عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لبعض البذور الزيتية وثمار الزيتون

نديم أحمد رمضان فاتن نوري ملا عبد جنان قاسم خورشيد الترجمان*
كلية العلوم - جامعة الموصل المعهد التقني - الحويجة

الخلاصة

تم الحصول على ٦٦٦ عزلة بعضها تعود لأنواع وأجناس مختلفة من الفطريات فضلا عن ٢٠ عزلة خميرة من ٨ عينات من البذور الزيتية وثمار الزيتون، شملت ٩٩ عزلة من بذور زهرة الشمس و كان الفطر *Alternaria alternata* أكثر الفطريات تواجدا فيها وبنسبة عزل ٣٦% بينما كان الفطر *Aspergillus niger* أكثر الفطريات تواجدا في البذور الزيتية وثمار الزيتون وبلغ مجموع عدد عزلات هذا الفطر ٢٤٤، كما تواجد الفطر *Aspergillus flavus* في جميع العينات عدا البندق و الزيتون.

المقدمة

تتعرض البذور للاصابة بالأحياء الدقيقة المسببة للأمراض قبل الحصاد أو بعد التخزين، وتهاجم فطريات المخازن البذور المكسورة والمخدوشة بصورة أسرع من مهاجمتها للبذور السليمة الكاملة وقلما تصيب البذور ذات الرطوبة الأقل من ١٢% (ميخائيل; (٢٠٠٠))، و يصعب تعداد الأضرار التي تحدثها الإصابات الفطرية على البذور لكثرتها وتشعبها وخاصة سميتها وتأثيراتها في صحة الإنسان والحيوان، وقد ثبت تراكمها في الجسم وصعوبة التخلص منها، وقد دلت الدراسات على أن البذور نادرا ما تكون مصابة بفطريات الخزن وهي في الحقل لذلك معظم إصابات البذور في المخازن يكون مصدرها المخازن أو أثناء التداول، فقد تتلوث بأجهزة النقل عند التفريغ والشحن وتزداد الإصابة عند الخزن إذا ما كانت الظروف ملائمة من حرارة ورطوبة حتى لو كانت درجة التلوث بسيطة بفطريات الخزن فان لها القابلية السريعة على التكاثر إذا ما توفرت لها الظروف الملائمة، و تعود الفطريات التي تهاجم الحبوب في الحقول إلى جنس *Alternaria* و *Cladospo-rium* و *Fusarium* و *Helminthosporium* (ميخائيل; (٢٠٠٠)) إن مثل هذه الفطريات قد لا تظهر للعين المجردة على الحبوب عند الحصاد ولكنها تتكاثر وتسبب خسائر كبيرة في اثناء الخزن إذا ما توفرت لها الظروف الملائمة أما أجناس فطريات المخازن فان أكثرها يعود إلى أجناس *Aspergillus* و *Penicillium* وتكون معيشتها رمية غالبا وبما أنها لا تستطيع مهاجمة الأنسجة الحية فتنمو وتعيش على الخلايا الميتة بأسطح البذور وتنتج مواد سامة وتسبب تحلل البذور (خلف والرجبو; (٢٠٠٦)).

الهدف من هذه الدراسة هو عزل و تشخيص الفطريات المصاحبة لبذور النباتات الزيتية.

مواد وطرائق البحث

مصادر البذور والثمار الزيتية:

تم الحصول على ثمانية عينات من بذور المحاصيل الزيتية من الأسواق المحلية وجمعت ثمار الزيتون المتساقطة على التربة والتي تظهر عليها أعراض الإصابة متمثلة ببعض البقع الملونة باللون الأسود أو الأبيض أو غيرها من الألوان غير الطبيعية على غلاف الثمرة الجلدي أو بعض المناطق المنخورة التي يظهر عليها نمو فطري، حفظت العينات التي تم الحصول عليها بأكياس ورقية في الثلاجة في درجة حرارة ٥مْ لحين الاستعمال.

---

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحثة الثالثة
تاريخ تسلم البحث ١٥ / ٥ / ٢٠١٢ وقبوله ٨ / ١ / ٢٠١٣

اختبار سلامة البذور:

أجري اختبار سلامة ثمانية عينات من البذور الزيتية (البندق والجوز وزهرة الشمس والسمسم والفستق الحلبي وفستق الحقل والكازو واللوز) فضلا عن ثمار الزيتون ولعزل الفطريات استخدمت الطريقة المعتمدة من قبل الجمعية العالمية لفحص البذور International Seed Testing Association (.I.S.T.A; (١٩٧٦)) هي طريقة أطباق الاكار Agar Plate Method، حيث غسلت ١٠٠ بذرة من كل عينة ومن ثمار الزيتون بماء الحنفية للتخلص من الشوائب أو الأتربة العالقة وعقمت سطحياً بغمرها بمحلول ١% هايبوكلورايت الصوديوم NaOCL لمدة دقيقة واحدة وفي ظروف معقمة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم قبل توزيعها على الإطباق (Leslie وآخرون; (١٩٩٠)) ثم وزعت بمعدل ١٠ بذور أو ثمار/طبق (Yang و Thomas; (١٩٨١)) احتوت الإطباق على وسط أكار البطاطا و الدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA) المضاف إليها المضاد الحيوي سلفات الستربتومايسيين (Streptomycin) ١٠٠جزء بالمليون وحضنت الإطباق

بالحاضنة في درجة حرارة ٢٥ ± ٢ مْ لمدة ٧ أيام (Mengistu و Sinclair; (١٩٧٩)) وعرضت لدورة إضاءة متعاقبة ١٢ ساعة ضوء و ١٢ ساعة ظلام (Michail وآخرون; (١٩٧٩)) بعد التحضين لوحظ نمو أنواع مختلفة من الفطريات كررت التجربة ثلاث مرات، وشخصت الفطريات بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية التي وردت في المصادر الآتية (Ellis; (١٩٧١) و Barnett و Hunter; (١٩٧٢) و Pitt و Hocking; (١٩٩٧)).

ظروف حفظ العزلات:

حفظت العزلات المختلفة من الفطريات التي تم عزلها من البذور الزيتية وثمار الزيتون بعد تنميتها على وسط أكار البطاطا والدكستروز PDA على شكل مائل داخل أنابيب الاختبار Slants في الحاضنة وحفظت بالثلاجة في درجة حرارة ٥مْ.

الأوساط الزرعية:

وسط أكار البطاطا والدكستروز Potato Sucrose Agar (PDA) حضر هذا الوسط من ٢٠٠غم من مكعبات البطاطا المقشورة و ٢٠غم سكروز و١٥غم من الاكار ثم يكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر (Pitt و Hocking; (٢٠٠٩)).

ضبط الأس الهيدروجيني الابتدائي:

تم ضبط الأس الهيدروجيني الابتدائي لجميع أنواع الأوساط الزرعية التي استخدمت في هذه الدراسة عند تحضير الوسط باستخدام جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter من نوع OAKTON تم معايرة الجهاز باستخدام محلولي التنظيم ذوي الأس الهيدروجيني القياسي ٤ و ٧. أستخدم محلول هيدروكسيد الصوديوم ١ع وحامض الهيدروكلوريك ١ع لضبط الأس الهيدروجيني المطلوب.

تشخيص أنواع جنس *Aspergillus*

شخص النوع التابع للجنس *Aspergillus* بعد تنقيتها بطريقة البوغ المنفردSingle – Spore Technique و نظراً للاختلافات البسيطة في الجزء الخضري بين أنواع الجنس فاعتمد التشخيص على النمو في أوساط زرعية مختلفة وفي درجات حرارية مختلفة استخدم ثلاثة أوساط زرعية أساسية للتشخيص وهي **(١)** وسط زابك ومستخلص الخميرة Czapek Yeast Extract Agar (CYA) كما تم تحضيرCzapek concentrate **(٢)** وسط مستخلص الشعير المنقوع Malt Extract Agar (MEA) **(٣)** وسط نترات الكلسرين Glycerol Nitrate Agar (G25% N). تم ضبط الأس الهيدروجيني عند ٥,٦ وعقم الوسط بالمعقام عند ١٢١ مْ لمدة ١٥ دقيقة وتحت ضغط ١٥ باوند/انج^{٢}. نميت العزلات الفطرية التابعة لجنس *Aspergillus* على وسط PDA وحضنت في درجة حرارة ٢٥ ± ٢ مْ لمدة ٧ أيام، واستخدمت ثاقبة الفلين Cork borer بعد تعقيمها بغمرها بالكحول ٧٠% والتلهيب ثم التبريد وباستخدام ابرة التلقيح المعقمة والمبردة للحصول على أقراص من المستعمرة، تم رفع قرص قطره ٧ ملم ووضع في طبق زجاجي حاوي على احد الأوساط الزرعية الثلاثة السابقة الذكر وبواقع ٣ مكررات / فطر / وسط زرعي، و تم التحضين في درجات حرارية ٥مْ و ٢٥مْ و ٣٧مْ لمدة ٧ أيام. شخصت الأنواع من خلال شكل النمو ولون المستعمرة بقياس قطر المستعمرة الفطرية وبالاعتماد على المفتاح التصنيفي للأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* وأطواره الكاملة (Pitt و Hocking; (١٩٩٧)).

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطريات:

تم اختبار سلامة البذور لتسعة عينات وهي بذور البندق (*Carylus avellana*) والجوز (*Juglans regia*) وزهرة الشمس (*Helianthus annuus*) والسمسم (*Sesamum indicum*) وفستق الحقل (*Arachis hypogaea*)والفستق الحلبي(*Pistacia vera*) والكازو (*Anacardium occidentale*) واللوز (*Prunus amygdalus*) وثمار الزيتون (*Olea europaea*) بطريقة أطباق الاكار Agar Plate Method، أظهرت نتائج العزل العديد من الفطريات المصاحبة للبذور وثمار الزيتون بلغ عددها ثمانية أجناس فضلا عن الخمائر على النحو المبين في الجدول (١ و ٢). لوحظ ظهور الفطر *Aspergillus niger* في جميع عينات البذور عدا بذور السمسم وكانت أعلى نسبة لعزله في بذور اللوز ٥٧% وانخفضت في بقية العينات وكانت على النحو الأتي : البندق ٢٢% والجوز ٣٨% (الشكل،١) وزهرة الشمس ١٣% والزيتون ٣% وفستق الحقل ٢٢% و الفستق الحلبي ٥٠% والكازو ٣٩% (الشكل،٢). ولقد عزل هذا الفطر من قبل Abdel-Gawad وآخرون; (١٩٩٣) من بذور الكازو وفستق الحقل ومن بذور زهرة الشمس (Weidenbörner وآخرون; (١٩٩٥)) و من بذور فستق الحقل (Rasheed وآخرون; (٢٠٠٤) و Hadanich وآخرون; (٢٠٠٨)) أيضا من زهرة الشمس و من بذور اللوز والبندق (Afzal وآخرون; (٢٠١٠)).

لوحظ ظهور الفطر *Aspergillus flavus* في كل من عينات بذور الجوز وزهرة الشمس والسمسم وفستق الحقل والفستق الحلبي والكازو، وكانت نسب عزله (١٧ و ٥ و ٦ و ٤٦ و ٢٩ و ١٧)% على التوالي، وكانت أعلى نسبة لعزله في

بذور فستق الحقل ٤٦% ولقد عزل هذا الفطر من قبل الباحثين Afzal وآخرون; (٢٠١٠) من بذور زهرة الشمس و الكازو و الكستناء و البندق و الفستق الحلبي و الجوز ومن قبل الباحث Jonsyn; (١٩٨٨) من بذور السمسم كما وعزل من قبل Rasheed وآخرون; (٢٠٠٤) و Pitt وآخرون; (١٩٩٣) من بذور فستق الحقل. ولوحظ ظهور الفطر *Aspergillus oryzae* في عينات بذور البندق وبنسبة عزل ٦% ولم تظهر في باقي العينات وعزل هذا الفطر من قبل الباحث Pitt وآخرون; (١٩٩٣) من بذور فستق الحقل.

تم عزل الفطر *Aspergillus candidus* من عينات بذور السمسم وبنسبة عزل ٤% ومن عينات بذور الكازو و بنسبة عزل ٥% ولم يظهر في بقية العينات وعزل هذا الفطر من قبل الباحثين Rasheed وآخرون; (٢٠٠٤) من بذور فستق الحقل.

الفطر *Penicillium* spp. عزل من عينات بذور البندق والجوز وفستق الحقل والفستق الحلبي والكازو، وكانت نسب العزل ١١% و ٩% و ٧ % و ٢% و ١١% على التوالي، ولم يعزل من باقي عينات البذور، وعزل هذا الفطر من قبل الباحثين Hadanich وآخرون; (٢٠٠٨) من بذور زهرة الشمس وWeidenbörner وآخرون; (١٩٩٥) من بذور اللوز والبندق ومن قبل الباحثJonsy; (١٩٩٨) من بذور السمسم و Pitt وآخرون; (١٩٩٣) من بذور فستق الحقل.

الفطر *Rhizoctonia solani* ظهر في عينات بذور البندق و زهرة الشمس و الزيتون و فستق الحقل و الكازو وبنسب عزل ٢٩% و ١٥ % و ٢٠% و٢٤% و ٥% على التوالي ولم يظهر في باقي العينات وعزل هذا الفطر من قبل الباحثين Rasheed و آخرون; (٢٠٠٤) من بذور فستق الحقل.

جدول(١): الفطريات المعزولة من بذور وثمار المكسرات على وسط أكار البطاطا الدكستروز.

العينات	الفطريات المعزولة	% العزل
البندق *Carylus avellana*	*Aspergillus niger*	٢٢
	A. oryzae	٦
	Penicillium spp.	١١
	Rhizoctonia solani	٢٩
مجموع العزلات		٦٨
الجوز *Juglans regia*	*Aspergillus flavus*	١٧
	A. niger	٣٨
	Penicillium spp.	٩
	Rhizoctonia solani	٢٠
مجموع العزلات		٨٤
الفستق الحلبي *Pistacia vera*	*Aspergillus flavus*	٢٩
	A.niger	٥٠
	Penicillium spp.	٢
مجموع العزلات		٨١
الكازو *Anacardium occidentale*	*Aspergillus candidus*	٥
	A.flavus	١٧
	A. niger	٣٩
	Penicillium spp	١١
	Rhizoctonia solani	٥
	Rhizopus stolonifer	٦
مجموع العزلات		٨٣
اللوز *Prunus amygdalus*	*Aspergillus niger*	٥٧
مجموع العزلات		٥٧

جدول(٢): الفطريات المعزولةمن بذور وثمار االنباتات الزيتيةعلى وسط أكار البطاطا الدكستروز.

العينات	الفطريات المعزولة	% العزل
زهرة الشمس *Helianthus nnuus*	*Alternaria alternata*	٣٦
	Aspergillus flavus	٥
	A. niger	١٣
	Drechslera spp.	٥
	Rhizoctonia solani	١٥
	Rhizopus stolonifer	٢٠
	Stemphylium spp.	٥
مجموع العزلات		٩٩
السمسم *Sesamum indicum*	*Aspergillus candidus*	٤
	A. flavus	٦
	Yeast	٢٠
مجموع العزلات		٣٠
الزيتون *Olea europaea*	*Alternaria alternata*	٣٩
	Aspergillus niger	٣
	Fusarium culmarum	٨
	Rhizoctonia solani	٢٠
	Rhizopus stolonifer	١٥
مجموع العزلات		٨٥
فستق الحقل *Arachis hypogaea*	*Aspergillus flavus*	٤٦
	A. niger	٢٢
	Penicillium spp.	٧
	Rhizoctonia solani	٢٤
مجموع العزلات		٩٩

شكل (1) : الفطريات المصاحبة لبذور الجوز
1- *Aspergillus flavus*
2- *Aspergillus niger*
3- *Penicillium* spp.

الشكل (2): الفطريات المصاحبة لبذور الكازو
1- *Aspergillus flavus*
2- *Penicillium* spp.

وجد الفطر *Rhizopus stolonifer* في كل من عينات بذور الجوز و زهرة الشمس و الزيتون و الكازو وبنسب عزل ٢٠% و ٢٠% و ١٥% و ٦% على التوالي، ولم يظهر في باقي عينات البذور وعزل هذا الفطر من قبل الباحثين Afzal وآخرون; (٢٠١٠) و EL-Maraghy و EL-Maghraby; (١٩٨٦) من بذور زهرة الشمس، ومن قبل Abdel-Gawad وآخرون; (١٩٩٣) من بذور اللوز و الكازو و البندق و الفستق الحلبي و الجوز.

عزل الفطر.*Stemphylium* spp بنسبة ٥% من عينات بذور زهرة الشمس وعزل هذا الفطر من قبل الباحثين Hadanich و آخرون; (٢٠٠٨) من بذور زهرة الشمس و El-Wakil و Metwally; (٢٠٠١) من بذور الفستق الحلبي. وتم عزل الفطر .*Drechslera* spp من عينات بذور زهرة الشمس بنسبة ٥% و عزل هذا الفطر من قبل الباحثين Afzal وآخرون; (٢٠١٠) من بذور زهرة الشمس. ولوحظ ظهور الفطر *Fusarium culmarum* في عينات ثمار الزيتون وبنسبة عزل ٨%، وقد قام الباحث Onsyn; (١٩٨٨) بعزل الفطر .*Fusarium* spp من بذور السمسم و EL-Maraghy و EL-Maghraby;(١٩٨٦) من بذور زهرة الشمس.

أما بالنسبة لتردد او تكرار الفطريات المعزولة فقد حقق الفطر *Aspergillus niger* اعلى نسبة تردد ٢٧,١١% تلاه الفطر*Aspergillus flavus* و بنسبة تردد ١٣,٣٣% بينما كان الفطر *Fusarium culmarum* اقل الفطريات ترددا وبنسبة ٠,٨٨% كما موضح في الجدول (٣).

جدول(٣): تردد الفطريات المعزولة على وسط أكار البطاطا والدكستروز من بذور المحاصيل الزيتية وثمار الزيتون.

الفطر	% التردد	الفطر	% التردد
Aspergillus niger	٢٧,١١	*Stemphylium* spp.	٥
A. flavus	١٣,٣٣	*Penicillium* spp.	٤,٤٤
Rhizoctonia solani	١٠,٣٣	Yeast	٢,٢٢
Alternaria alternata	٨,٣٣	*A. oryzae*	١,٥
Rhizopus stolonifer	٦,٧٧	*A. candidus*	١
Drechslera spp.	٥	*Fusarium culmarum*	٠,٨٨

المصادر

١- خلف، احمد صالح و عبد الستار سمير الرجبو (٢٠٠٦). تكنولوجيا البذور. دار ابن الأثير للطباعة والنشر / جامعة الموصل، ٩٦٨ صفحة.

٢- ميخائيل. سمير حسني (٢٠٠٠). أمراض البذور. منشأة المعارف بالإسكندرية. الطبعة الثالثة. ٤٢٨ صفحة.

3- Abdel-Gawad, K.M. and Zohri, A.A. (1993). Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. J. Mycopath. 124 :55-64.

4- Afzal, R.; Mughal ,S.M.; Munir, M.; Sultana, K; Qureshi, R.; Arshad, M. and Laghari, M. K. (2010). Mycoflora associated with seeds of differ-rent sunflower cultivars and its management. Pak. J. Bot. 42: 435-445.

5- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Burgess Publishing Company, Minnesota .241pp.

6- Ellis, M.B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycol-ogical Institute. Kew, Surrey, England.
7- EL-Maraghy, S.S. and EL-Maghraby, O. M. O. (1986). Mycoflora and mycotoxins of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds in Egypt 1. sugar fungi and natural occurrence of mycotoxin. Qatar Univ. Sci. Bull. 6:107-121.
8- EL-Wakil, M.A. and Metwally, M.A. (2001). Seed borne fungi of peanut in Egypt : pathogenicity and transmission. Pakistan. J. Biol. Sci. 4:63-68.
9- Hadanich, D.; Peredi, J.; Juhsz - Roman, M. and Nagy, B. (2008). The effect of microorganisms deteriorating quality in storing sunflower seed. Acta. Alimentaria. 37:77-86.
10- Jonsyn, F. E. (1988). Seed borne fungi of sesame (*Sesamum indicum* L.) in sierra leone and their potential aflatoxin, mycotoxin production. J. Mycopath. 104:123-127.
11- Leslie, J.F.; Pearson; Charles, A.S.; Nelson, P.E. and Toussoum, T.A. (1990). *Fusarium* spp. From corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern united state. Phytopathology. 80: 343-349.
12- Mengistu, A. and Sinclair, J.B. (1979). Seed borne microorganism of Ethiopian-grown soybean and chickpea seeds. Plant Dis. Reptr. 63: 616-619.
13- Michal, S.H.; Abdel-Rehim, M.A. and Abu-Elgasim, E.A. (1979). Seed health testing of soybean in Egypt. Acta Phytopathol. Acodemiae Scientiarum. Hungaricae. 14: 371-377.
14- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (١٩٩٧). Fungi and Food spoilage, 2nd ed. Gaithersburg , Maryland. Chapman and Hall., 593 pp.
15- Pitt,J.I.; Hocking, A.D.; Bhudhasamai,K.; Miscamble, B. F.; Wheeler, K .A.; Tanboon-EK,P. (١٩٩٣). The normal mycoflora of commodities from Thailand.1. nuts and oilseeds. Int J. Food Microbial. 20:211-226.
16- Rasheed, S.; Dawar, S.; Ghaffar, A. and Shaukat, S. S. (2004). Seed borne mycoflora of groundnut .Pak. J. Bot. 36:199-202.
17- Weidenbörner,M.; Wieczorek, C. and Kunz, B. (1995). Mold spectra of various foods in relation to plating medium. J. Food Protection. 58 : 661-665.
18- Yang, S.M. and Thomas, C.A. (1981). Comparision of techniques for inoculating sunflower with three species of *Rhizopus*. Phytopathology. 71:458-460.

Isolation And Identification Of Fungi Associated With Some Oil seeds And Olives .

Nadeem A.Ramadan Faten N.Mulla Abid Janan K. K. Al-Tarjuman
Coll.Of.Sci / Mosul Univ. Al-Haweejah Technical Institute

Abstract

666 fungal isolates were obtained and identified, these isolates belongs to different species as well as 20 yeast isolates from eight samples of oil seeds and Olive fruits, they were 99 isolates from sunflower seeds ,the fungus *Alternaria alternata* was the most frequent in sunflower seeds with isolate rate 36%. 244 isolates of *Aspergillus niger were* obtained from all oil seeds and Olive fruits. also *Aspergillus flavus* isolated from all samples except *Carylus avellana* and *Olea europaea* plants.