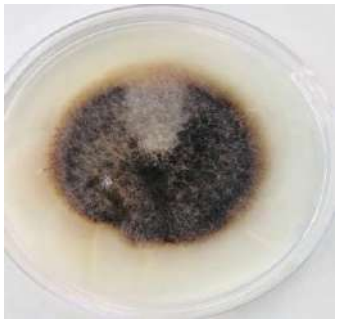
Aspergillus + مستخلص الميرمية



Alternaria + الخميرة *S.cervisiae*

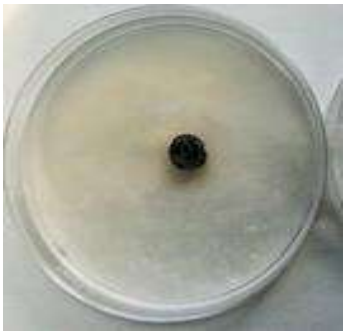
Alternaria + مستخلص الميرمية

Aspergillus + مستخلص الكزبرة



Alternaria + ايثانول (control)

Alternaria + مستخلص الكزبرة



Aspergillus + المبيد *Palizin*

Aspergillus + ايثانول (control)

Alternaria + المبيد *Palizin*

الشكل (8) نماذج لأفضل معاملات التضاد المستخدمة ضد *Alternaria sp* و *Aspergillus sp* مختبريا

4-6: أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في المخزن

تبينت نتائج اجراء هذه التجربة التي نفذت لتقييم فعالية المبيد (Palizin) و مستخلصي نبات الميرامية نبات الكزبرة والتخفيف السادس من عالق الخميرة *S.cervisiae*. في تثبيط مهاجمة الفطريات الممرضة في احداث الإصابة بمرض تعفن ثمار الرمان. ان جميع هذه العوامل خفضت من النسبة المئوية لاحداث الإصابة وكذلك تثبيط من شدة الإصابة مقارنة بمعاملة السيطرة (معاملة الممرض فقط).

اذ بينت نتائج حساب النسبة المئوية لحدوث المرض بعد 21 يوم من تنفيذ التجربة بان مستخلص الكزبرة قد تفوق معنوياً بخفض نسبة الإصابة الى 73% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 100% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من احداث الإصابة بلغ 27% (جدول 22) تلتها المعاملة بالمبيد ذو الأصل النباتي Palizin بخفض النسبة المئوية لحدوث المرض بمعدل 78% وبمعدل تثبيط بلغ 22%. في حين جاءت معاملتي مستخلص نبات الميرمية والعامل الحيوي (الخميرة *S.cervisiae*) أخيرا , بمعدل خفض لنسبة احداث الإصابة بلغت 80% و82% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 20% و18% مقارنة بمعاملة السيطرة.

اما ما يتعلق بكفاءة او مقدرة العزلات الفطرية المختبرة على مقاومة عوامل المكافحة المستخدمة واحداث المرض فقد أظهرت العزلة *A.alternate* اعلى معدل للمقاومة ضد هذه العوامل وسجلت اعلى نسبة مئوية لاحداث الإصابة بلغت 88% , يليه الفطر *A.niger* بمعدل نسبة إصابة بلغت 82% مقارنة بمعاملة السيطرة 100% بينما سجل الفطرين *A.flavus* و *A.ochraceous* معدل نسبة إصابة بلغت 79% لكليهما.

الجدول(22) تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن

المعاملة	النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالفطريات الممرضة				معدل المعاملة	% للتثبيط
	A.alternate	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*		
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0	-----
(Path)only	100	100	100	100	100	0.00
(Path)+(*S.cervi.*)	93.33	80	73.33	80	82	18
(Path)+(*Palizin*)	86.66	86.66	73.33	66.66	78	22
(Path)+(ex.*S.o*)	80	86.66	80	73.33	80	20
(Path)+(ex.*C.s*)	80	73.33	66.66	73.33	73	27
معدل % لحدوث اصابة الفطر	88	85	79	79		
L.S.D 0.05	المعاملة		الفطر		التداخل	
	1.9958		2.5756		4.5714	

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

كذلك اظهرت نتائج حساب النسبة المئوية لشدة الاصابة بعد 21 يوم من تنفيذ التجربة ان مستخلص الكزبرة قد تفوق وبفارق معنوي كبير بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة الى 8.06% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 25.88% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من شدة احداث الإصابة بلغ 68.85% (جدول 23 والشكل9 , 10 , 12, 11) تلتها المعاملة بمستخلص نبات الميرمية بخفض النسبة المئوية لشدة حدوث الاصابة بمعدل 9.98% وبمعدل تثبيط بلغ 61.43% . في حين جاءت معاملتي المبيد ذو الأصل النباتي Palizin والعامل الحيوي (خميرة *S.cervisiae*) أخيرا بمعدل خفض لنسبة شدة احداث الإصابة بلغت 10.04% و11.06% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 61.20% و57.26% مقارنة بمعاملة السيطرة.

اما بخصوص بكفاءة او مقدرة العزلات الفطرية المختبرة على مقاومة عوامل المكافحة المستخدمة واحداث شدة الإصابة فقد أظهرت العزلة *A.alternate* اعلى معدل للمقاومة ضد هذه العوامل وسجلت اعلى معدل للنسبة المئوية لشدة الإصابة بلغت

17.36% , يليه الفطر *A.niger* بمعدل شدة إصابة بلغت 12.89 % مقارنة بمعاملة السيطرة 25.00% بينما سجل الفطر *A.flavus* 11.17% والفطر *A.ochraceous* 10.59% معدل لنسبة شدة الإصابة.

الجدول(23) تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لشدة الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن

المعاملة	النسبة المئوية لشدة الإصابة بالفطريات الممرضة				معدل المعاملة	% للتثبيط
	A.alternate	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*		
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0	-----
(Path)only	40.26	23.23	21.66	18.40	25.88	0.00
(Path)+(*S.cervi.*)	13.66	10.73	9.80	10.06	11.06	57.26
(Path)+(*Palizin*)	12.46	11.86	7.73	8.13	10.04	61.20
(Path)+(ex.*S.o*)	11.26	10.13	9.13	9.40	9.98	61.43
(Path)+(ex.*C.s*)	9.20	8.53	7.53	7.00	8.06	68.85
معدل % لشدة اصابة الفطر	17.36	12.89	11.17	10.59		
L.S.D 0.05	المعاملة		الفطر		التداخل	
	2.016		1.8032		4.032	

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

هناك العديد من الدراسات تتفق على ان المستخلصات النباتية تعمل على الحد من نمو العديد من الفطريات وبالتالي تقلل من نسب الاصابة والتلوث (Cowan ، 1999) ان المستخلص الكحولي لبذور الكزبره يعتبرمصدر محتمل للمكونات النشطة بيولوجيًا وتطبيقاته كعامل مضاد للفطريات (Sumalan واخرون، 2019) فقد أظهر مستخلص نبات الكزبرة تثبيطًا بنسبة 100% لنمو الفطريات *A. terreus* و*A. niger* و*F. graminearum* و*F. Oxysporum*. (Singh,واخرون ,2006) . وفي دراسة عن التأثيرات المثبطة للزيوت الأساسية لنبات المريمية (Salvia officinalis) والكزبرة (Coriandrum sativum) على نمو الفطريات وتبين نتيجة هذا البحث أن وجود المستخلصات سيكون السبب الرئيسي في تقليل نمو الفطريات كمثل اجناس *Aspergillus* منها *A.flavus* و*A.fumigatus* ، *A.ochraceus*

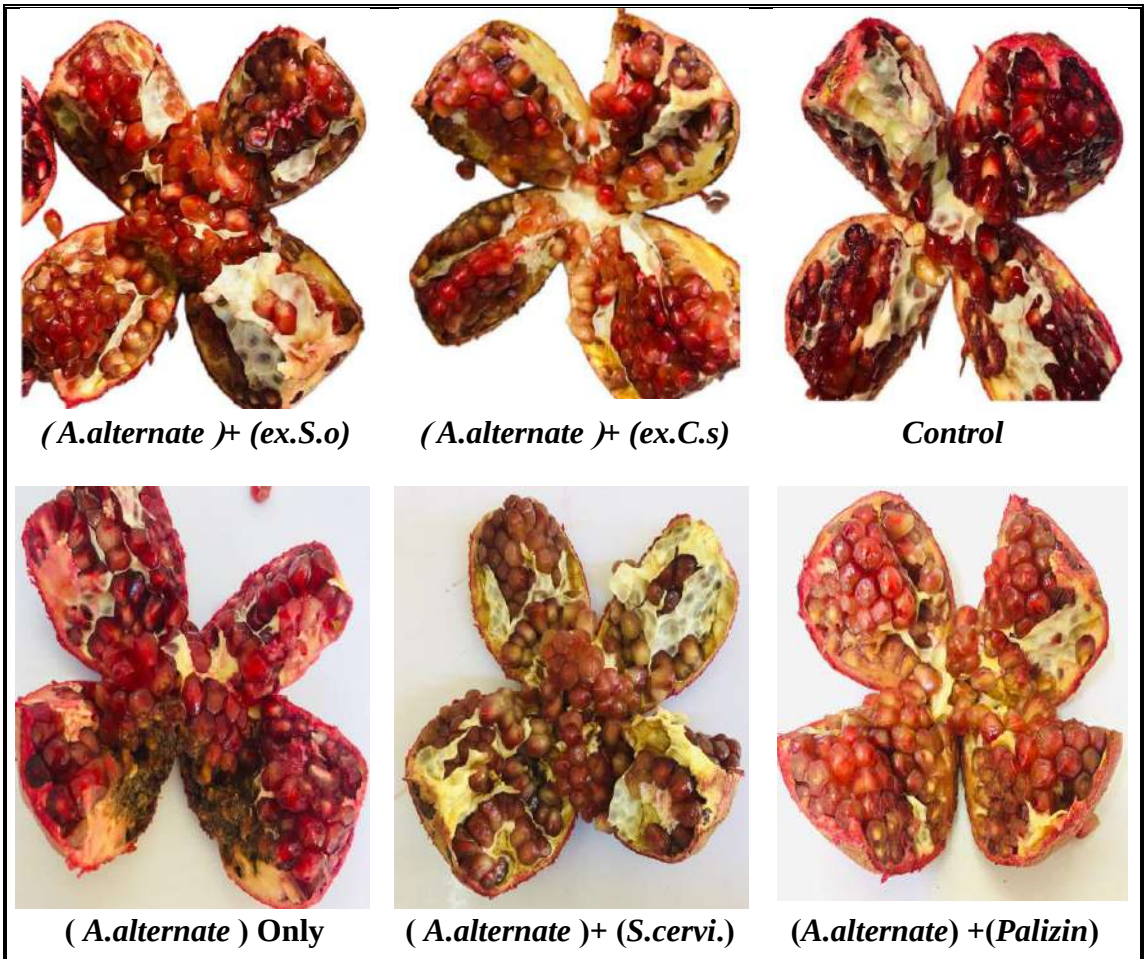
(Yahyaabadiواخرون،2011). بينما تم التأكد من فعالية مستخلص الكزبرة في مكافحة *A.alternaria* (KURKINA اخرون) وقد وجد أن جميع الزيوت العطرية المدروسة لها خصائص مضادة للفطريات، ويمكن أيضًا استخدام زيت المريمية العطري ذو التأثير المتوسط للفطريات، (Dellavalleواخرون، 2011).

اختبر النشاط المضاد للفطريات للمستخلصات النباتية الخام وتخفيفاتها الخاصة من النباتات الطبية ضد *Alternaria sp*. إذ اعطى مستخلص الميرمية *S. officinalis* ، نشاطًا مضادًا للفطريات في المختبر، مع قيم تثبيط تزيد عن 90%. (Rashidi واخرون,2011) بينما سجل مستخلص الميرمية نسبة تثبيط مقاربة لاجناس الفطر Aspergillus *A.flavus*,*A.niger*, *A.ochreacus*, والتي تعتبر من الانواع الاكثر مقاومة. في حين اكدت دراسة Lima واخرون (2016) سيكون هناك أمل في المستقبل، من خلال استخدام المواد الفعالة من النباتات للوصول إلى تأثيرات مقبولة مع عدم وجود آثار جانبية ومضاعفات لعلاج الأمراض.

وقد اثبت ان السبب في فاعلية الخميرة *S.cerevisiae* في تثبيط العديد من الفطريات إلى سرعة نموها ومنافستها على المكان والغذاء أوبسبب تطفلها على الفطر الممرض فهي آليات مقترحة لفعل الخمائر كعوامل مكافحة احيائية (El-Nady وShalaby ، 2008) إذ اكد Persons واخرون (2013) أن التركيزات المرتفعة من *S. cerevisiae* تكون فعالة اكثر في تثبيط نمو أنواع الفطر *Aspergillus* في جميع درجات الحرارة، ولكن تأثيراتها تكون أكثر وضوحًا عند 22 درجة مئوية. تشمل الآثار الأوسع لهذه الدراسة إمكانية استخدام S. cerevisiae كعامل تحكم بيولوجي لحماية المنتجات الزراعية التي يستهلكها البشر عادةً من السموم الفطرية التي تنتجها *A.flavus* و*A.parasiticus* . وكذلك اشارات دراسات اخرى الى لتقييم الخصائص المضادة للخميرة. اذ تم تحديد إنتاج الإنزيمات الخارجية المحللة بواسطة سلالات الخميرة. في تجارب البيوت البلاستيكية تم تقييم قدرة سلالات الخميرة على استعمار سطح أوراق البطاطا وتقليل أعراض الفطر *Alternaria* على النباتات. قامت سلالة *Saccharomyces cerevisiae* بتثبيط نمو فطريات *Alternaria* وخفضت بشكل أكثر فعالية أعراض *Alternaria* على النباتات الملقحة (من حوالي 60٪ إلى 90٪ لـ *A. solani* و لـ*A. alternata*) بعد سبعة أيام. أنتجت هذه السلالة الإنزيمات المثبطة ، مثل الأميليز والبكتيناز

والبروتياز. بعد 18 يومًا وهي واعدة لمزيد من الاختبارات الميدانية (Kowalska واخرون، 2022)

إذ اثبتت دراسات سابقة ان استخدام مبيدات الفطريات الكيميائية ذو الاصل النباتي .تعتبر طرق امنة وبديلة بمكافحة الفطريات التي اصيب المحاصيل بعد الحصاد (Mohd Zainudin واخرون، 2024) ان المبيدات ذات الأصل النباتي (Palizin) كبدائل للمواد الكيميائية والتي تكون الاقل سمية للإنسان وحيواناته وذات تأثير قاتل وطارد للآفات المخزنية (عمران، 2021)



الشكل(9) نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.alternate* في المخزن

(A.niger)+ (ex.S.o)

(A.niger)+ (ex.C.s)

Control

(*A.niger*) Only

(*A.niger*)+ (*S.cervi.*)

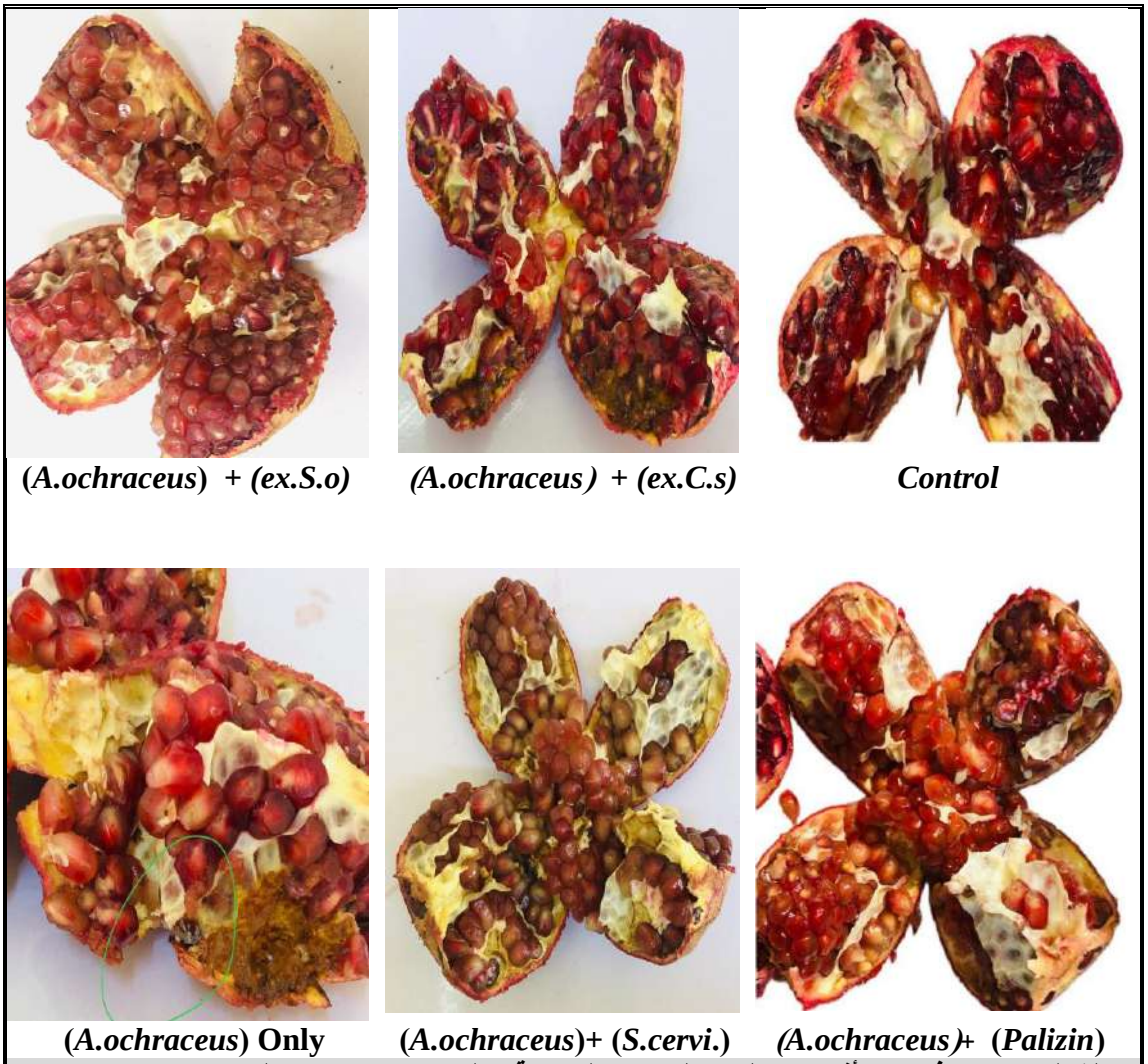
(*A.niger*) +(*Palizin*)

الشكل(10) :نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.niger* في المخزن

(*A.flavus*) + (*ex.S.o*) (*A.flavus*) + (*ex.C.s*) *Control*

(*A.flavus*) Only (*A.flavus*)+ (*S.cervi.*) (*A.flavus*) +(*Palizin*)

الشكل(11): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.flavus* في المخزن



الشكل(12): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.ochraceus* في المخزن

4-7: الكشف عن قابلية الفطريات الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان ودور عامل المكافحة في السيطرة على انتاجها في المخزن

بينت نتائج هذا الاختبار تلوث العديد من ثمار الرمان بالسموم الفطرية , اذ اجري هذا الكشف على نفس نتاج التجربة الخزنية التي نفذت لتقييم فعالية عدد من عوامل المكافحة في تثبيط مهاجمة الفطريات الممرضة في احداث مرض تعفن ثمار الرمان. تم الكشف عن انتاج السموم الفطري في معاملتي الفطر الممرض فقط ومعاملة

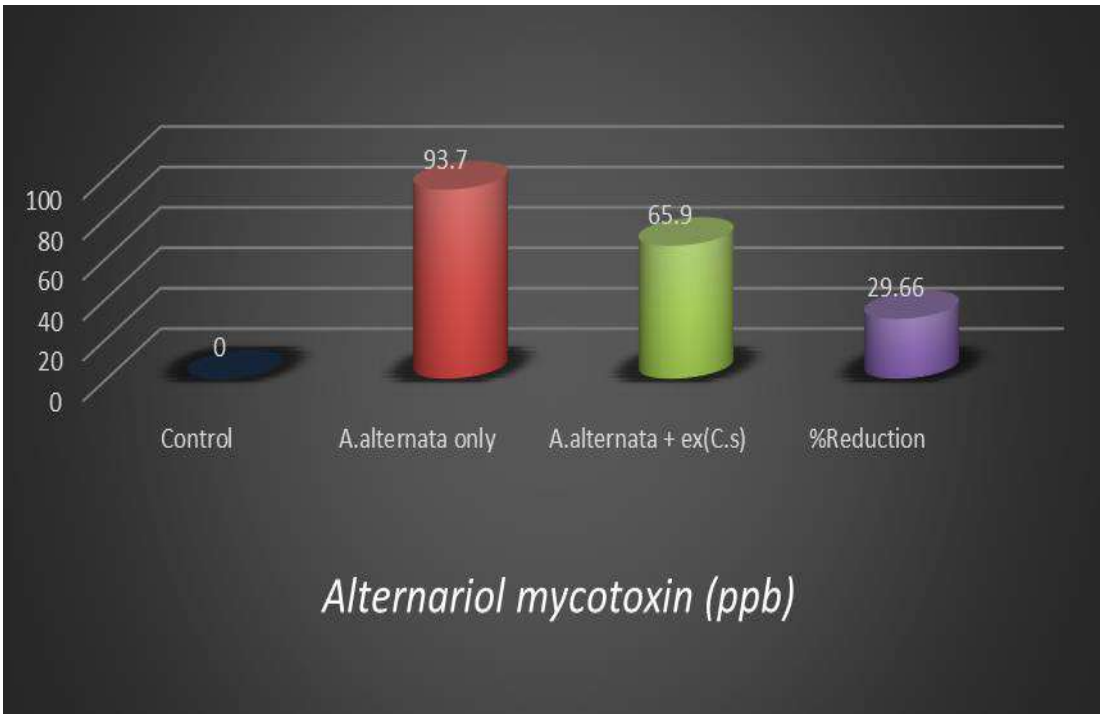
السيطرة بدون فطر للمقارنة مع معاملة افضل عامل مكافحة في تثبيط الإصابة وهو مستخلص الكزبرة لتقييم دورة في منع الفطريات من انتاج السموم الفطرية .

أظهرت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC مقدرة جميع العزلات الفطرية الاربع المختبرة (*A.alternate* و*A.niger* و*A.flavus* و*A.ochraceous*) على انتاج مجموعة سموم فطرية مختلفة الأنواع تضمنت (*Aflatoxin* B1 و *Ochratoxin A* و *Alternariol*) وبمستويات انتاجية مختلفة تراوحت بين عالية الإنتاجية ومنخفضة الإنتاجية .

1-7-4: الكشف عن قابلية الفطر *A.alternate* على انتاج السم الفطري *Alternariol* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن

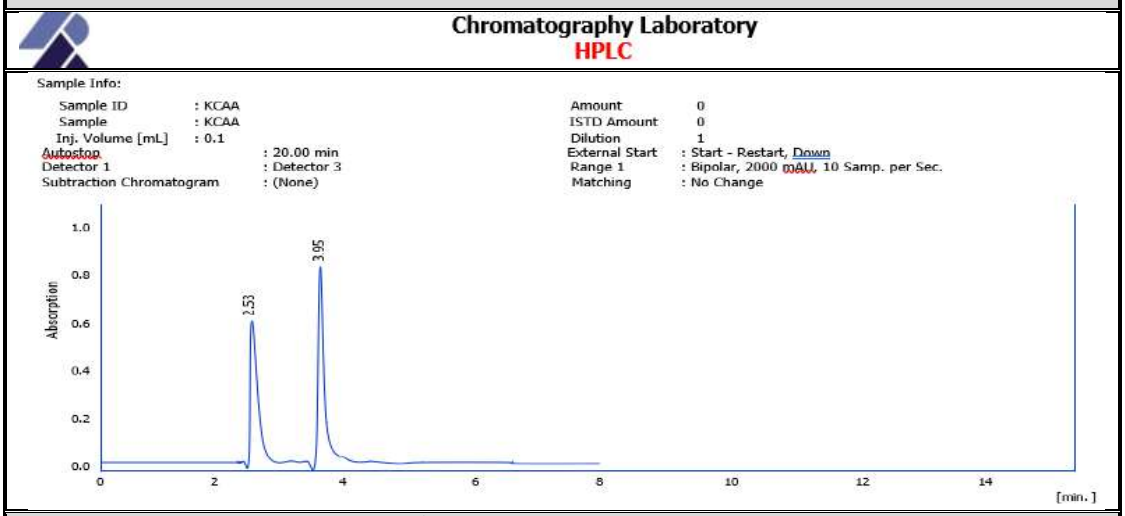
بينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 24 وشكل 13 وشكل 14) بان العزلة الفطرية *A.alternate* ذات الرمز (*KCAA*) والمعزولة من ثمار الرمان المصابة والمجموعة من قضاء المركز لمحافظة كربلاء , أظهرت مقدرة عالية على أنتاج السم الفطري *Alternariol* في ثمار الرمان المخزونة (فترة 21 يوم) وبمستويات مرتفعة بلغت 93.7 ميكروغرام/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة (ثمار غير معاملة بالممرض) بلغت 0.00%

بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة الكحولي أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وخفض نسبة وشدة الإصابة . وهذا ما سبب باختزال جزئي لمستويات انتاج السم *Alternariol* , فبلغت النسبة المئوية لاختزال السم الى 29.66% . اذ تمكنت العزلة الفطرية *A.alternate* من مقاومة تأثير المستخلص النباتي وإنتاج السم الفطري *Alternariol* بمعدل 65.9 ميكروغرام / كغم

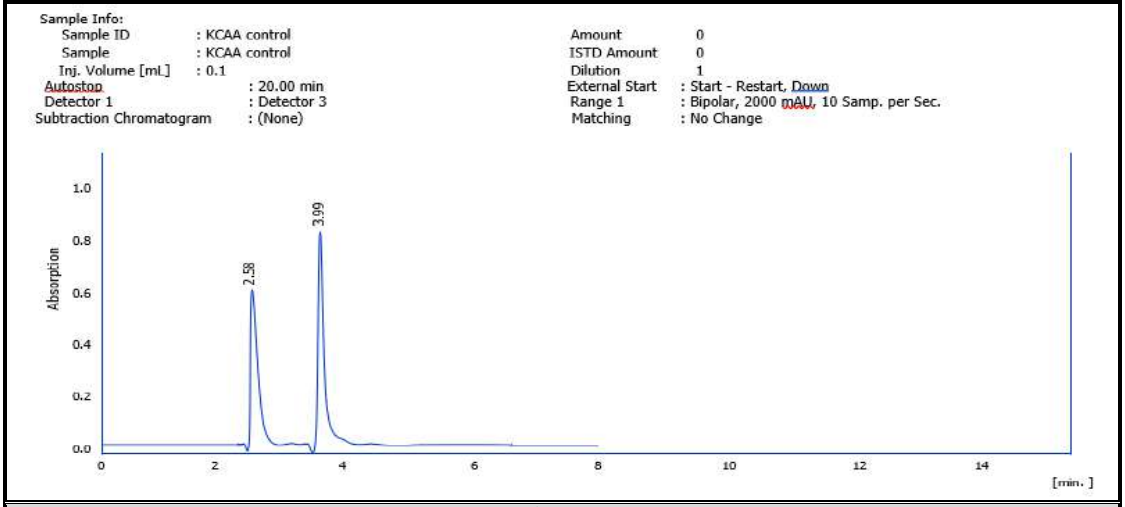


الشكل (13) تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.alternate* في انتاج سم *Alternariol*

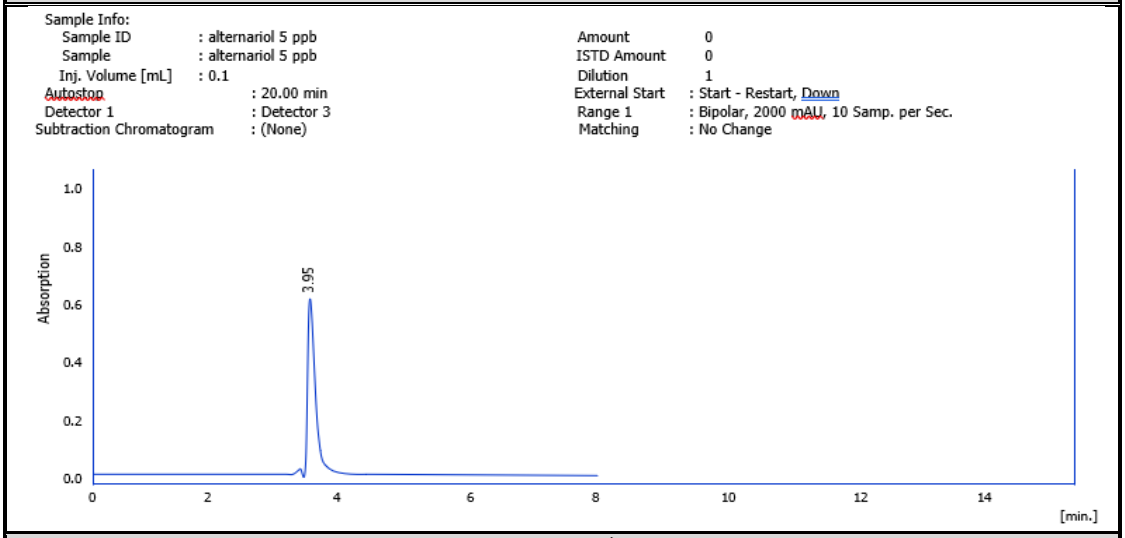
وتأتي هذه النتائج متفقة مع ما اشار اليه Solhaug واخرون(2016) من ان اغلب عزلات الفطر*A.alternate* لها القدر ة على انتاج السم الفطري AOH وتحت مختلف الظروف وعلى اغلب عوائله النباتية وهذا ما تم ملاحظته فعلا حيث لوحظ ان جميع عزلات الفطر *A.alternata* كان لها القدرة على انتاج سم الالترناريول AOH (Barkai، 2008).اتفقت هذه النتائج مع الدراسات السابقة والتي تشير سموم *Alternariol* من السموم الرئيسة والاكثر انتشاراً في ثمار الرمان ذات تأثيرات مهمة وسلبية محتملة على الانسان عند تناول الفاكهة او الغذاء الملوث المنتج الرئيسي لها هو *Alternaria alternate*. (Bacha واخرون، 2023) اكدت بينما اكدت دراسة عن إمكانات مستخلص الكزبرة الأساسي كعامل مضاد للفطريات *Alternaria alternate* وتخليق سم *Alternariol* . (Sumalan واخرون، 2019)



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري *Alternariol* المنتج من العزلة *A.alternate* في ثمار الرمان



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري *Alternariol* المنتج من العزلة *A.alternate* ودور مستخلص الكزبرة في اختزاله



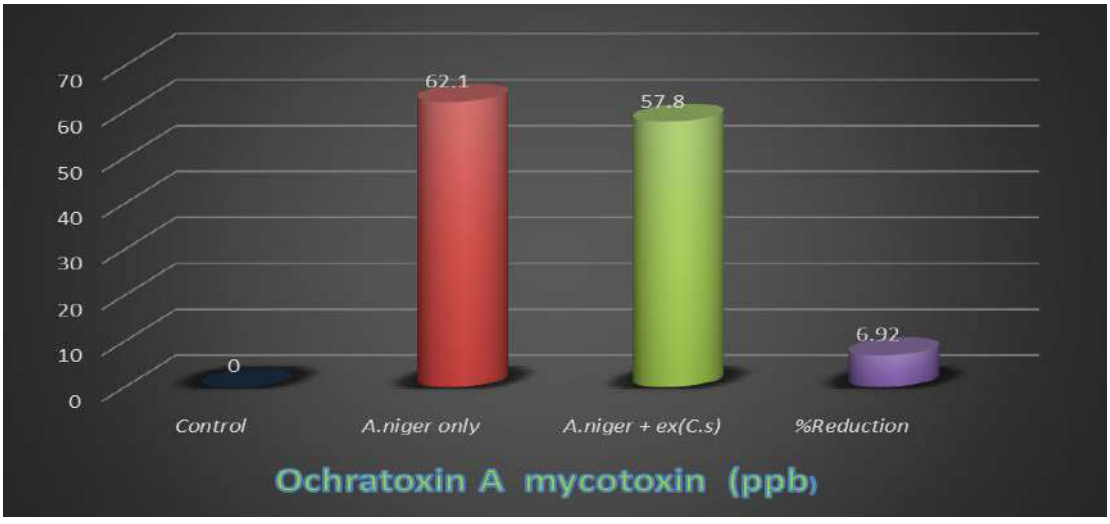
تقدير المادة القياسية للسم الفطري *Alternariol*

الشكل (14): الكشف عن قابلية الفطر *A.alternate* على انتاج السم الفطري *Alternariol*

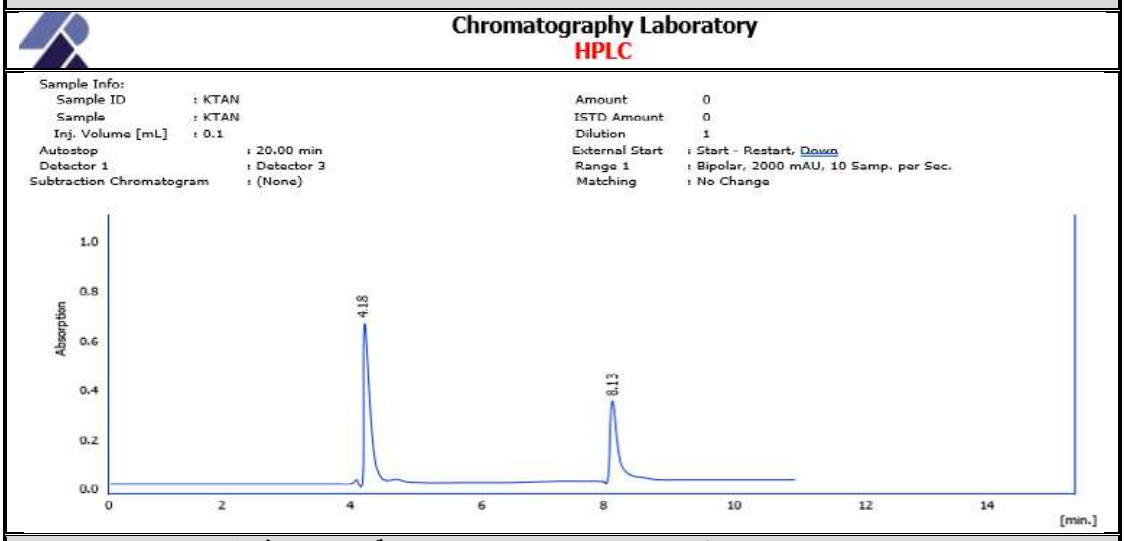
2-7-4: الكشف عن قابلية الفطر *A.niger* على انتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن

بينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 24 وشكل 15 وشكل 16) بان العزلة الفطرية *A.niger* ذات الرمز (*KTAN*) والمعزولة من ثمار الرمان المصابة والمجموعة من قضاء الهندية لمحافظة كربلاء , أظهرت مقدرة عالية على أنتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان المخزونة (فترة 21 يوم) وبمستويات مرتفعة بلغت 62.10 ميكروغرام/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة (ثمار غير معاملة بالممرض) بلغت 0.00%

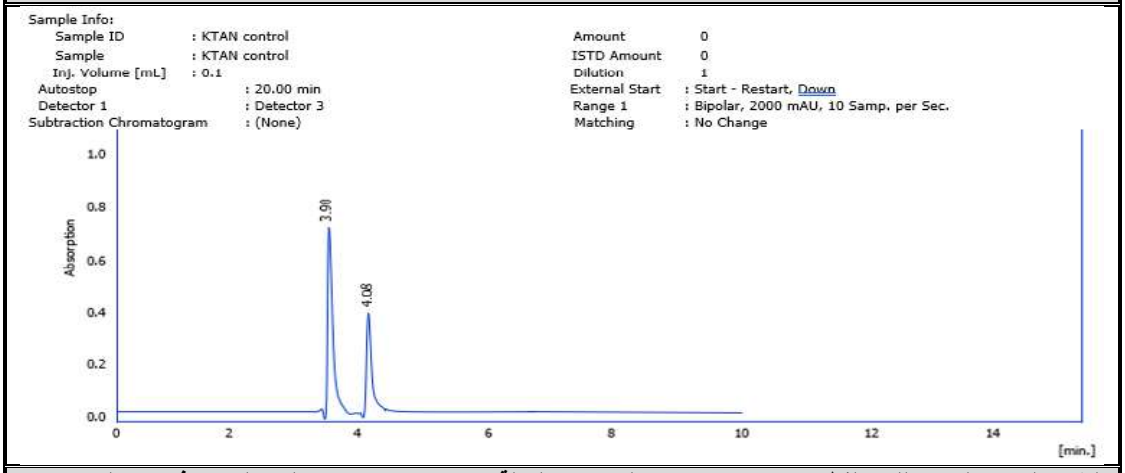
بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وخفض نسبة وشدة الإصابة . وهذا ما سبب باختزال طفيف لمستويات انتاج السم *Ochratoxin A* , فبلغت النسبة المئوية للاختزال الى 6.92% . اذ تمكنت العزلة الفطرية *A.niger* من مقاومة تأثير المستخلص النباتي وإنتاج السم الفطري *Ochratoxin A* بمعدل 57.8 ميكروغرام / كغم . وقد يُعزى تفاوت العزلات في إنتاج السموم الفطرية على القدرة الوراثية للعزلة الفطرية , والظروف التفضيلية الملائمة لِكُل عُزلة لإنتاج توكسن معين وبشكل أساسي الرطوبة ودرجة الحرارة أثناء التخزين (Ałtynو Twaruzek،2020).



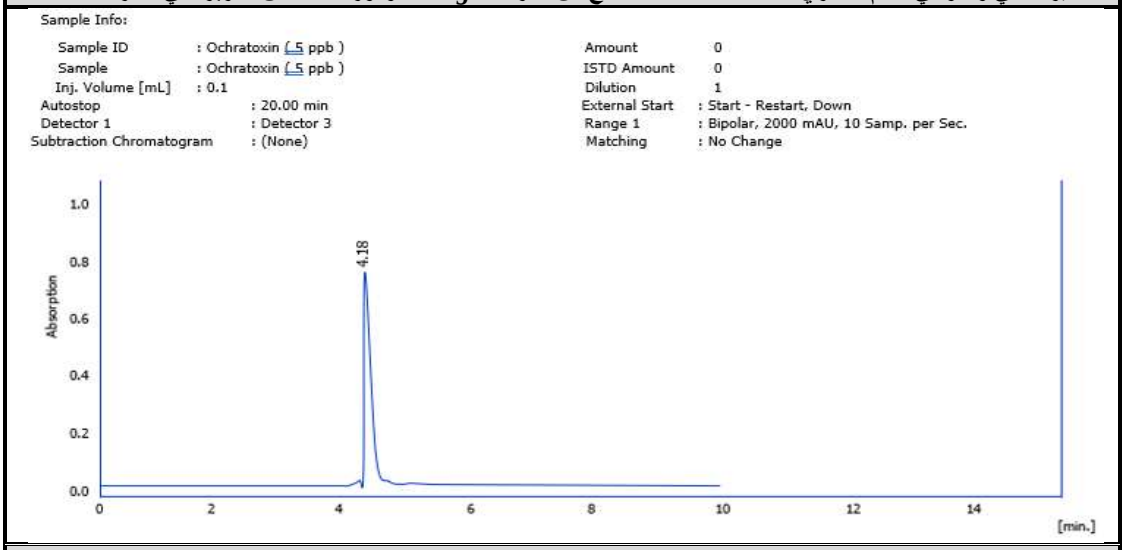
الشكل (15) تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.niger* في انتاج سم *Ochratoxin A*



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Ochratoxin A المنتج من العزلة ***A.niger*** في ثمار الرمان



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Ochratoxin A المنتج من العزلة ***A.niger*** ودور مستخلص الكزبرة في اختزاله



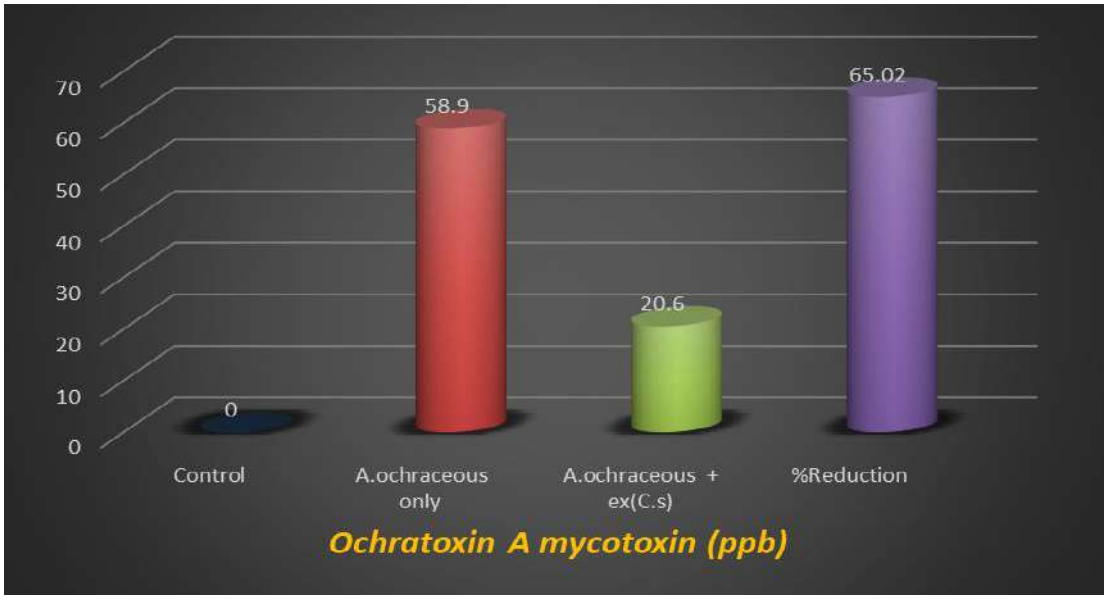
تقدير المادة القياسية للسم الفطري Ochratoxin A

الشكل (16) الكشف عن قابلية الفطر *A.niger* على انتاج السم الفطري Ochratoxin A

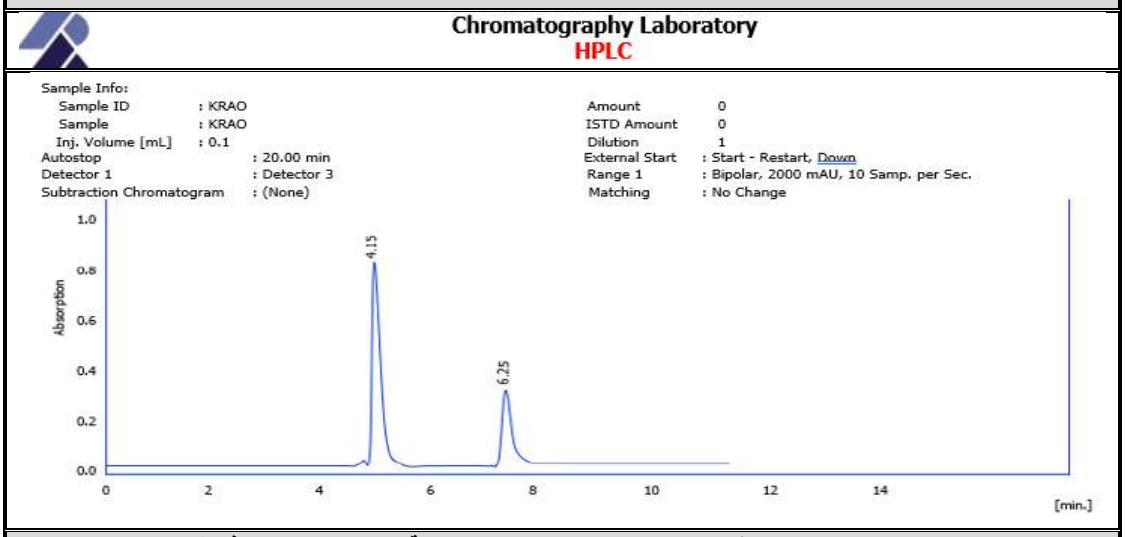
3-7-4: الكشف عن قابلية الفطر *A.ochrecaus* على انتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن

بينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 24 وشكل 17 وشكل 18) بان العزلة الفطرية *A.ochrecaus* ذات الرمز (*KRAO*) والمعزولة من ثمار الرمان المصابة والمجموعة من قضاء الحر لمحافظة كربلاء , أظهرت مقدرة عالية على أنتاج السم الفطري *Ochratoxin A* في ثمار الرمان المخزونة (فترة 21 يوم) وبمستويات مرتفعة بلغت 58.9 ميكروغرام/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة (ثمار غير معاملة بالممرض) بلغت 0.00%

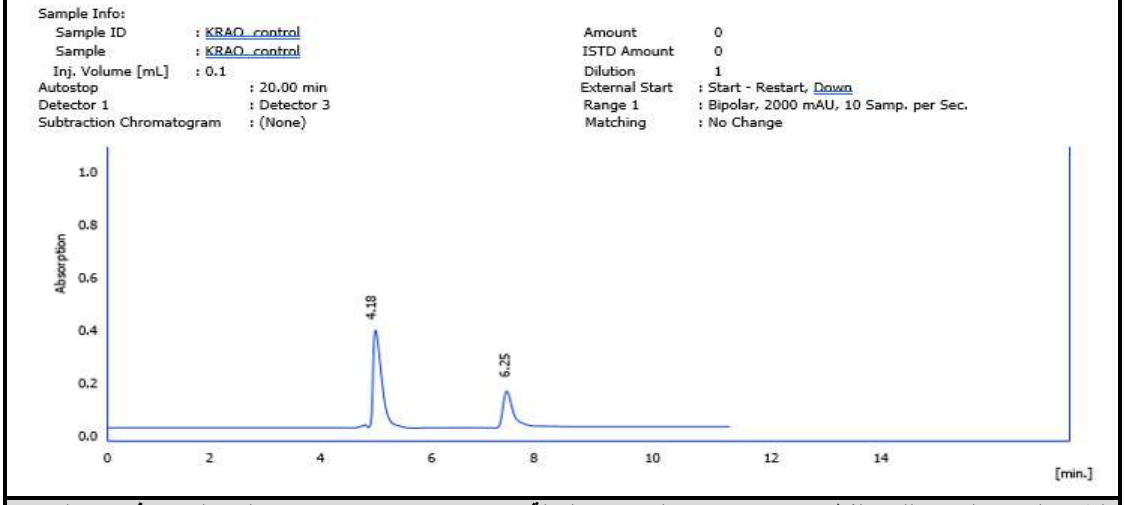
بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة الكحولي أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وخفض نسبة وشدة الإصابة . وهذا ما سبب باختزال كبير لمستويات انتاج السم *Ochratoxin A* , فبلغت النسبة المئوية لاختزال السم الى 65.02% . اذ تمكنت العزلة الفطرية *A.ochrecaus* من مقاومة تأثير المستخلص النباتي وإنتاج السم الفطري *Ochratoxin A* بمعدل 20.6 ميكروغرام / كغم



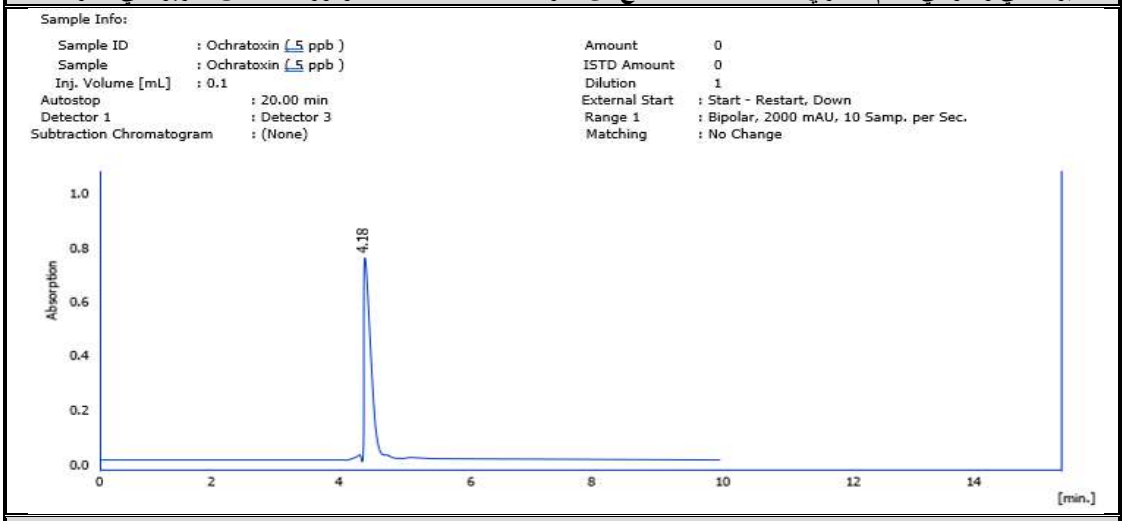
الشكل (17) تاثير مستخلص الكزبرة على الفطر *A.ochrecaus* في انتاج سم *OchratoxinA*



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Ochratoxin A المنتج من العزلة ***A.ochraceous*** في ثمار الرمان



لتقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Ochratoxinالمنتج من العزلة ***A.ochraceous*** ودور مستخلص الكزبرة في اختزاله



تقدير المادة القياسية للسم الفطري Ochratoxin A

الشكل (18) الكشف عن قابلية الفطر *A.ochraceous* على انتاج السم الفطري Ochratoxin A

تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات السابقة والتي تشير بان المنتج الرئيسي لسم الاوكراتوكسين هو انواع الفطر *Aspergillus spp*. اذ تتميز بسميتها للكلية ومسرطنة تنتجها أنواع تحت ظروب بيئية مختلفة (Heperkanواخرون، 2023) وكذلك اثبت إنتاج OchratoxinA بشكل أساسي بواسطة *A.ochrecaus, A.niger* . (Reddy واخرون، 2010 وNavale واخرون،2021). فقد ثبت Basilico واخرون (1999) أن الزيوت العطرية الكزبرة (*Coriandrum sativum*) فعالة ضد الفطريات المنتجة للأوكراتوكسين،وتؤدي الى اختزال السم بشكل كبير.

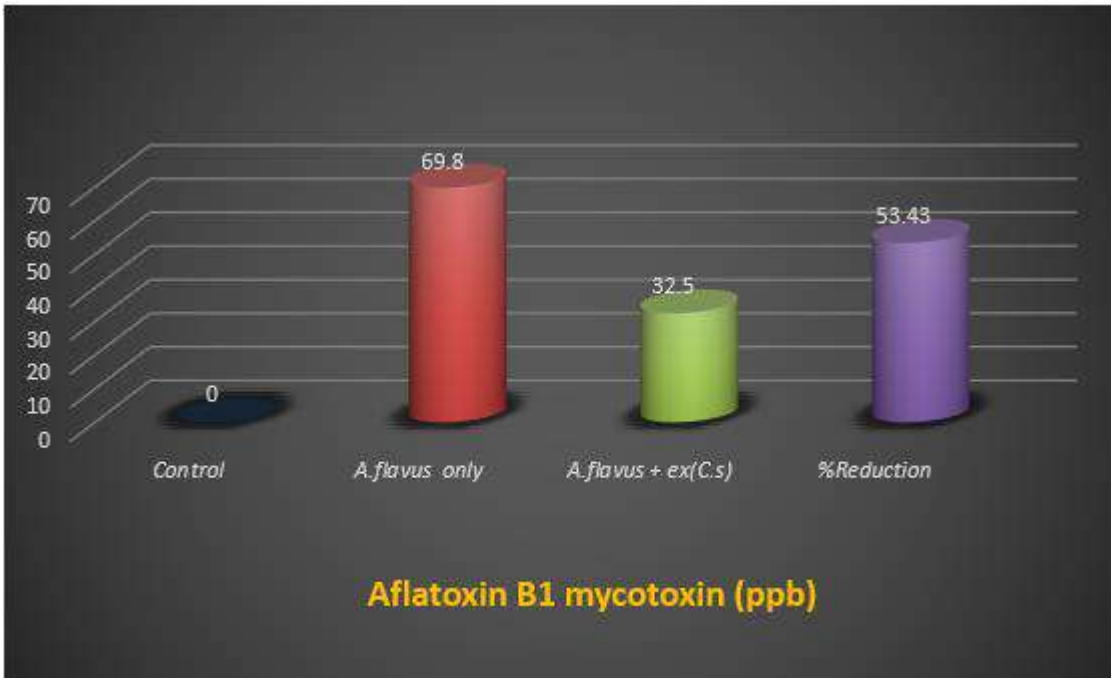
4-7-4: الكشف عن قابلية الفطر *A.flavus* على انتاج السم الفطري *Aflatoxin* B1 في ثمار الرمان ودور مستخلص الكزبرة الكحولي في السيطرة على انتاجه في المخزن

بينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 24 وشكل 19 وشكل 20) بان العزلة الفطرية *A.flavus* ذات الرمز (*KHAF*) والمعزولة من ثمار الرمان المصابة والمجموعة من قضاء الحسينية لمحافظة كربلاء , أظهرت مقدرة عالية على أنتاج السم الفطري *AflatoxinB1* في ثمار الرمان المخزونة (فترة 21 يوم) وبمستويات مرتفعة بلغت 69.8 ميكروغرام/كغم مقارنة بمعاملة السيطرة (ثمار غير معاملة بالممرض) بلغت 0.00%.

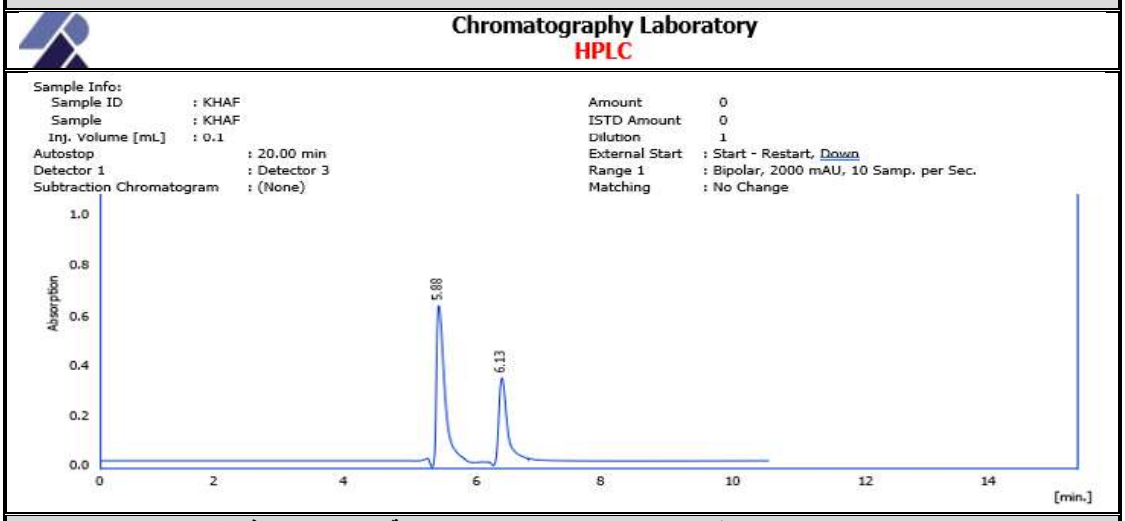
بينما أظهرت النتائج بان معاملة ثمار الرمان المخزونة بمستخلص الكزبرة الكحولي أدى الى تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وخفض نسبة وشدة الإصابة . وهذا ما سبب باختزال اكثر من نصف مستويات انتاج السم *AflatoxinB1* فبلغت النسبة المئوية لاختزال السم الى 53.43% . اذ تمكنت العزلة الفطرية *A.flavus* من مقاومة تأثير المستخلص النباتي وإنتاج السم الفطري *AflatoxinB1* بمعدل 32.5 ميكروغرام / كغم .

تتفق هذه مع الدراسات السابقة التي تشير بأن المنتج الرئيسي لسم (AFB1) *Aspergillus flavus* (Medina واخرون،2014)ويعتبر أحد أهم المركبات الثانوية بسبب خصائصه المسببة للسرطان المثبتة لدى الإنسان ووجوده المتكرر في العديد من

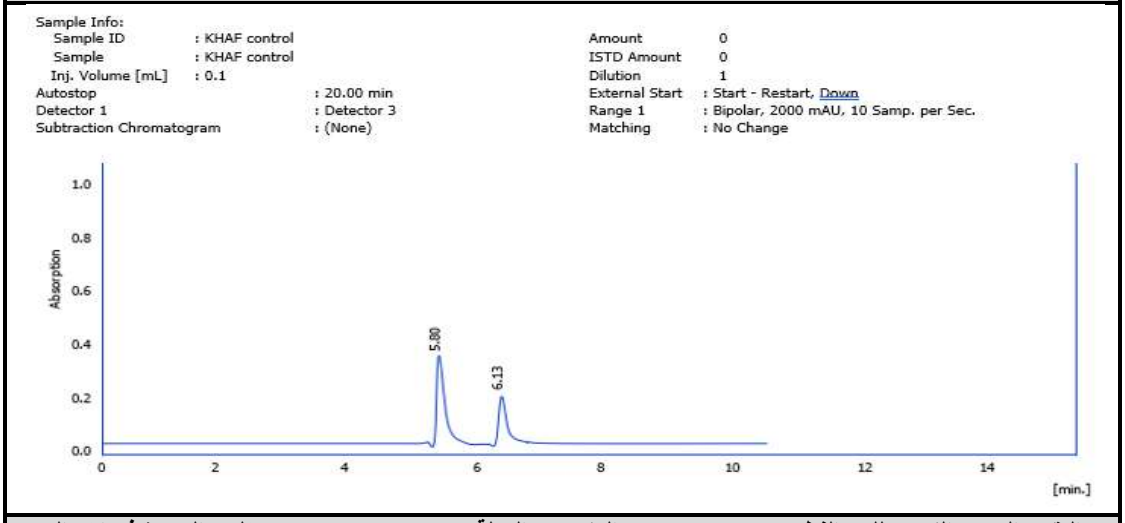
المـواد الغذائيــة فــي جميــع أنحــاء العــالم و(Caceresواخــرون،2020) إذ اكـدت الدراســة التـــي قـــام بهـــا Lasram واخـــرون (2019) ان مســـتخلص بـــذور الكزبـــرة (*Coriandrum sativum*) أظهـرت قـدرة كبيـرة علـى تقليـل امتـداد الفطريـات وتخليـق الأفلاتوكسين B1 لسلالة *A. flavus* المختبرة.



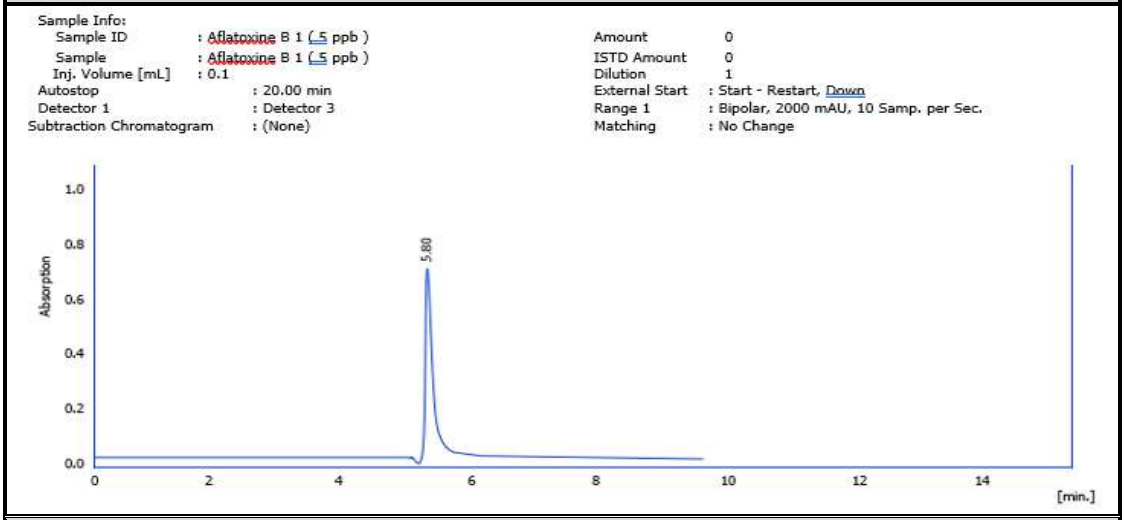
الشكل (19): تاثير مستخلص الكزبرة في ***A.flavus*** **على انتاج السم Aflatoxin B1**



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Aflatoxin B1 المنتج من العزلة *A.flavus* في ثمار الرمان



التقدير الكمي والنوعي للسم الفطري Aflatoxin B1 المنتج من العزلة *A.flavus* ودور مستخلص الكزبرة في اختزاله



تقدير المادة القياسية للسم الفطري Aflatoxin B1

الشكل (20): الكشف عن قابلية الفطر *A.flavus* على انتاج السم الفطري Aflatoxin B1

الجدول (24) قابلية الفطريات الممرضة على انتاج السموم الفطرية في ثمار الرمان ودور عامل المكافحة (مستخلص الكزبرة) في السيطرة على انتاجها في المخزن

المعاملة	الكشف الكمي والنوعي لتلوث ثمار الرمان بالسموم الفطرية المصابة بالفطريات الممرضة				
	الفطريات	*A.alternate*	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*
	رمز العزلة	*KCAA*	*KTAN*	*KHAF*	*KRAO*
	نوع السم الفطري	*Alternariol* (ppb)	*OchratoxinA* (ppb)	*AflatoxinB1* (ppb)	*OchratoxinA* (ppb)
Control	بدون معاملة	0.00	0.00	0.00	0.00
(Path)only	الممرض فقط	93.7	62.1	69.8	58.9
(Path)+(ex.*C.s*)	مستخلص الكزبرة	65.9	57.8	32.5	20.6
النسبة المئوية للاختزال		29.66	6.92	53.43	65.02

***كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات**

4-8:أختبار تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة العزلات الفطرية الممرضة في الحقل

تبين من نتائج اجراء هذه التجربة التي نفذت لتقييم فعالية المبيد (Palizin) , و مستخلصي نبات الميرامية نبات الكزبرة و الخميرة *S.cervisiae*. في تثبيط مهاجمة الفطريات الممرضة في احداث الإصابة بمرض تعفن ثمار الرمان في الحقل على ازهار الزمان. ان جميع هذه العوامل خفضت من النسبة المئوية لاحداث الإصابة وكذلك تثبيط من شدة الإصابة مقارنة بمعاملة السيطرة (معاملة الممرض فقط).

اذ بينت نتائج حساب النسبة المئوية لحدوث المرض بعد 75 يوم من تنفيذ التجربة بان المبيد ذو الأصل النباتي Palizin قد تفوق معنوياً بخفض نسبة الإصابة الى

16.66% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 84.44% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من احداث الإصابة بلغ 80.27% (جدول 25) تلتها المعاملة بمستخلص الكزبرة بخفض النسبة المئوية لحدوث المرض بمعدل 45% وبمعدل تثبيط بلغ 46.70% . في حين جاءت معاملتي مستخلص نبات الميرمية والعامل الحيوي (خميرة *S.cervisiae*) أخيرا , بمعدل خفض لنسبة احداث الإصابة بلغت 53.33 % و65% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ 36.84% و23.02% مقارنة بمعاملة السيطرة.

اما فيما يتعلق بكفاءة او مقدرة العزلات الفطرية المختبرة على مقاومة عوامل المكافحة المستخدمة واحداث المرض فقد أظهرت العزلة *A.alternate* اعلى معدل للمقاومة ضد هذه العوامل وسجلت اعلى نسبة مئوية لاحداث الإصابة بلغت 68% , يليه الفطر *A.niger* بمعدل نسبة إصابة بلغت 61.33% بينما سجل الفطرين *A.flavus* و *A.ochraceous* معدل نسبة إصابة بلغت 52.00% و16.66% على التوالي.

الجدول (25) تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في الحقل

المعاملة	النسبة المئوية لحدوث الإصابة بالفطريات الممرضة				معدل المعاملة	% للتثبيط
	A.alternate	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*		
Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0	-----
(Path)only	93.33	86.66	73.33	46,66	84.44	0.00
(Path)+(*S.cervi.*)	80.00	80.00	73.33	26.66	65.00	23.02
(Path)+(*Palizin*)	26.66	20.00	13.33	6.66	16.66	80.27
(Path)+(ex.*S.o*)	73.33	66.66	53.33	20.00	53.33	36.84
(Path)+(ex.*C.s*)	66.66	53.33	46.66	13.33	45.00	46.70
معدل % لحدوث اصابة الفطر	68.00	61.33	52.00	16.66		
L.S.D 0.05	المعاملة		الفطر		التداخل	
	2.9896		2.7732		5.7628	

*كل رقم في الجدول يمثل معدل ثلاث مكررات.

كذلك اظهرت نتائج حساب النسبة المئوية لشدة الاصابة بعد 75 يوم من تنفيذ التجربة ان المبيد ذو الأصل النباتي Palizin قد تفوق وبفارق معنوي كبير بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة الى 6.30% مقارنة بمعاملة الممرض فقط التي بلغت 32.41% وبمعدل نسبة تثبيط الفطريات من شدة احداث الإصابة بلغ 80.56% (جدول 26 والشكل 21, 22, 23, 24) , تلتها المعاملة بمستخلص نبات الكزبرة بخفض النسبة المئوية لشدة حدوث الاصابة بمعدل 7.57 % وبمعدل تثبيط بلغ 76.64% . في حين جاءت معاملتي مستخلص الميرمية والعامل الحيوي (خميرة *S.cervisiae*) أخيرا , بمعدل خفض لنسبة شدة احداث الإصابة بلغت 8.98 % و 10.31% على التوالي وبمعدل تثبيط بلغ **72.29**% و **68.18** % مقارنة بمعاملة السيطرة .

اما بخصوص بكفاءة او مقدرة العزلات الفطرية المختبرة على مقاومة عوامل المكافحة المستخدمة واحداث شدة الإصابة فقد أظهرت العزلة *A.alternate* اعلى معدل للمقاومة ضد هذه العوامل وسجلت اعلى معدل للنسبة المئوية لشدة الإصابة بلغت 16.02% , يليه الفطر *A.niger* بمعدل شدة إصابة بلغت 15.50 % بينما سجل الفطر *A.flavus* 11.57% والفطر *A.ochraceous* 8.40% معدل لنسبة شدة الإصابة.

الجدول(26) تأثير المستخلصات النباتية الكحولية لنباتي الميرمية والكزبرة والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في النسبة المئوية لشدة الإصابة بالعزلات الفطرية الممرضة في المخزن

المعاملة	النسبة المئوية لشدة الإصابة بالفطريات الممرضة				معدل المعاملة	% للتثبيط
	A.alternate	*A.niger*	*A.flavus*	*A.ochraceous*		
Control	%0.0	%0.0	%0.0	%0.0	0	-----
(Path)only	42.28	40.24	26.67	20.43	32.41%	%0.00
(Path)+(*S.cervi.*)	13.66	10.73	9.80	7.06	10.31%	%68.18
(Path)+(*Palizin*)	8.46	7.86	5.73	3.13	6.30%	%80.56
(Path)+(ex.*S.o*)	11.26	10.13	8.13	6.40	8.98%	%72.29
(Path)+(ex.*C.s*)	9.20	8.53	7.53	5.00	7.57%	%76.64
معدل % لشدة اصابة الفطر	16.02%	15.50%	11.57%	8.40%		
L.S.D 0.05	المعاملة		الفطر		التداخل	
	1.1132		0.8789		1.9921	

هناك العديد من الدراسات تتفق على ان المستخلصات النباتية تحد من نمو العديد من الفطريات وبالتالي تقلل من نسب الاصابة والتلوث (Cowan1999,) ان المستخلص الكحولي لبذور الكزبره والميرمية يعتبران مصدر محتمل للمكونات النشطة بيولوجيًا وتطبيقاته كعامل مضاد للفطريات (Abuaziza ,وAhamdi, 2023) في حين يتأمل ان تكون المبيدات ذات الأصل النباتي (Palizin) كبدائل للمواد الكيميائية فهي تكون الاقل سمية للإنسان وحيواناته وذات تأثير قاتل وطارد للآفات المخزنية (عمران ، 2021) بينما يعد عدد غير قليل من الخمائر في مجال السيطرة او المكافحة الحيوية (Control Biological) ضد الفطريات الممرضة للنبات وكذلك تستخدم في عمليات حفظ الاغذية والاعلاف (Palpacelli ,واخرون 1991,) فضلاً عن استخدامها في المجال الطبي والعلاجي فقد استخدمت كمواد مضادة للفطريات ,كما اشار الى قدرة هذه الخمائر على تثبيط نمو الفطريات المسببة للأمراض النباتية وتحلل الفواكه والخضروات (Graeme واخرون,1995)

(A.alternate)+ (ex.S.o)

(A.alternate)+ (ex.C.s)

Control

(*A.alternate*) Only

(*A.alternate*)+(*S.cervi.*)

(*A.alternate*) +(*Palizin*)

الشكل(21): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.alternate* في الحقل

(A.niger)+ (ex.S.o)

(A.niger)+ (ex.C.s)

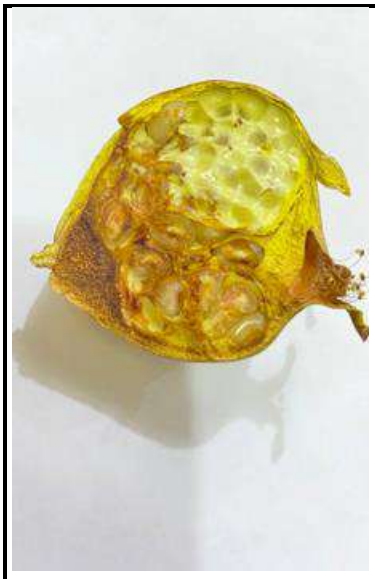
Control

(*A.niger*) Only

(*A.niger*)+ (*S.cervi.*)

(*A.niger*) +(*Palizin*)

الشكل(22): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.niger* في الحقل



(*A.flavus*) + (*ex.S.o*)

(*A.flavus*) + (*ex.C.s*)

Control

(*A.flavus*) Only

(*A.flavus*)+ (*S.cervi*.)

(*A.flavus*) +(*Palizin*)

الشكل(23): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.flavus* في الحقل

(*A.ochraceus*) + (*ex.S.o)*

(*A.ochraceus*) + (*ex.C.s)*

Control

(*A.ochraceus*) Only

(*A.ochraceus*)+ (*S.cervi.*)

(*A.ochraceus*)+ (*Palizin*)

الشكل(24): نماذج من تأثير مستخلصي الكزبرة والميرمية والمبيد (*Palizin*) والخميرة *S.cervisiae* في حماية ثمار الرمان من مهاجمة عزلة الفطر *A.ochraceus* في الحقل

5: الاستنتاجات والتوصيات

5-1: الاستنتاجات :

1. اهم المسببات المرضية المرافقة لمرض تعفن ثمار الرمان كان *Aspergillus spp* و*A.niger* و*A. flavus* و *A.ochrecaus* و*Alternaria sp* و *Penicillium spp* و *Rhizopus sp* و*Cladosporium sp*.
2. اكثر الفطريات ظهورا وترددا المعزولة من حالات تعفن ثمار الرمان هو الفطر *Aspergillus spp* يليه الفطر*Penicillium spp* ثم الفطر *Alternaria sp* .
3. اغلب الفطريات المعزولة من ثمار الرمان المصابة تميزت بخطورتها السمية لانها تمتلك المقدرة على انتاج طيف واسع من السموم الفطرية التي من أهمها سموم (Afla B1) Aflatoxin B1 و Ochratoxin A (OTA) وسموم Alternariol (AOH)
4. ان جميع المستخلصات النباتية الكحولية (مستخلص الميرمية والكزبرة والدارسين والزعتر والسمسم والقرنفل) عملت على تثبيط نمو العزلات الفطرية بنسب مختلفة , حيث أظهر في بعض المستخلصات فعالية تثبيطية عالية وصلت النسبة المئوية للتثبيط إلى 100 %.
5. تفوق مستخلص الكزبرة بتثبط المسببات المرضية من مهاجمة ثمار الرمان وادى الى خفض كبير بالنسبة المئوية لشدة الإصابة في التجربة الخزنية. بينما تصدرت معاملة المبيد ذو الأصل النباتي Palizin بخفض النسبة المئوية لشدة الإصابة لجميع الفطريات في التجربة الحقلية.
6. تمكن مستخلص الكزبرة الكحولي من تثبيط قدرة الممرض من مهاجمة ثمار الرمان وسبب باختزال جزئي لمستويات انتاج السموم الفطرية.

2-5: التوصيات

1. تخزين الثمار بشكل جيد وتجنب المصابة منها ،وتقليل فترات التخزين لتلافي الاصابة بالفطريات وانتاجها السموم الفطرية.
2. استعمال مستخلص الكزبرة لتثبيط نمو المسببات المرضية ومنعها من مهاجمة ثمار الفاكهة وإنتاج السموم الفطرية في المخزن.
3. استخدام بعض الإجراءات الوقائية قبل حصاد الرمان للحيلولة دون اصابتها بمسببات تعفن الثمار والانتقال به الى المخزن.
4. اجراء دراسات للكشف عن السموم الفطرية الاخرى والتي لم تشملها هذه الدراسة لارتباطها بصحة الانسان والحيوان.
5. دراسة بعض المركبات الامنة بيئياً في خفض التلوث الفطري في ثمار الرمان . والسيطرة على انتاج السموم الفطرية.
6. تفعيل الدور الرقابي والحجر الزراعي في متابعة استيراد المنتجات الزراعية لمنع دخول السلالات الفطرية شديدة الامراضية والمنتجة للسموم الفطرية من ضمن الخضار والفاكهة المستوردة.

1-6: المصادر العربية

ابــو النجــا، محمــد علــي عــواد، محمــد علــي محمــد ســكر (2022). التحليــل المــالي والاقتصــادي لاســتخدام الطاقــة الشمســية فــي الإنتــاج الزراعــي (دراســة حالــة: الرمــان بواحة المغرة). المجلة المصرية للاقتصاد الزراعي، مجلد 32 العدد الأول، 2022.

زعــيط،أحلام القمــودي، ســعاد محمــد أبوالغيــث (2021). الفعاليــة التضــادية لــبعض المستخلصــات النباتيــة ضــد فطــر *Aspergillus niger* المعــزول *Allium cepa* L. من نبات البصل .*مجلة البيان العلمية*.531-540 ,(9) ,

الجهــاز المركــزي للإحصــاء (2021). تقريــر انتــاج أشــجار الفواكــه الصــيفية لعــام 2020. مديرية الإحصاء الزراعي. وزارة الزراعة. جمهورية العراق.

الحــداد،انفال مكــي صــاحب (2021).التشــخيص المظهــري والجزيئــي لمســبب مــرض التبقــع الالترنــاري علــى الزيتــون وتعزيــز المقاومــة باســتخدام بعــض العوامــل الحيويــة والاســمدة العضــوية ، رســالة ماجســتير ،جامعــة الكوفــة كليــة الزراعــة ،قســم وقايــة النبات،العراق

الــدوري، احســان فاضــل صــالح، جاســم محمــد علــوان (2012). اســتجابة أشــجار الرمــان صــنف ســليمي (*Punica granatum* L.) للتســميد العضــوي والــ NPK والــرش الورقي بالبورون وحامض الاسكوربيك. كلية الزراعة والغابات - جامعة الموصل.

الشــيخلي، مــروة عمــاد الــدين وناهــدة مهــدي صــالح (2015). فعاليــة خميــرة الخبــز وحــامض السالســيلك ضــد الفطــر *Penicillium digitum* المســبب لمــرض العفــن الاخضر على ثمار البرتقال. مجلة العلوم الزراعية العراقية - 46(3): 393 402

دخيــل، فيــد عبــاس (2021). التكامــل بــين العوامــل الأحيائيــة والمبيــدات الكيميائيــة فــي السيطرة علــى مسببات امــراض جــذور نباتــات الزينــة فــي مشــاتل محــافظتي كــربلاء وبابــل. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة كربلاء.العراق

صبا كاظم، صباح علوان وحسين الكلابي (2015). تقويم كفاءة بعض عوامل المقاومة الحيوية والفيزيائية ومستخلص نبات الالوفيرا Aloe vera في مقاومة الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض تعفن البذور وموت بادرات الحنطة في الترب المزيجية والرملية.(2)*7* ,*Kufa Journal for Agricultural Sciences* .

عمران، ايمان موسى (2021). دراسة بعض الجوانب التصنيفية والحياتية للحشرتين *Oryzaephilus surinamensis* و *Rhyzopertha dominica* مع الاشارة الى مكافحتهما . اطروحة. دكتوراه كلية العلوم .جامعة البصرة. 303 صفحة

العواضي، عمرو جابر نعمان (2018). دليل افات وامراض الرمان، الإدارة الزراعية، مؤسسة الحظا للتجارة والوكالات، الإدارة الزراعية - القسم الفني، الجمهورية اليمنية.

محمد،حلا علي (2019). تأثير مستخلصات نبات الكزبرة(*Coriandrum sativum*) في نمو بعض الفطور الممرضة للنبات ، *Fusarium oxysporum* *Aspergillus* sp .*Penicillium* sp مجلة وقاية النبات العربية،مجلد 37،عدد 4، 2019.

المفلحي،محمود علي عبدالله،محمد عبدالرحيم احمد الزمير (2016).حصر وتقدير نسبة الاصابة بمرض ذبول وموت اشجار الرمان وعزل المسببات المرضية المصاحبة للمرض بمحافظة صعده _اليمن ،قسم وقاية النبات ،كلية الزراعة،جامعة صنعاء،اليمن.

6-2 : References

Abuaziza, F. B., and Ahamdi, I. M.(2023) Evaluation of the Activity of Alcoholic Extract from The Leaves of *Salvia officinalis* and Mentha longifolia against Some Fungi Isolated from Soil.

Abdel-Sater, M., Abdel-Hafez, S., Hussein, N., and Al-amery, E. (2017). Fungi associated with maize and sorghum grains and their potential for amylase and *aflatoxins* production. *Egyptian Journal of Botany*, *57*(1), 119-137.

Al-Hamiri, Y.N.(2016). Integrated control of fungal pathogens causing agent of crown and root rot disease on potato in middle of iraq. Journal of Kerbala for Agricultural Sciences 3 (4): 104-122

Aljallad, R.(2022). First report of *Alternaria alternata* Keissler causing leaf spot on Rhus coriarial in Syria.Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (44) No. (3)

Alshehri, B., and Palanisamy, M. (2020). Evaluation of molecular identification of *Aspergillus* species causing fungal keratitis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(2), 751-756.

Al-Muammar, M. N., and Khan, F. (2012). Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). Nutrition, 28(6), 595-604.

Aloi, F., Riolo, M., Sanzani, S. M., Mincuzzi, A., Ippolito, A., Siciliano, I., ... and Cacciola, S. O. (2021). Characterization of

Alternaria species associated with heart rot of pomegranate fruit. Journal of Fungi, 7(3), 172.

Alshannaq, A., and Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. International journal of environmental research and public health, 14(6), 632.

Ałtyn, I., and Twarużek, M. (2020). Mycotoxin contamination concerns of herbs and medicinal plants. *Toxins*, *12*(3), 182.

Amaike, S., and Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. Annual review of phytopathology, 49(1), 107-133.

Ammar, M. I., and El-Naggar, M.A.(2014). Screening and characterization of fungi and their associated mycotoxins in some fruit crops. International Journal of Advanced Research, 2(4), 1216-1227.

Andersen, B., Smedsgaard, J., Jørring, I., Skouboe, P., and Pedersen, L. H. (2006). Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. International Journal of Food Microbiology, 111(2), 105-111.

Arce-Lopez, B., Lizarraga, E., Vettorazzi, A., and González-Peñas, E. (2020). Human Biomonitoring of Mycotoxins in Blood, Plasma and Serum in Recent Years: A Review. Toxins, 12(3), 147.

Arendse, E. (2014). Determining optimum storage conditions for pomegranate fruit (cv. Wonderful) (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University).

Artés, F., Tudela, J. A., and Villaescusa,R. (2000). Thermal postharvest treatments for improving pomegranate quality and shelf life. Postharvest Biology and Technology, 18(3), 245-251.

Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases-A review. Ecological Complexity, 49, 100978,12.

Al-Niaame, A. E. and Aziz, R. A.(2013). Astudy of Histopathological Effects of Methanolic Buds of Flowers Extract of Lavandula officinalis L. on Selected Organs of Male Mice. iraq journal of market research and consumer protection, 5(2), 184-198

Bacha, S. A. S., Li, Y., Nie, J., Xu, G., Han, L., and Farooq, S. (2023). Comprehensive review on patulin and *Alternaria* toxins in fruit and derived products. Frontiers in Plant Science, 14, 1139757.

Barkai-Golan, R. (2008). *Aspergillus mycotoxins*. In Mycotoxins in fruits and vegetables (pp. 115-151). Academic Press.

Basilico, M.Z. and J.C. Basilico(1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and *ochratoxin* a production. Lett. Applied Microbiol., 29: 238-241

Bellaouchi, R., Abouloifa, H., Rokni, Y., Hasnaoui, A., Ghabbour, N., Hakkou, A., and Asehraou, A. (2021). Characterization and

optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 19(1), 50.

Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S., P. Oswald, I., El Khoury, A., ... and Bailly, J. D. (2020). *Aflatoxin* biosynthesis and genetic regulation: A review. *Toxins*, *12*(3), 150.

Cara, M., Toska, M., Frasheri, D., Baroncelli, R., and Sanzani, S. M. (2022). *Alternaria* species causing pomegranate and citrus fruit rots in Albania. Journal of Plant Diseases and Protection, 129(5), 1095-1104.

Conway, W. S., Sams, C. E., and Hickey, K. D. (2001). Pre-and postharvest calcium treatment of apple fruit and its effect on quality. In International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants 594 (pp. 413-419).

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. ciln. Microbiol- Rev., 12 (4): 564-582.

Dassprakash, M. V., Arun, R., Abraham, S. K., and Premkumar, K. (2012). In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. Pharmaceutical biology, 50(12), 1523-1530.

Dellavalle, P. D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., and Rizza, M. D. (2011). Antifungal activity of medicinal plant

extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. Chilean journal of agricultural research, 71(2), 231-239.

DeMers,M. (2022). *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. Microbiology, 168(3), 001153.

Diaz-Najera, J. F.; Serna, S. A.; Bahena, A. M.; Cruz, E.B., Hernandez, M.V., Gomez, O.G., Aragón, D.F. (2021). First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) Causing Wilt Disease of Phaseolus vulgaris in Mexico. Plant Dis.105:710.

Doughari, J. H., El-mahmood, A. M. and Tyoyina, S. P. (2008). Antimicrobial activity of leaf extracts of Senna obtusifolia (L). Afric. J. Pharmacy and Pharmacology, 2, 1, 7-13.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., ... and Bignami, M. (2020). Risk assessment of *ochratoxin* A in food. EFSA Journal, 18(5), e06113

Ezra, D., Kirshner, B., Hershcovich, M., Shtienberg, D., and Kosto, I. (2015). Heart rot of pomegranate: Disease etiology and the events leading to development of symptoms. Plant Disease, 99(4), 496-501

Ezra, D., Shulhani, R., Bar Ya'akov, I., Harel-Beja, R., Holland, D., and Shtienberg,D. (2019). Factors affecting the response of pomegranate fruit to *Alternaria alternata*, the causal agent of heart rot. Plant disease, 103(2), 315-323.

Faedda, R., Granata, G., Massimino Cocuzza, G. E., Lo Giudice, V., Audoly, G., Pane, A., and Cacciola, S. O. (2015). First report of heart rot of pomegranate *Punica granatum* caused by *Alternaria alternata* in Italy. Plant Disease, 99(10), 1446..

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.Meeting, and World Health Organization. (2002). Evaluation of certain *mycotoxins* in food: Fifty-Sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Vol. 56). World Health Organization.

Garrido, C. E., Pezzani, C. H., and Pacin, A. (2012). Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (Zea mays L.), from 1999 to 2010. Food Control, 25(2): 660-665.

Ge, S., Duo, L., Wang, J., Yang, J., Li, Z., and Tu, Y. (2021). A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research status. Journal of ethnopharmacology, 271, 113877.

Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., Roustaee, A., and Sahebani, N. A. (2009). Biological control of apples blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection Research.

Graeme, M. Walker; Anne, H. Mcleod and Valerie, J. Hodgson . (1995). Interactions between Killer yeast and phathogenic.fungi FEMS Microbiology. 127, Issue 3, 213-222 .

Hackbart, H., Prietto, L., Primel, E. G., Garda-Buffon, J., and BadialeFurlong, E. (2012). Simultaneous extraction and detection

of *ochratoxin* A and citrinin in rice. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23, 103-109

Heperkan, Z. D., Gunalan-Inci, E., and Ceyhan, T. (2023). Unexpectedly high patulin contamination and co-occurrence of ochratoxin A in homemade vinegar. Food Control, 148, 109685.

Huang, S.L. ; Kohmoto, K. ; Otani, H. ; Kodama, M. (1996) . Nuclear behavior during the formation ofapressoriaby *Alternaria alternata*. Myco. Sci., 37, 41-47

Jatoi, G. H., Muhammad, S., Metlo, W. A., Al-Ani, L. K. T., Haseenullah, M. A. A., Gadhi, M. A., and Reki, M. (2020). Efficacy of different essential oils, fungicides and biocontrol agents against Aspergillus niger the causal agent of fruit rot in Pomegranate. Int. J. Biosci, 16, 51-65.

Jurenka, J. (2008). Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. Alternative medicine review, 13(2).

Kabiri, M., and Amiri-Besheli, B. (2012). Toxicity of Palizin, Mospilan and Consult on Agonoscena pistaciae Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae), *Oenopia conglobata* L.(Coleoptera: Coccinellidae) and Psyllaephagus pistaciae Ferrière (Hymenoptera: Encyrtidae). *Academic Journal of Entomology*, *5*(2), 99-107.

Kanetis, L., Testempasis, S., Goulas, V., Samuel, S., Myresiotis, C., and Karaoglanidis, G. S. (2015). Identification and *mycotoxigenic* capacity of fungi associated with pre-and postharvest fruit rots of

pomegranates in Greece and Cyprus. International Journal of Food Microbiology, 208, 84-92.

Khan, A. A., Habib, A., Khan, W. A., and Arif, M. U. (2021). Management of Grey mold of Pomegranate (*Punica granatum* L.) through essential oils. Life Science Journal, 18(11).

Kimura, N.,Tsuge, T. (1993) . Genecluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. J. Bacteriol., 175, 4427-4435

Kitigwa, S. J., Kimaro, E. G., Nagagi, Y. P., Kussaga, J. B., Suleiman, R. A., and Matemu, A. (2023). Occurrence and associated risk factors of *aflatoxin* contamination in animal feeds and raw milk from three agroecological zones of Tanzania. *World Mycotoxin Journal*, *16*(2), 149-163.

Kinay Teksur, P., Şen, F., Yıldız, F., Hizaler, K., and Celik, Y. (2012). The effect of pre and postharvest treatments on decay development of 'Hicaz'pomegranates (*Punica granatum* L. var Hicaz). In The 7th International Postharvest Symposium (IPS2012), Kuala Lumpur, Malaysia.

Kowalska, J., Krzymińska, J., Matysiak, K., and Jakubowska, M. (2022). Screening for Antagonistic Yeasts to Manage *Alternaria* spp. in Organic Farming. Agriculture, 12(10), 1693.

Krebs C.J. (1978). Ecology:The Experimental Analysis of Distribution and Abundance .Harper and Row Publisher, New York.

Küpper, W., Pekmezci, M., and Henze, J. (1994). Studies on CA-storage of pomegranate (*Punica granatum* L., cv. Hicaz). Postharvest Physiology of Fruits 398, 101-108.

KURKINA, Y. N., ESINA, E. P., BARSKOVA, A. S., SHERBAKOVA, A. Y., and LAZAREV, A. V. (2020). Influence of natural essential oils on phytopathogenic strains *alternaria alternata* and *cladosporium cladosporioides*. International Journal of Pharmaceutical Research (09752366), 12(2).

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular biology and evolution, 35(6), 1547.

Lacey, J., G. L. Bateman and C.J. Mirocha. (1999). Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. In wheat Ann. Appl. Biol. 134: 277-283

Lansky, E. P., and Newman, R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. Journal of ethnopharmacology, 109(2), 177-206.

Lasram, S., Zemni, H., Hamdi, Z., Chenenaoui, S., Houissa, H., Tounsi, M. S., and Ghorbel, A. (2019). Antifungal and *antiaflatoxinogenic* activities of *Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. Industrial crops and products, 134, 11-18.

Lima, C. B. D., Rentschler, L. L. A., Bueno, J. T., and Boaventura, A. C. (2016). Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata, Alternaria dauci* and on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). Ciência Rural, 46(5), 764-770.

Liu, L., Xie, M., and Wei, D. (2022). Biological Detoxification of Mycotoxins: Current Status and Future Advances. International journal of molecular sciences, 23(3), 1064.

López, P., Venema, D., Mol, H., Spanjer, M., de Stoppelaar, J., Pfeiffer, E., and de Nijs, M. (2016). *Alternaria* toxins and conjugates in selected foods in the Netherlands. Food Control, 69, 153-159.

Lotfi, M., Hamdami, N., Dalvi-Isfahan, M., and Fallah-Joshaqani, S. (2022). Effects of high voltage electric field on storage life and antioxidant capacity of whole pomegranate fruit. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 75, 102888.

Lucey, J. A., Munro, P. A., and Singh, H. (1999). Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. International Dairy Journal, 9(3-6), 275-279.

Luo, Y., Hou, L., Förster, H., Pryor, B., and Adaskaveg, J. E. (2017). Identification of *Alternaria* species causing heart rot of pomegranates in California. Plant disease, 101(3), 421-427.

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., and Toman, J. (2016). *Ochratoxin* A: 50 years of research. Toxins, 8(7), 191.

Mateo, EM , Gill-serna , J., Patino, B. and jinenez ,M. (2011). Adlatoxinand *ochratoxins* Ain stored barley grian in spain and impact of pre –based strategies to assess the occurrence of *aflatoxigenic* andochratoxigenic *Aspergillus* spp.International Journalof food 26./microbiology .149(2):118.

McKinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by Helminthosporium sativum.

Medina, A., Rodriguez, A., and Magan, N. (2014). Effect of climate change on *Aspergillus flavus and aflatoxin* B1 production. Frontiers in microbiology, 5, 348.

Mincuzzi, A., and Ippolito, A. (2023). Pomegranate: Postharvest Fungal Diseases and Control. In New Advances in Postharvest Technology. IntechOpen

Mincuzzi, A., Picciotti, U., Sanzani, S. M., Garganese, F., Palou, L., Addante, R., ... and Ippolito, A.(2023). Postharvest Diseases of Pomegranate: *Alternative* Control Means and a Spiderweb Effect. Journal of Fungi, 9(8), 808

Mincuzzi, A., Sanzani, S. M., Palou, L., Ragni, M., and Ippolito, A. (2022). Postharvest rot of pomegranate fruit in southern Italy: Characterization of the main pathogens. Journal of Fungi, 8(5), 475.

Mohd Zainudin, N. A. I., Abd Murad, N. B., & Shaari, F. N. (2024). Utilisation of Plant-Based Product in Post-harvest Disease Management of Fruits. In Advances in Tropical Crop Protection (pp. 121-155). Cham: Springer Nature Switzerland.

Munhuweyi, K., Lennox, C. L., Meitz-Hopkins, J. C., Caleb, O. J., and Opara, U. L. (2016). Major diseases of pomegranate (*Punica granatum* L.), their causes and management—A review. Scientia Horticulturae, 211, 126-139.

Myresiotis, C. K., Testempasis, S., Vryzas, Z., Karaoglanidis, G. S., and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015). Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method. Food Chemistry, 182, 81-88.

Naher, L., Yusuf, U. K., Ismail, A., and Hossain, K. (2014). *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. Pak. J. Bot, 46(4), 1489-1493.

Nallathambi, P., and Umamaheswari, C. (2009). Detection of *aflatoxins* in pomegranate arils infected by *Aspergillus* species. *Indian Phytopathology*, *62*(2), 178-182.

Nargund, V. B., Jayalakshmi, K., Benagi, V. I., Byadgi, A. S., Patil, R. V., Melgarejo, P., and Valero, D. (2012). Status and management of anthracnose of pomegranate in Karnataka State of India. *Options Méditerranéennes Ser. A Semin. Mediterr*, *103*, 117-120.

Navale, V., Vamkudoth, K. R., Ajmera, S., and Dhuri, V. (2021). *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. Toxicology reports, 8, 1008-1030.

Neamah, S. K., Alwan, S. L., and AL-Abedy, A. N. (2020). Molecular diagnosis of new *Aspergillus niger* isolates causing degradation of pomegranate (*Punica granatum*) trees in Iraq. Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol, 79-84.

Nirmal, M. D., Jadhav, P. P., and Pawar, S. (2023). Pomegranate Leaf Disease Detection Using Supervised and Unsupervised Algorithm Techniques. Cybernetics and Systems, 1-12.

Nouri, B., Mohtasebi, S. S., and Rafiee, S. (2020). Quality detection of pomegranate fruit infected with fungal disease. International Journal of Food Properties, 23(1), 9-21.

Ntasiou, P., Myresiotis, C., Konstantinou, S., Papadopoulou-Mourkidou, E., and Karaoglanidis, G. S. (2015). Identification, characterization and mycotoxigenic ability of *Alternaria* spp. causing core rot of apple fruit in Greece. International journal of food microbiology, 197, 22-29.

Ostry, V. (2008). *Alternaria mycotoxins*: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin Journal, 1(2), 175-188.

Pala, H.; Tatli, A.; Yilmaz, C.; Özgüven, A.I.(2009). Important diseases of pomegranate fruit and control possibilities in Turkey. Acta Hortic. 2009, 818, 285–290.

Pandian, J. D., Singh, G., Kaur, P., Bansal, R., Paul, B. S., Singla, M., ... and Sharma, M. (2016). Incidence, short-term outcome, and spatial distribution of stroke patients in Ludhiana, India. Neurology, 86(5), 425-433.

Pantiora, P. D., Balaouras, A. I., Mina, I. K., Freris, C. I., Pappas, A. C., Danezis, G. P., ... and Georgiou, C. A. (2023). The Therapeutic Alliance between Pomegranate and Health Emphasizing on Anticancer Properties. Antioxidants, 12(1), 187.

Palpacelli ,V., Cinai, M. and Rosini, G. (1991).Activity of different "Killer" yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. FEMS Microbiol Lett 1; 68 (1) : 75-8 .

Persons, K., Raines, J. M., & Rodriguez, J. M. (2013). Antagonistic effects of *Saccharomyces cerevisiae* on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* at varying temperatures. Mycology, 4(1), 38-43.

plascencia-Jatomea, M., Susana, M., Gómez, Y., & Velez-Haro, J. M. (2014). *Aspergillus* spp.(Black mold). In Postharvest decay (pp. 267-286). Academic Press

Pommerenke, C.,M. Musken, T. Becker and A. Dotsch.(2011). Global genotype phenotype correlation in *Pseudomonas* aeruginosa .Plos. Pathog.6 :1-8

Pundri,R.K.and Jain,P.(2010). Antifungal activity of twenty two ethanolic plant extracts against food_associated fungi .journal of pharmacy Rsearch,3,506-510.

Rashidi, A., Mousavi, B., Rahmani, M. R., Rezaee, M. A., Hosaini, W., Motaharinia, Y., ... and Zamini, G. (2011). Evaluation of antifungal effect of *Lavandula officinalis*, *Salvia officinalis* L., Sumac, *Glycyrrhiza glabra*, and *Althaea officinalis* extracts on *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus flavus* species. Journal of Medicinal Plants Research, 6(2), 309-313.

Rassin, N. K., Al-judy, N. J., and Dheeb, B. I. (2015). Molecular Identification of *Aspergillus fumigatus* Using ISSR and RAPD Markers. *Iraqi Journal of Science*, *56*(4A), 2788-2797.

Reddy, K. R. N., Nurdijati, S. B., and Salleh, B. (2010). An overview of plant-derived products on control of *mycotoxigenic* fungi and *mycotoxins*. Asian Journal of Plant Sciences, 9(3), 126.

Richard J.L .(2007). Some major *mycotoxins* and their *mycotoxicosesAn* overview. Int. J. Food Microbiol, 119:3- 10

Roseanu, A.; Jecu, L.; Badea, M. and Evans, R. W. (2010). *Mycotoxins*: An Overview on their quantification methods. Romanian J. Biochemistry, 47(1): 79-86.

Sari, F. M., Oztas, E., Ozden, S., and Ozhan, G. (2020). Liquid chromatographic determination of *citrinin* residues in various meat products: A pioneer survey in Turkey. Journal of the Faculty of Pharmacy of Istanbul University, 50(3), 195-202.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., and Frisvad, J. C. (2004). Introduction to food-and airborne fungi (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Samson, R.A., and Varga, J. (2008). *Aspergillus* systematics in the genomic era (Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre)

Schulz, M. C. (2020). Modulation der nierenschädigenden Wirkung von *Ochratoxin* A durch simultane Exposition mit Citrinin und durch tubulo interstitielle Kommunikation

Selcuk, N., and Erkan, M. (2014). Changes in antioxidant activity and postharvest quality of sweet pomegranates cv. Hicrannar under modified atmosphere packaging. Postharvest Biology and Technology, 92, 29-36.

Shalaby, M.E. and El-Nady, M.F.(2008). Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugarbeet plants.Acta Biologica Szegediensis, 52(2):271- 275.

Shtayeh , M.S.A. and Abu-Ghdeib , S.I. (1999). Antifungal Activity extract Against dematophytes. J. Mycoses., 42:665-672.

Singh, A., Shukla, A. K., and Meghwal, P. R. (2020). Fruit cracking in pomegranate: extent, cause, and management–A Review. International Journal of Fruit Science, 20(sup3), S1234-S1253.

Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., and Catalan, C. A. (2006). Studies on essential oils, Part 41. Chemical composition,

antifungal, antioxidant and sprout suppressant activities of coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil and its oleoresin. Flavour and fragrance journal, 21(3), 472-479.

Solhaug, A., Eriksen, G. S., and Holme, J. A. (2016). Mechanisms of action and toxicity of the mycotoxin *alternariol*: A review. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, *119*(6), 533-539.

Stool , M. , Begerow , D. and oberwinkler , F.(2005). molecular phylogeny of ustilago , sporisorium , and related taxa based on combined analysis of Rdna Sequences . myco . 109 : 342 – 356 .

Sumalan, R. M., Alexa, E., Popescu, I., Negrea, M., Radulov, I., Obistioiu, D.,and Cocan, I.(2019). Exploring ecological alternatives for crop protection using *Coriandrum sativum* essential oil. Molecules, 24(11), 2040.

Tekiner, N., Kotan, R., Tozlu, E., and Dadaşoğlu, F. (2020). Biological control of Coniella granati Saccardo in pomegranate. Universal Journal of Agricultural Research, 8(1), 18-24..

Teksur, P. K. (2015). *Alternative* technologies to control postharvest diseases of pomegranate. Stewart Postharvest Rev, 11, 1-7.

Toma, M. A., Nazir, K. N. H., Mahmud, M. M., Mishra, P., Ali, M. K., Kabir, A., ... and Alim, M. A. (2021). Isolation and identification of natural colorant producing soil-borne *Aspergillus niger* from Bangladesh and extraction of the pigment. *Foods*, *10*(6), 1280.

Thomidis, T. (2015). Pathogenicity and characterization of *Pilidiella granati* causing pomegranate diseases in Greece. *European journal of plant pathology*, *141*, 45-50.

Tongdee, S. C.(1994). Sulfur dioxide fumigation in postharvest handling of fresh longan and lychee for export. In ACIAR Proceedings (Vol. 58, pp. 186-189).

Tsang, C. C., Xiong, L., Poon, R. W., Chen, J. H., Leung, K. W., Lam, J. Y., ... and Woo, P. C. (2016). Gordonia hongkongensis sp. nov., isolated from blood culture and peritoneal dialysis effluent of patients in Hong Kong. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(10), 3942-3950.

Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., and Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. STUDIES IN MYCOLOGY, 78, 343-371

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., and Taylor, J.(1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1): 315-322.

Xavier, K. V., Kc, A. N., and Vallad, G. E. (2020). Fungicide application timing essential for the management of leaf spot and fruit rot on pomegranate (*Punica granatum* L.) in Florida. Plant disease, 104(6), 1629-1637.

Yahyaabadi, S., Zibanejad, E., and Doudi, M. (2011). Effect of some of plant extracts on the growth of two *Aspergillus species*. Journal of Medicinal Herbs,, 2(1), 69-81.

Yehia, H. M. (2013). Heart rot caused by *Aspergillus niger* through splitting in leathery skin of pomegranate fruit. *African Journal of Microbiology Research*, *7*(9), 834-837.

Yan, X., Chen, H., Du, G., Guo, Q., Yuan, Y., and Yue, T. (2022). Recent trends in fluorescent aptasensors for *mycotoxin* detection in food: Principles, constituted elements, types, and applications. *Food Frontiers*, *3*(3), 428-452.

Zahra, N., Saeed, M. K., Sheikh, A., Kalim, I., Ahmad, S. R., and Jamil, N. (2019). A review of mycotoxin types, occurrence, toxicity, detection methods and control: review: review of mycotoxin types. *Biological Sciences-PJSIR*, *62*(3), 206-218.

Zahedi, S. M., Hosseini, M. S., Karimi, M., Gholami, R., Amini, M., Abdelrahman, M., and Tran, L. S. P. (2023). Chitosan-based Schiff base-metal (Fe, Cu, and Zn) complexes mitigate the negative consequences of drought stress on pomegranate fruits. Plant Physiology and Biochemistry, 196, 952-964.

Zhang$_2$, J., Xu, Y., Hu, T., Sun, C., and Wu, W. (2021). Experimental Study on the Status of Maize *Mycotoxin* Production in Farmers' Grain Storage Silos in Northeastern China. Toxins, 13(11), 741.

Zou, D., Ji, J., Ye, Y., Yang, Y., Yu, J., Wang, M., Zheng, Y., and Sun, X.(2022). Degradation of *Ochratoxin* A by a UV-Mutated *Aspergillus niger* Strain. Toxins, 14(5), 343

7: الملاحق

ملحق (1): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Alternaria alternata isolate Fatima-1*
في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Alternaria alternata isolate Fatima-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PP467583.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       PP467583                 558 bp    DNA     linear   PLN 16-MAR-
2024
DEFINITION  Alternaria alternata isolate Fatima-1 internal transcribed spacer
            1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   PP467583
VERSION     PP467583.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Alternaria alternata
  ORGANISM  Alternaria alternata
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae;
            Pleosporaceae; Alternaria; Alternaria sect. Alternaria;
Alternaria
            alternata complex.
REFERENCE   1  (bases 1 to 558)
  AUTHORS   Abudzaid,F.H. and Alhumairy,Y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-MAR-2024) Plant Protection Department, Agriculture
            College/University of Kerbala, City center, Kerbala, Kerbala
56001,
            Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..558
                     /organism="Alternaria alternata"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Fatima-1"
                     /db_xref="taxon:5599"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="2023"
     misc_RNA        <1..>558
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ctgcggaggg acattacaca aatatgaagg cgggctggaa cctctcgggg ttacagcctt
       61 gctgaattat tcacccttgt cttttgcgta cttcttgttt ccttggtggg ttcgcccacc
      121 actaggacaa acataaacct tttgtaattg caatcagcgt cagtaacaaa ttaataatta
      181 caactttcaa caacggatct cttggttctg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat
      241 aagtagtgtg aattgcagaa ttcagtgaat catcgaatct ttgaacgcac attgcgccct
      301 ttggtattcc aaagggcatg cctgttcgag cgtcatttgt accctcaagc tttgcttggt
      361 gttgggcgtc ttgtctctag ctttgctgga gactcgcctt aaagtaattg gcagccggcc
      421 tactggtttc ggagcgcagc acaagtcgca ctctctatca gcaaaggtct agcatccatt
      481 aagccttttt ttcaactttt gacctcggat caggtaggga tacccgctga acttaagcat
      541 atcataggcc ggaaggaa
```

ملحق (2): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus flavus isolate y.n.190.Fatima*
في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus flavus isolate y.n.190.Fatima internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ034725.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       PQ034725                556 bp    DNA     linear   PLN 21-JUL-
2024
DEFINITION  Aspergillus flavus isolate y.n.190.Fatima internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   PQ034725
VERSION     PQ034725.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus flavus
  ORGANISM  Aspergillus flavus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 556)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N. and Abd-Zaid,F.H.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-JUL-2024) faculty of Agriculture, University of
            Karbala, Alaskan street, karbala, city center DDac18, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..556
                     /organism="Aspergillus flavus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="y.n.190.Fatima"
                     /host="pomegranate"
                     /db_xref="taxon:5059"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="22-Sep-2023"
                     /collected_by="Alhamiri"
     misc_RNA        <1..>556
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 atttacgagt gtagggttcc tagcgagccc aacctcccac ccgtgtttac tgtaccttag
       61 ttgcttcggc gggcccgcca ttcatggccg ccgggggctc tcagccccgg gcccgcgccc
      121 gccggagaca ccacgaactc tgtctgatct agtgaagtct gagttgattg tatcgcaatc
      181 agttaaaact ttcaacaatg gatctcttgg ttccggcatc gatgaagaac gcagcgaaat
      241 gcgataacta gtgtgaattg cagaattccg tgaatcatcg agtctttgaa cgcacattgc
      301 gccccctggt attccggggg gcatgcctgt ccgagcgtca ttgctgccca tcaagcacgg
      361 cttgtgtgtt gggtcgtcgt cccctctccg gggggggacgg gccccaaagg cagcggcggc
      421 accgcgtccg atcctcgagc gtatggggct ttgtcacccg ctctgtaggc ccggccggcg
      481 cttgccgaac gcaaatcaat cttggtccag gttgacctcg gatcaggtag ggatacccgc
      541 tgaacttaag catata
```

ملحق (3): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus niger isolate y.n.191.Fatima*
في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus niger isolate y.n.191.Fatima internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ034726.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       PQ034726                571 bp    DNA     linear   PLN 21-JUL-
2024
DEFINITION  Aspergillus niger isolate y.n.191.Fatima internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   PQ034726
VERSION     PQ034726.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus niger
  ORGANISM  Aspergillus niger
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 571)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N. and Abd-Zaid,F.H.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-JUL-2024) faculty of Agriculture, University of
            Karbala, Alaskan street, karbala, city center DDac18, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..571
                     /organism="Aspergillus niger"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="y.n.191.Fatima"
                     /host="pomegranate"
                     /db_xref="taxon:5061"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="22-Sep-2023"
     misc_RNA        <1..>571
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 taaggagcgg ggaggtcttt gggcccacct cccatccgtg tctattgtac cctgttgctt
       61 cggcgggccc gccgcttgtc ggccgccggg ggggcgcctc tgccccccgg gcccgtgccc
      121 gccggagacc ccaacacgaa cactgtctga aagcgtgcag tctgagttga ttgaatgcaa
      181 tcagttaaaa ctttcaacaa tggatctcgg ggttccggca tcgatgaaga acgcagcgaa
      241 atgcgataac taatgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgagtctttg aacgcacatt
      301 gcgccccctg gtattccggg gggcatgcct gtccgagcgt cattgctgcc ctcaagcccg
      361 gcttgtgtgt tgggtcgccg tccccctctc cgggggggacg ggcccgaaag gcagcggcgg
      421 caccgcgtcc gatcctcgag cgtatggggc tttgtcacat gctctgtagg attggccggc
      481 gcctgccgac gttttccaac cattctttcc aggttgacct cggatcaggt agggataccc
      541 gctgaactta agcatatcaa taagcggagg a
```

ملحق (4): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus ochraceus isolate y.n.192.Fatima* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus ochraceus isolate y.n.192.Fatima internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ034727.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       PQ034727                519 bp    DNA     linear   PLN 21-JUL-
2024
DEFINITION  Aspergillus ochraceus isolate y.n.192.Fatima internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   PQ034727
VERSION     PQ034727.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus ochraceus
  ORGANISM  Aspergillus ochraceus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 519)
  AUTHORS   Alhamiri,Y.N. and Abd-Zaid,F.H.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-JUL-2024) faculty of Agriculture, University of
            Karbala, Alaskan street, karbala, city center DDac18, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..519
                     /organism="Aspergillus ochraceus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="y.n.192.Fatima"
                     /host="pomegranate"
                     /db_xref="taxon:40380"
                     /geo_loc_name="Iraq"
                     /collection_date="22-Sep-2023"
     misc_RNA        <1..>519
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ccacccgtgt ataccgtacc ttgttggttc ggcgagcccg ccccctttt cttttagggg
       61 gcacagcgct cgccggagac accaacgtga acactgtctg aagttttgtc gtctgagtcg
      121 attgtatcgc aatcagttaa aactttcaac aatggatctc ttggttccgg catcgatgaa
      181 gaacgcagcg aaatgcgata attaatgcga attgcagaat tcagtgaatc atcgagtctt
      241 tgaacgcaca ttgcaccccc tggtattccg gggggtatgc ctgtccgagc gtcattgctg
      301 ccctcaacca cggcttctgt gttgggtcgt cgtcccccccc caggggacg ggcccgaaag
      361 gcagcggcgg caccgcgtcc ggtcctcgag cgtatgttgc tttgtcaccc gctcttgtag
      421 gcccggccgg ctgctggccg acgctgaaga gcaaccaact atttttccag gttgacctcg
      481 gatcaggtag ggatacccgc tgaacttaag catatcaat
```

Abstract

The study aimed to conduct an environmental and biological survey of the extent of pomegranate fruit infection with pomegranate fruit rot disease and to identify the fungi causing these cases in Kerbala and Babylon governorates, and to isolate and diagnose pathogenic fungal isolates that have the ability to produce mycotoxins, in addition to evaluating the effect of some plant extracts, agricultural pesticides and yeast *Saccharomyces cervisiae* in protecting pomegranate fruits from attack by pathogenic fungi in the field and warehouse.

The results of isolation and diagnosis showed that all samples taken from infected pomegranate fruits, which belong to five different areas of Kerbala Governorate and three areas of Babylon Governorate, were contaminated with different fungal isolates with a contamination rate of 100%. The results of isolation and diagnosis showed the detection of 450 fungal isolates belonging to several fungal genera, the most contaminated of which was the *Aspergillus* spp genus, followed by the Penicillium spp genus, and in third place came the *Alternaria* spp genus, which is a fungus that produces mycotoxins. The results also showed the percentage frequency of fungal species, as the species *Aspergillus. niger* outperformed with a frequency percentage of 21.35%, followed by the species *A. flavus* with a frequency percentage of 4.72%. The species *Alternaria alternata* achieved a percentage of 3.37%, excel the species *Aspergillus. ochraceus*, which recorded a percentage of 2.70%, respectively and a number of them showed great virulence in causing the disease. It was found that four fungal isolates appeared that were the most virulent with a 100% infection rate within the scratching treatment, namely *Aspergllus niger* 4 (KTAN), *Aspergillus flavus* 1 (KHAF), *Aspergillus ochraceous* 2 (KRAO) and *Alternaria alternata* 2 (KCAA).

The results of nucleotide sequence analysis of 4 fungal isolates, which were isolated from different pomegranate fruit rot cases and showed high virulence in causing pomegranate fruit rot disease under controlled conditions, were diagnosed under different species. The results of nucleotide sequence analysis showed that the isolates belong to the fungi: *Alternaria alternata, Aspergillus niger, Aspergillus flavus*, and *Aspergillus ochraceus*. All isolates were registered in the National Center for Biotechnology

Information (NCBI) under the special codes (PP467583.1, PQ034725.1, PQ034726.1, and PQ034727.1) respectively. The molecular nucleotide sequences achieved The highest matching rate was, ranging from 99.82 to 98.65%, with the ITS gene region when compared with the equivalent nucleotide sequences retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank using the BLAST program for each fungal isolate individually.

The results of the storage experiment showed that coriander extract was superior and significantly superior in reducing the percentage of infection severity to 8.06% compared to the pathogen treatment only, which reached 25.88%, and with an average fungal inhibition rate of infection severity of 68.85%, followed by the treatment with *Salvia officinalis*, which reduced the percentage of infection severity by 9.98% and with an inhibition rate of 61.43%. While the treatments of the plant-based pesticide *Palizin* and the biological agent (*Saccharomyces cervisiae*) came last, with a reduction rate of infection severity of 10.04% and 11.06% respectively and an inhibition rate of 61.20% and 57.26% compared to the control treatment.

While the results showed that treating stored pomegranate fruits with *Coriandrum sativum* extract inhibited the pathogen's ability to attack pomegranate fruits. This caused a partial reduction in the levels of mycotoxin production. Treatment with coriander extract reduced the production rate of *Alternariol* produced by *Alternaria alternata* to 65.9 µg/kg compared to the control treatment, which amounted to 93.7 µg/kg. While it reduced the production rate of *Aspergillus Ochratoxin* produced by *Aspergillus niger* by 57.8 µg/kg compared to the control treatment, which amounted to 62.10 µg/kg. While it reduced the production rate of *A. Ochratoxin* produced by *A. ochrecaus* by 20.6 µg/kg compared to the control treatment of 58.9 µg/kg. It also reduced the production an average of *Aflatoxin* B1 produced by *Aspergillus flavus* by 32.5 µg/kg compared to the control treatment, which amounted to 69.8 µg/kg.

The results of the field experiment confirmed that the plant-based pesticide Palizin was significantly superior in reducing the percentage of infection severity to 6.30% compared to the pathogen-only treatment, which reached 32.41% and with an average fungal inhibition rate of infection severity of 80.56%, followed by the *Coriandrum sativum* treatment, which

reduced the percentage of infection severity by 7.57% and with an inhibition rate of 76.64%. While the *Salvia officinalis* and the biological agent (yeast *Saccharomyces cervisiae*) treatments came last, with an infection severity reduction rate of 8.98% and 10.31% respectively and an inhibition rate of 72.29% and 68.18% compared to the control treatment.

Karbala University
College of Agriculture
Plant Protection

Evaluating the efficiency of some biological agents, plant extracts, and some chemical pesticides in combating some pathogenic fungi that cause pomegranate fruit rot *Punica granatum*, in the field and store, and the extent of their production of mycotoxins

A Thesis submitted to the Council of the Faculty of Agriculture / Karbala University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree in Plant Protection

By

Fatima Haider Abd Zaid Al-Fatlawi

Supervised by
Prof. Dr. Yasir Naser Hussein Alhamiri

1446 A.H **2024 A.D**