الكشف عن السم الفطري الزيرالينون *Zearalenone* من راشح الفطر *Fusarium oxysporum* المعزول من البصل

فتحية محمد أبوجناح
قسم الأحياء - شعبة علم النبات – كلية العلوم – جامعة مصراتة
Email: f.abu-janah@sci.musiratau.edu.ly

Submission data 01 . 06.2022 Acceptance data 15. 8 .2022 Electronic publisher data: 26.8.2022

المخلص: تم بهذا البحث جمع عينات من البصل من عدة مناطق في مدينة مصراتة تمثلت في الدافنية، طمينة، زاوية المحجوب، الغيران، قزير، الجزيرة، مصراتة المركز، رأس الطوبة، الزروق و قصر أحمد، خلال الفترة الممتدة من شهر يونيو – نوفمبر لعام 2018 وتم أخذ العينات والتي تمثلت في كيلو من البصل من كل منطقة حيث كان عدد العينات كاملة 50 عينة ولكل عينة نما عليها الفطر Fusarium oxysporum 3 مكررات حيث كان عدد الأطباق 150 طبقا, ثم عزل الفطر F. oxysporum من الجزء القاعدي من نبات البصل (السوق القرصية والجذور الليفية) التي ظهرت عليها أعراض المرض, ومن ثم تنميته على الوسط الغذائي الصلب PDA (Potato dextrose agar) ثم تنميته في أنابيب اختبار محتوية على الوسط الغذائي السائلNB(Nutrient broth) عند درجة حرارة 28 ±2°م وذلك لقياس الوزن الرطب والجاف للمرشح وأيضا لغرض الكشف عن سم الزيرالينون Zearalenone من الراشح ونفذت عملية الكشف عن السم الفطري الزيرالينون Zearalenone في خطوتين أولا تحضير العينة وتمت بإضافة 100 µ l من ال Bufffer يأتي مع الكيت الخاص بالاختبار على 600 µ l من الراشح في أنابيب خاصة ذات غطاء مع الرج البسيط لضمان تجانس المحلول مع بعض, ثانيا الحقن بمواد خاصة تتكون من standard solution، chromogen , substrate,enzyme conjugate و stop solution , وأخذت قراءات الزيرالينون Zearalenone بواسطة جهاز ELISA READER حيث أثبت من خلال هذا البحث أن فطر F. oxysporum يعد من الفطريات المفرزة لسم الزيرالينون Zearalenone.

الكلمات المفتاحية: البصل – فطر Fusarium oxysporum – سم الزيرالينونZearalenone – جهاز ELISA READER.

المقدمة

يتعرض النبات لمهاجمة مسببات مرضية متنوعة مما يؤدي لإصابته بالعديد من الأمراض التي تؤثر على إنتاج وجودة المحاصيل كما أن الأمراض النباتية تؤثر بالضرر على نوع وكمية المنتوج من المحاصيل الزراعية أو الحقلية والتي تعد المصدر الرئيسي لغذاء الإنسان وكذلك كسائه , حيث يؤثر على تلك المحاصيل من فترات الزراعة حتى الحصاد , وأيضا أثناء نقلها إلى المستهلك وتخزينها إلى حين وصولها إليه [3] , وقد أدت الإصابات الشديدة بالأمراض إلى شح الغذاء وحدوث المجاعات على مدى فترات مختلفة من التاريخ , ومنذ معرفة الإنسان الزراعة وحتى العصور الحديثة, يتضح أن الأمراض النباتية لها دور كبير في حرمان الإنسان من غذائه [9] , وتتعرض جميع محاصيل الخضر والفاكهة والزينة في مختلف أطوار نموها إلى كثير من الأمراض التي تحدث بها خسائر تؤثر على الإنتاج كما وكيفا وقد أجريت العديد من الدراسات على المشاكل التي تتعرض لها المحاصيل الزراعية والمتسببة عن الإصابة بالأمراض والآفات [2] من تلك المحاصيل نبات البصل Allium cepa الذي يتبع العائلة الثومية Alliaceae [4] ويعتبر البصل من محاصيل الخضر الهامة في ليبيا ومن أهم الأمراض الفطرية التي تصيب نبات البصل مرض العفن القاعدي (الفيوزاريومي) الذي يسببه الفطر Fusarium oxysporum f . cepae (Sacc.) Sayd. Hasson [2]، يعد البصل من النباتات التصديرية الهامة[12] . بعض الفطريات الممرضة الموجودة في التربة من الممرضات التي تلحق ضررا بالغا بالمحاصيل المزروعة مثل .Fusarium spp ويسبب تعفن العديد من النباتات الاقتصادية مثل الباذنجان والطماطم وغيرها [7] , حيث يمضي الفطر .Fusarium spp مدته بين موسمين بشكل أبواغ كلاميدية في التربة أو جراثيم كونيدية على مخلفات العائل المصاب حيث يكونان مصدر الإصابة الأولية [1], يعد جنس ال Fusarium من الأجناس الفطرية المهمة اقتصاديا حيث يضم العديد من الأنواع الممرضة للإنسان والحيوان والنبات , إذ ينتشر في التربة الحقلية [17]أو البقايا النباتية بصورة رمية [23] أو داخل الأنسجة النباتية [33], حيث سجلت حالات مرضية في الإنسان قبل عام1900 أي في نهايات القرن التاسع عشر عرف فيما بعد بمـــرض الوكيا المعوي Alimentry Toxic Aleukia في الاتحاد السوفيتي السابق في مقاطعة أوربيرج وأنتشر خلال الفترة 1942-1948م أدى إلى إصابة 60% من السكان ووفاة 10%من المصابين في المقاطعة نتيجة غذاء ملـــــوث بالفطر .Fusarium spp وتمثلت أعراضهُ بتقرحات جلدية ونزف دموي، وتحطم نخاع العظم ، وخفض في الكريات البيض ، وتقرحـــات في الجهاز الهضمي [15]. يعد الفطر Fusarium oxysporum من الفطريات الممرضة التي تصيب النباتات من خلال الجذور في جميع مراحل نمو النباتات مسببا خسائر اقتصادية كبيرة وذلك بظهور تنخر وذبول في معظم المحاصيل النباتية [32], حيث يعد الذبول الفيوزاريومي من الأمراض الخطرة التي تصيب النبات في جميع مراحل نموه وعند مختلف الظروف . حيث تظهر الإصابة على البادرات مسببة ذبولها أو موتها بالإضافة إلى النباتات الكبيرة مسببة لها الذبول ويتطفل الفطر أيضا على جذور النباتات مسببا تعفنها ومن ثم تموت [5،29].

السموم الفطرية(Mycotoxin)

السموم الفطرية هي مواد كيميائية سامة تنتجها أنواع فطرية مثل

Penicillium و Fusarium, Alternaria , Aspergillus

وهي إما سامة للنبات أو ضارة بصحة الإنسان والحيوان [37]. تنتج السموم الفطرية بواسطة بعض الأعفان Mold التي تنمو بنشاط وليس كل الأعفان تنتج السموم وأن الأعفان التي تنتج السموم لا تنتجه إلا في ظروف خاصة كما أن ليس وجود العفن السام دليل على وجود السم والعكس صحيح أي ليس عدم وجود الفطر دليل على عدم وجود السم [25]. إن الظروف التي يحتاجها العفن للنمو وإنتاج السم الفطري تعتمد على نوع وجنس الفطر نفسه ولكن بصورة عامة تعتمد على وجود سبورات الفطر نفسه ومادة عضوية ينمو عليها ومستوي معين من الرطوبة والحرارة والأكسجين والحموضة [24], قد يكون التسمم الفطري أولي أي من تناول السم الفطري مباشرة أو يكون التسمم الفطري ثانوي ويتولد من تناول متبقيات السموم الفطرية كنواتج الحيوانات التي

تغذت على الفطريات مثل اللبن واللحم والبيض والدهن . السموم الفطرية مركبات منخفضة الأوزان الجزيئة بين 100_697 دالتون عديمة الـ Antigenأي لا تؤدي إلي تفاعلات مناعية في الكائنات الحية لبناء أجسام مضادة للسموم ولا توجد فوارق فاصلة بين السموم الفطرية والمضادات الحيوية . وبلغ عدد السموم الفطرية التي اكتشفت حتي عام 1988 حوالي 1000 مركب ، وتنقسم السموم الفطرية من حيث شدة تأثيرها إلى ثلاث مجاميع : حادة وتحت الحادة والمزمنة ويقصد بالحادة هي التي تحدث نتيجة تناول كميات كبيرة من السم في فترة قصيرة ويقصد بالمزمنة هي تناول كميات قليلة من السم لفترات طويلة وتتميز الأعراض المرضية لكل سم حاد عن غير الحاد, ويعتبر حدوث التسمم الحاد نادر الحدوث لأن الغذاء شديد التلوث يكون ملونا بلون الفطر وله رائحة عفنة لذلك يعتبر التسمم المزمن هو الأكثر حدوثا والأكثر خطورة لتمكن الأعراض من الجسم وصعوبة تشخيصها وتداخل صورتها مع أعراض أمراض أخري مثل الدوخة، عدم التركيز، الإجهاد ، والخوف والرعب والكآبة ونزف الأنف واضطرابات الدورة الدموية و ألم العمود الفقري والحساسية وصعوبة التنفس والطفح الجلدي بالرأس والوجه وحساسية الصدر وتزداد هذه الأعراض صعوبة عندما يتداخل تأثير سمين للفطريات .ومن أشهر السموم الفطرية [20،21]:

Aflatoxin, Ochratoxin, Trichothecenes Zearalenone, Deoxynivalenole, Diacetoxyscirpenol, Citrinin, Sterigmatocystin , Patulin , Cyclopiazonic acid, Fumonisin.

أنواع السموم الفطرية تبعا لشدتها :

أ. *Acute Mycotoxicosis التسمم الميكوتوكسيني الحاد:*

يحدث هذا التسمم عند استهلاك كميات كبيرة من السموم الفطرية في الغذاء وتظهر الأعراض تبعا لنوع السم ، ويعتبر التسمم الحاد غير عكسي أي لا تعود الحيوانات إلي حالتها الطبيعية برفع الغذاء الملوث بالميكو توكسين واستبداله بآخر سليم ,وذلك لأن السم قد أحدث التأثيرات على الأجهزة والأعضاء في جسم الكائن الحي والتي من الممكن أن تكون عميقة في التركيب التشريحي والفسيولوجي والذي من الممكن أن يؤدي إلي خلل في دورها الوظيفي ومن الأعراض التي ممكن أن يسببها التسمم هي النبض السريع ، التنفس السريع ، التقيؤ، الإسهال، الرعشة، التشنج، الحساسية أو الموت السريع ومن الميكوتوكسينات المعروفة والمسئولة عن التسمم الميكوتوكسيني الحاد هي :

1. سموم الأفلاتوكسين Aflatoxin وتحدث التسمم الأفلاتوكسيني Aflatoxicosisوينتجها الفطر Aspergillus
2 . سموم Trichothecen وتحدث التسمم التريكوثيكسيني Trichothecenetoxisis وينتجها الفطر Trichothecen sp
3. سموم الزيرالينونZearalenone وتحدث التسمم الزيرالينوني Zearalenonetoxisis وينتجها الفطر Fusarium .

ب. *التسمم الميكوتوكسيني المزمن Chronic Mycotoxicosis:*

ويمثل هذا النوع من التسمم المشكلة الحقيقية في سموم الفطريات وذلك لأن وجود كميات كبيرة من السموم في الأغذية يغير لونها ورائحتها وطعمها مما يجعل الإنسان أو الحيوان لا يتقبلها أما هذا النوع من التسمم وهو تعاطي السموم بكميات قليلة ولكن لفترات طويلة مما يسبب ظهور بعض الأعراض المرضية علي الإنسان أو الحيوان وهي : 1 - ضعف في النمو وخسران الوزن . 2 -التعب السريع والوهن والدوخة وعدم التركيز . 3 - التأثير على بعض مكونات الجسم خاصة الدم من ناحية مكونات وأنشطة الأنزيمات فيه والفترة اللازمة للتجلط . ومع هذا فإن التقسيم الرئيسي والأساسي للسموم الفطرية هو على أساس الفطريات التي تنتج هذه السموم [8].

تأثير السموم الفطرية على النباتات

إن الخلية النباتية عبارة عن جهاز معقد وإن العمليات البايوكيميائية التي تحدث في الخلية النباتية تجري بانتظام وأن أي خلل في هذه العمليات يؤدي إلي خلل في العمليات الفسيولوجية أي نشوء مرض ممكن أن يؤدي إلي موت النبات وهذا الخلل يحدث في النبات إما نتيجة هجوم كائنات حية تتطفل على النبات أو نتيجة ظروف بيئية غير مساعدة أو نتيجة السموم التي تفرزها الفطريات . إن السموم الفطرية التي تفرز في الوسط الغذائي أو في النباتات التي تعيش فيها الفطريات تؤثر على النباتات حتي ولو كانت بتراكيز قليلة جدا حيث من الممكن أن تلتصق بمواقع خاصة وتؤثر على النبات أو تؤثر مباشرة على كلوروبلاست الخلية الحية في النبات أو تؤثر على قابلية الغشاء على الاختيارية في خروج ودخول الماء والمواد الغذائية أو إيقاف عمل بعض الإنزيمات وبعض السموم تحفز على إيقاف العمليات الفسيولوجية التي يقوم بها النبات وتؤدي إلي إيقاف نمو النبات أو تؤدي إلي أضرار خطيرة وربما موت النبات . هناك بعض السموم الفطرية تؤثر على مدي واسع من النباتات والبعض الآخر يؤثر على بعض أنواع النباتات ولا يكون مؤذي للأنواع الأخرى ومن السموم التي تؤثر على النباتات فيوزريل توكسين Fusarial toxin [10].

التسمم الفيوزارمي Fusarium Toxin : وينتج هذا السم بواسطة الفطر Fusarium sp ويعتبر الفطر فيوزاريوم من فطريات الحقل ثم ينتقل إلي المخازن على المحاصيل المصابة بهذا الفطر والذي يصيب الثمار والحبوب بصورة عامة وخاصة الذرة وعند توفر الظروف المحيطة لإنتاج السموم ينتج هذا الفطر السموم على المحاصيل المصابة [19], والسموم الفطرية التي يفرزها جنس Fusarium :

Fumonisin, Trichothecenes Toxin , Zearalenone , Zeranol (ZAL – alpha), Moniliformin, Beauvericin Fusaric acid[13, 15, 18 , 22, 27 , 28 , 30 , 31, 35]

سم الـ Zearalenone (ZEA) : ينتج هذا السم من قبل أنواع من الفطريات

F.crookwellens و . culmorum. F, F.graminearum الرمز الكيميائي للسم C18H22O5 والوزن الجزيئي 318.36 دالتون ودرجة انصهار المركب 159_163 درجة مئوية [35]. يتألق السم بلون أزرق مخضر عند تعريضه للأشعة فوق البنفسجية على صفائح الـ , TLC يذوب السم بكميات قليلة في مذيب الهكسان ويذوب بنسبة أعلي بالبنزين ,وهو ذائب في أسيتون نايتريل والميثانول والإيثانول والأسيتون , ويمكن لسم الـ ZEAأن يمتص عبر الجلد إذا حصل تلامس مباشر معه . ويتواجد السم ملوثا لمحاصيل الحبوب كالذرة الصفراء والبيضاء والقمح والشعير والشوفان والأرز . السم يؤدي إلي استجابات عالية لهرمون الأستروجين الأنثوي للبائن ,وينعكس تأثيره على الجهاز التناسلي إذ يؤدي إلي تضخمها بشكل غير طبيعي إضافة إلي انخفاض نسبة الإخصاب في حيوانات الحقل التي تتغذي على علاف ملوثة بهذا السم ,وتأثيرات أخري كضعف في الجهاز المناعي وله تأثيرات مطفرة ويؤثر في الكبد, كما يحفز السم ظاهرة الموت المبرمج في خلايا الأنسجة الحية من خلال تأثيره على عضيات المايتوكندريا التي بدورها تنتج عوامل محفزة لظاهرة الموت المبرمج في الخلية [13 , 18 , 22 , 35.]

أهداف البحث :

نظرا لمحدودية الدراسات حول هذا الموضوع فقد هدفت هذه الدراسة إلى : 1 – عزل وتعريف الفطر Fusarium oxysporum.

2- التعرف على أن الفطر F. oxysporum من الفطريات المفرزة لسم الزيرالينون Zearalenone
3- تقييم سم الزيرالينون Zearalenone المفرز من الفطر F. oxysporum

المواد وطرق البحثMaterials and methods

أ - الأوساط الغذائية

الأوساط الغذائية التي استعملت في هذه الدراسة :

1. الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar (PDA)
2. الوسط الغذائي Nutrient Broth (NB)

ب - جمع العينات

شملت الدراسة 50 عينة لكل عينة ثلاث مكررات جمعت من عدة مناطق بمدينة مصراتة تمثلت في (الدافنية , طمينة , زاوية المحجوب , الغيران, قزير ,الجزيرة , مصراتة المركز , رأس الطوبة , الزروق و قصر أحمد) في الفترة الزمنية الممتدة من (يونيو_نوفمبر2018 م) ثم وضعت العينات تحت الظروف المناسبة لحدوث الإصابة الفطرية لمدة أسبوعين , ثم عزل الفطر من الجزء القاعدي (السوق القرصية والجذور العرضية الليفية).

ج - عزل الفطر

جلبت العينات التي ظهرت عليها أعراض المرض لمعمل علم النبات , كلية العلوم مصراتة وتم عزل الفطر المسبب للمرض منها بالطريقة التالية

1- انتخبت الأبصال المصابة بالمرض وتم تعقيمها سطحيا وذلك بمسحها بقطع من القطن مرطبة بالكحول الإثيلي تركيز 75 % ثم عمل في كل منها مقطع طولي في منطقة الإصابة بواسطة سكين تشريح معقمة.

2- في ظروف معملية وقرب اللهب أخذت قطع صغيرة من نسيج البصل ومن تحت منطقة الإصابة مباشرة (السوق القرصية – الجذور الليفية) بواسطة إبرة نقل معقمة وزرعت في أطباق بتري قطر 9سم حاوية على الوسط الغذائي (PDA) بحيث وضع في كل طبق ثلاث قطع ولقد خصص لكل عينة ثلاثة أطباق بعد ذلك وضعت الأطباق في الحضان الكهربائي على درجة حرارة 28 ± 2°م.

3- بعد نمو الفطر وتكوين جراثيمه استخرجت الأطباق من الحضان [6] واعتمدت التراكيب المجهرية التي ينتجها الفطر F. oxysporumالخصائص المظهرية والمجهرية والمزرعية في تشخيص هذا الفطر[11] ,حيث تشمل الخصائص المظهرية لون المستعمرة وحوافها , أما المجهرية فتشمل شكل الخيط الفطري والحامل الكونيدي حيث يشكل الفطر حوامل كونيدية بسيطة وقصيرة أو غير متميزة بشكل جيد عن الخيوط الفطرية بحيث يحمل كتل الأبواغ على قممها الأبواغ الفياليدية الكونيدية شفافة وهي نوعان هما الأبواغ الكونيدية الكبيرة هلالية الشكل وهي متعددة الخلايا والأبواغ الكونيدية الصغيرة متطاولة بيضاوية أحادية الخلايا [16] وفحصت بواسطة المجهر الضوئي وبقوى تكبير مختلفة. ينتج الفطر الأنواع الثلاثة من الأبواغ فوق المستنبتات الغذائية في المختبر وكذلك في التربة والأبواغ الكلاميدية هي التي تحافظ على بقاء الفطر في التربة في الظروف غير الملائمة لعدة سنوات محدثة الإصابة الأولية [14 ,34], كما يمكن استخدام أوساط زراعية انتقائية معينة لهذا الغرض مثل وسط selective Fusarium oxysporum [11] . قد تتباين أنواع ال Fusariumفي إنتاج الأبواغ الثلاثة Macroconidia ,Microconidia, و Chalmydospores لكن خصائص الأبواغ الكونيدية الكبيرة تعد سمة مهمة في تصنيف الفطر[26].

4- ولأجل إجراء الدراسة عليه فقد أعيد عزل الفطر F..oxysporum من الأطباق وذلك بأخذ قطع صغيرة من الآجار تحتوي على ميسليوم الفطر وزرعها في أنابيب اختبار حاوية على الوسط الغذائي(PDA) ثم وضعها في الحضان الكهربائي على نفس درجة الحرارة وبعد اكتمال نمو الفطر استخرجت الأنابيب ووضعت في الثلاجة[6] .الفطر الفيوزاريوم Fusarium sp .جنس فطري من ساكنات التربة عالمي الانتشار يتبع فصيلة Tuberculariaceae التابعة لرتبة Moniliales من صف الفطور الناقصة Deuteromycetes أما الطور الجنسي لغالبية أنواعه فيتبع الجنس Gibbrella وبعضها للجنس Necteriaالتابعين لرتبة Hypocreales من صف الفطور الزقية .Ascomycetes [14،34].

د - التحليل الاحصائي والبرنامج الاحصائي

استخدم في هذا البحث التحليل الاحصائي معامل الارتباط بيرسون (البرنامج SPSS 19).

تحضير راشح الفطرoxysporum . F

حضر الوسط الغذائي السائل (NB) ووزع في دوارق مخروطية حجمها 500مل بمعدل 200 مل/دورق وعقم في جهاز التعقيم في درجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة , وبعد انتهاء التعقيم و انخفاض درجة الحرارة , وزع الوسط في أنابيب اختبار معقمة ذات غطاء و لقحت الأنابيب بعينات مأخوذة من الأطباق التي نما فيها الفطر بصورة نقية بواسطة القاطع الفليني ووضع كل قرص في أنبوبة , ثم حضنت جميع الأنابيب في الحاضنة تحت درجة حرارة 28±2ºم لمدة7 أيام وبعد انتهاء فترة التحضين رشحت مزارع الفطر خلال ورقة ترشيح حجمها mm Q185ونوعهاno1Whatman ودورق و قمع واستعمل الراشح للكشف عن سم الزيرالينون وقياس وزن المرشح الرطب والجاف.

قياس الوزن الرطب للنمو الفطري:

بعد اخذ وزن ورقة الترشيح على الميزان الحساس تم وضع النمو الفطري على ورقة ترشيح معلومة الوزن وسجل وزن النمو الفطري . تم حساب الوزن الرطب كالتالي : الوزن الرطب =(وزن ورقة الترشيح + وزن النمو الفطري)- وزن ورقة الترشيح , ثم سجلت قراءة الوزن.

قياس الوزن الجاف للنمو الفطري:

تم وضع النمو الفطري الذي سبق وزنه في طبق بتري زجاجي في فرن درجة حرارته 65 ولمدة ساعتين. تم حساب الوزن الجاف للفطر كالتالي : الوزن الجاف =(وزن ورقة الترشيح +وزن النمو الفطري)- وزن ورقة الترشيح , ثم سجلت قراءة الوزن .

طريقة الكشف عن سم الزيرالينونZearalenone

نفذت هذه العملية بواسطة خطوتين :

أ – تحضير العينة : ونفذت هذه التجربة بإتباع ما يلي :

1- أخذ µ l 600 من الراشح بواسطة Pipetteفي أنابيب خاصة ذات غطاء .

2- إضافة µ l 100 من ال Bufffer يأتي مع الكيت الخاص بالاختبار على µ l 600 من الراشح في الأنابيب مع الرج البسيط لضمان تجانس المحلول مع بعض .

ب – الحقن : ونفذت هذه التجربة بإتباع مايلي :

1- إدراج 56 من ال microtiter wells في microwell holder, 6 standards و50 للراشح الفطري .

2- إضافة µ l 50 من standard solution و الراشح الفطري

3- إضافة µ l 50 من الأنزيم enzyme conjugate المخفف لكل well تخلط بواسطة تحريك microwell holder بلطف يدويا ثم تحضن في الظلام لمدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة (20 - 25°م) (68 - 77 .(°F

4- للتخلص من السائل يوضع microwell holder مقلوبا في جهاز الغسيل Biotic و يطرق microwell holder على ورق ماص للتأكد من إزالة السائل و جفاف العينة , تعاد هذه العملية ثلاث مرات , ثم يضاف µ l 250 من الماء المقطر إلى

ال wells ثم يصب السائل خارجا مرة أخرى وتكرر عملية الغسيل مرتان .

5- إضافة 50 µ l من ال substrate و 50 µ l من chromogen لكل well تخلط بواسطة تحريك microwell aholder بلطف يدويا ثم تحضن لمدة نصف ساعة في الظلام بدرجة حرارة الغرفة (20 - 25°م) (68 - 77 °F)

6- إضافة 100 µ l من ال stop solution لكل well تخلط بواسطة تحريك microwell holder بلطف يدويا وتؤخذ القراءات خلال نصف ساعة بعد إضافة stop solution بواسطة جهاز ELISA READER .

النتائج و المناقشة Results and Discussion

في هذا البحث تم عزل الفطر Fusarium oxysporum من السوق القرصية والجذور العرضية الليفية لنبات البصل بصورة نقية وتنميته على الوسط الغذائي الصلب (PDA) شكل (1, 2 و3) حيث أظهرت نتائج البحث الخصائص المظهرية والمجهرية لفطر F. oxysporum من لون المستعمرة الفطرية الأبيض وشكلها القطني , ميسليوم الفطر المقسم والجراثيم المميزة لجنس ال Fusarium وهذه النتائج تتفق مع [2 , 11] .

ثم تنمية F. Oxysporum في الوسط الغذائي السائل (NB) ومن ثم ترشيحه حيث استخدم المرشح وهو النمو الفطري لمعرفة الوزن الرطب و الوزن الجاف جدول (1) , واستخدم الراشح للكشف عن سم الزيرالينون جدول (1) ومدى العلاقة بين الوزن الرطب والجاف وسم ال Zearalenone حيث أظهرت نتائج التحليل الاحصائي لهذا البحث أن القيم كانت معنوية عند 5% (P _value=0.000) جدول (2 و3) وشكل(4 و5) .

أثبتت نتائج هذا البحث أن الفطر F. oxysporum يفرز سم الزيرالينون وهذه النتائج تتفق مع [15 , 18 , 22 , 27 , 28 , 30 , 31] حيث أثبتت دراساتهم أن جنس ال Fusarium له القدرة علي إنتاج العديد من المواد الأيضية الثانوية من ضمنها سم Zearalenone كما تتفق نتائج البحث مع [15] حيث أشار على أن جنس ال Fusarium هو أحد الأجناس التي تمتاز بقدرتها على إنتاج السموم الفطرية بتراكيز عالية والعيش في بيئات متنوعة ومتطلبات نمو بسيطة . كما اتفقت هذه النتائج مع [35] حيث أثبت أن سم الزيرالينون يتم إفرازه من قبل أنواع فطرية من جنس ال Fusarium. تصل السموم الفطرية إلي طعام الإنسان والحيوان إما بصورة مباشرة عن طريق تلوث الغذاء بالفطريات المنتجة للسموم حيث تشجع المادة الغذائية نمو الفطر سواء أثناء مراحل الإنتاج المختلفة أو أثناء نقلها وفي فترة التخزين أو قد يكون التلوث غير مباشر نتيجة تلوث مكونات المادة الغذائية بالسم الفطري ويكون ذلك بتغذية الإنسان على منتجات حيوانية ناتجة من حيوانات سبق تغذيتها على أعلاف ملوثة بالسموم الفطرية وهو الأكثر خطورة ويمكن أن تنتج هذه السموم في الحقل قبل الحصاد أو أثناء التخزين ونتيجة لنمو الفطريات فيها تقوم بعمليات التمثيل الغذائي وتنتج السموم الفطرية حيث يزداد معدل نموها بتوفير الظروف البيئة المناسبة مثل الرطوبة والحرارة وظروف التخزين الرديئة وكذلك حدوث أضرار ميكانيكية عند جني المحصول أو عند نقله من مكان إلى آخر [36] .

الزيرالينون سم استروجيني يتم تخليقه بيولوجيا عن طريق مسار Polyketide pathway من قبل مجموعة من فطريات جنس Fusariumأشهرها F. culmarum , F . graminearum , F. equiseti و F.semitectum والتي تعد من فطريات التربة الشائعة التواجد في البلدان الدافئة والتي تهاجم المحاصيل وتسبب تلوثها في العديد من مناطق العالم [35] .

جدول (1) المتوسط والانحراف المعياري للوزن الرطب والوزن الجاف للفطر F. oxysporum وسم الزيرالينون .

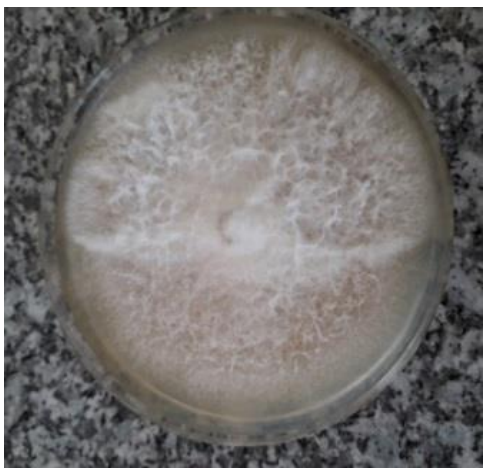
	N	Min	Max	المتوسط	الانحراف المعياري
الوزن الرطب	50	37.99	49.88	43. 56	3.15
الوزن الجاف	50	30.69	48.57	42.09	3. 52
الزيرالينون (Ppt)	50	35.87	4630. 4	3957.4	881 ,9

جدول (2) علاقة الوزن الرطب للفطر F. oxysporum بقيم سم الزيرالينون .

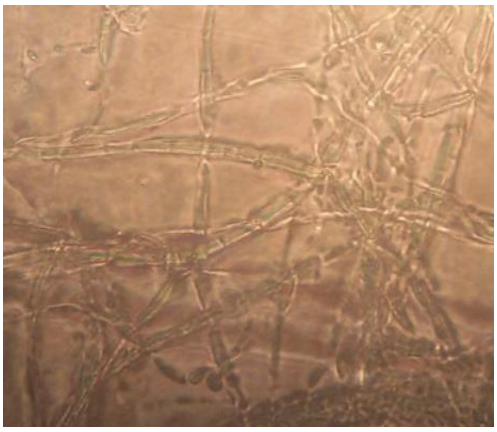
		الوزن الرطب	الزيرالينن
الوزن الرطب	Pearson Correlation P-value	1	.594** .000
الزيرالينون (Ppt)	Pearson Correlation P-value	.594** .000	1

جدول (3) علاقة الوزن الجاف للفطر F. oxysporum بقيم سم الزيرالينون .

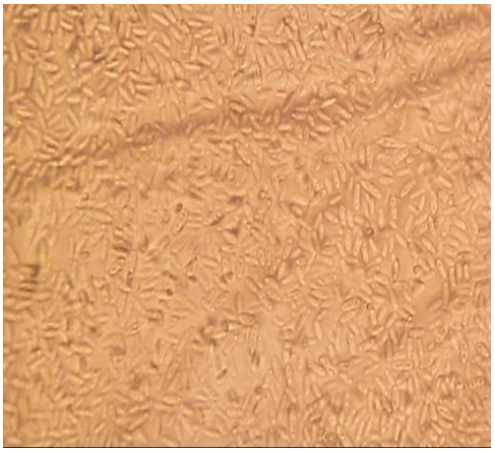
		الوزن الجاف	الزيرالينون
الوزن الجاف	Pearson Correlation P-value	1	.571** .000
الزيرالينون (Ppt)	Pearson Correlation P-value	.571** .000	1



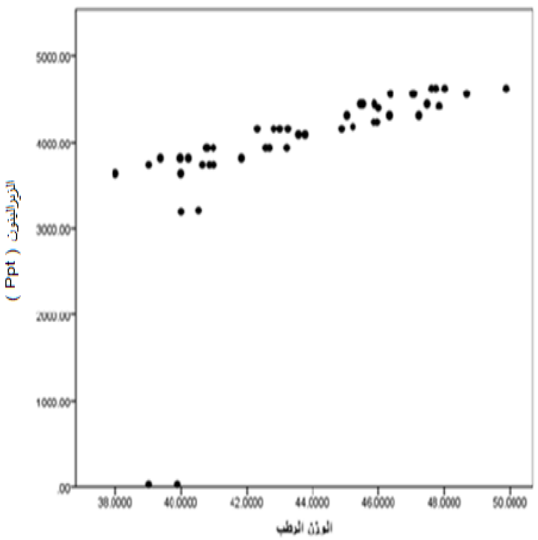
شكل (1) الفطر F.oxysporum النامي في الوسط الغذائي PDA بدرجة حرارة28 ±2°م ولمدة سبعة أيام .



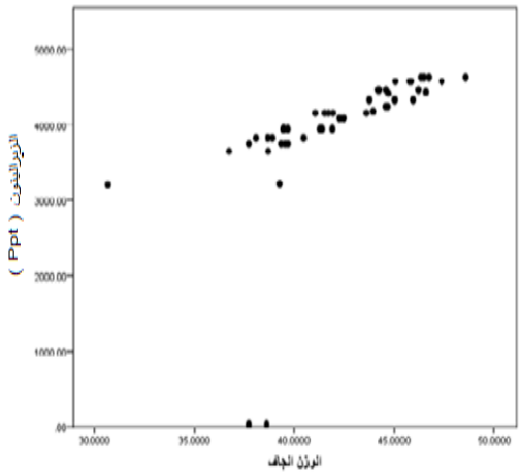
شكل (2) ميسيليوم الفطر F.oxysporum .



شكل (3) جراثيم الفطر F.oxysporum .



شكل (4) علاقة وزن الرطب لفطر F. oxysporum بقيم سم الزيرالينون .



شكل (5) علاقة الوزن الجاف للفطر F. oxysporum بقيم سم الزيرالينون .

المراجع العربية

1 - ديوان, مجيد والبهادلي, علي (1985) أمراض النبات. مؤسسة المعاهد الفنية, ص (344) بغداد, العراق.

2 - أبوغنية , عبد النبي (1986) أمراض المحاصيل البستانية . جامعة طرابلس , طرابلس , ليبيا .

3 - روبرتس, دانيال.(1988) اساسيات امراض النبات. الطبعة الثانية , الدار العربية للنشر والتوزيع , القاهرة, ص (11).

4 - *القاضي , عبدالله و بشينة, صفية (1989) استعمالات بعض النباتات في الطب الشعبي الليبي . الطبعة الثالثة , الجزء الأول , دار الكتب الوطنية , بنغازي ,ليبيا.*

5 - ديوان ,مجيد (1994) تقدير الكثافة العددية للفطريات المرضية وغير المرضية لجذور الطماطم , مجلة البصرة للعلوم الزراعية , ص (32_39).

6 - أبوجناح , فتحية (1999) بعض الدراسات على الفطر Alternaria solani المسبب لمرض اللفحة المبكرة على الطماطم . رسالة ماجستير, جامعة مصراتة , مصراتة , ليبيا .

7 - جابر, جبار؛ طه, عبد الرضا و سعدون وعبد الامير سليم (2001) دراسة حقلية ومختبرية لمسح أمراض محاصيل الخضر في محافظة القادسية . مجلة القادسية , المجلد (1) , العدد(2).ص (47_58) .

8 - الهايشة, محمود (2006) أنواع التسمم الميكوتوكسيني . الطب والعلوم, ص (2_5).

9 - علي ,محمد (2010) تاريخ أمراض النباتات وأثرها في حياة البشر . دار الزهراء , ص(5) , الرياض , السعودية .

10 - نخيلاني, مجيد (2011) السموم الفطرية . دار دجلة , عمان , ص (183_219).

11- كاظم , سارة والجنابي , جواد (2013) دراسة الخصائص المظهرية والمجهرية لأنواع الفطر Fusarium oxysporum وتأثير الظروف البيئية في نموه وتكاثره . كلية العلوم , قسم علوم الحياة , جامعة بابل, مجلة جامعة بابل , العلوم الصرفة والتطبيقية , العدد (2)،المجلد (11) . بابل , العراق

12- أبورداحة ,رمضان (2014) زراعة وإنتاج البصل .المركز الوطني للبحث والإرشاد الزراعي , ص (2) , المملكة الاردنية الهاشمية .

13 - إسماعيل, نجم (2014) السموم الفطرية النظرية والمفهوم العام . قسم وقاية النبات , كلية الزراعة , جامعة بغداد , ص (73_100) , بغداد , العراق .

14 - محمد طويل ومطيع , عفراء (2014) دراسة تأثير عزلات فطرية في الخصائص الحيوية للفطر Fusarium oxysporum (Schl مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية , سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (36) , العدد (5) , دمشق , سوريا .

15 – حسون , زهراء, حمد , زهراء , شلي , زهراء , كريم , شمران , فرحان , زهراء عبد الأمير (2019) التحري عن وجود الفطريات المنتجة للسموم في عينات من الأعشاب الطبية في مدينة النجف . دبلوم في صحة مجتمع , قسم صحة مجتمع و المعهد التقني , القادسية , العراق .

المراجع الانجليزية

16 - Watanabe, T. (1975) Fungi isolated from the underground parts of sugarcane in relation to the poor rationing in Taiwan. Trans. Mycol. Soc. Jpn. 16:264–267. Citedin: Watanabe, T. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi : Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2nd edition.506. 2002.

17- Burgess, L., Dodman, R., Pont, W. and Mayers, P. (1981) Fusarium Diseases of wheat, maize and grain. In Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, RJ. (Eds.), *Fusarium* : Diseases, biology and taxonomy. Pennsylvania State University Press ,University Park, Pennsulvania, pp.64_76.

18 - Cullen, D., Caldwell, R. and Smalley, E. B. (1982) Cultural characteristics, pathogenicity, and Zearalenone production by strains of *Gibberella zeae* isolated from corn. Phytopathology. 72: 1415_1418.

19- Joffe, A.,(1986) *Fusarium* species Their Biology and Toxicology.

20 – Hesseltin, C. (1986) Global significance of mycotoxins .In Mycotoxins and Phycotoxines . Eds Steyn&Vleggaar.Elsevier Scientific Publishing Co .Amsterdam.

21 - Gelderblom, W.C et al (1988) Fumonisins Novel mycotoxins With cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*.

22 - Mirocha, C. , Abbas, h. Windels, C. and Xie , W. (1989) Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol , and Zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates . Appl. Environ. Microbiol. 55:1315_1316.

23 - Rheeder, J., Ven Wyk, P. and Marasas, W O.(1990) *Fusarium* species from Marion and Prince Edward Islands: sup-Antarctic. S. African Journal Botany 56:482_486.

24 – Moss,M .(1991) The environmental factors controlling mycotoxin formation . IN Mycotoins and Animal food . (Eds) smith & Henderson.

25 – Wyatt, R. (1991) Measurement of mold Growth and mycotoxins in feed ;Fallacies and innovations. IN Proceeding s1991 Georgia Nutrition conference. UNI. OF Georgia. Athens.

26 - Nelson ,P., Dignani, M . and Anaissie, E . (1994) Taxonomy , Biology, and Clinical aspect of *Fusarium* species . Clinical Microbiology Review 7 : 479 – 504 .

27 - Ritieni, A., Fogliano, V. Randozzo, G. Scarallo, A. Logrieco, A. Moretti, A. Mannina, L. and Bottalico, A. (1995) Isolation and characterization of fusaproliferin , a new toxic metabolite from *Fusarium proliferatum* . Nat. Toxins, 3:17_20.

28 - Leslie, J., Marasas, W. , Shephard, G., Sydenham, E., Stockenstrm, S. and Thiel, P. (1996) Duckling toxicity and the popuctions of Fumonisin Moniliformin by isolates in the A and F mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) Appliad Environmental Microbiology. 62: 1182_1187.

29 - Decal, A Pascual, S. and Melyarejo, P. (1997) Infectivity at *chlamydospores vs miciococonidia of lycopersici on tomato Fusarium oxysporum f.sp.*. Phytopathology.145: 231_233.

30 - Logrieco, A. Castella, G. Kostecki , M. Golinski, P. Ritieni, A. and Chelkowski, J. (1998) Beauvericin production by *Fusarium* species. Appl. Environ Microbiol.64: 3084_3088.

31 - Marasas, W.(2001) Discovery and occurrence of the Fumonisins a historical perspective. Environ. Health Perspect. 109: 239_243.

32 – Cotxarrera, L.., Trillas-Gay, C. Steinberg and C. Alaabouvette. (2002) Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates *Fusarium* wilt of tomato. Soil Biology and Biochemistry,34:467_476.

33 - Zeller, K., Summerell, B. and Leslie, J. (2003) *Gibberella konza (Fusarium Konzum) sp* . nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 95: 943_954.

34 - Agrios ,G .(2005) Plant pathology . 5th edition . Academic press . Inc : SanDiego,803

35 - Zinedine, A., Soriano, M . Molto, J.C. & Manes, J. (2007) Review on the toxicity ,occurrence, metabolism , detoxification, regulations and intake of Zearalenone; An oestrogenic mycotoxin .Food Chem, toxicol. 45:1_18.

36 - Fung , F(2008).Heaith effects of mycotoxins atoxicologicalover view toxicol.42:217_234.

37 - Lashimpriya , P ., Jastyna , L . & Lukasz , S . (2019) Fusarium – Produced Mycotoxins in Plant- Pathogen Interaction. Toxins,11:664.

Detection of the mycotoxin Zearalenone from the filtrate of *Fusarium oxysporum* isolated from onions

Fathia Mohamed Abu-Janah
Biology Department , Botany , Faculty of science Misurata university , Misurata , libya

Abstract: In this research, samples of onions were collected from several areas in the city of Misurata, represented in Al-Dafniyah, Tomina, Zawiat Al-Mahjoub, Al-Ghiran, Quzir, Al-Jazeera, Misurata Markaz, Ras Al-Toba, Al-Zarrouk and Qasr Ahmed, during the period from June to November 2018. Sampling, which was represented in a kilo of onions from each region, where the number of complete samples was 50 samples, and for each sample the Fusarium oxysporum grew 3 replicates, where the number of dishes was 150 dishes, then the F.oxysporum was isolated From the basal part of the onion plant (discoid stems and fibrous roots) that showed symptoms of the disease, and then grown on solid nutrient medium Potato dextrose agar (PDA) and then grown in test tubes containing liquid Nutrient broth (NB) at 28 ±2"C in order to measure the wet and dry weight of the filter and also for the purpose of detecting the zearalenone toxin from the filtrate. The process of detecting the mycotoxin zearalenone was carried out in two steps. First, the sample was prepared and added 100 µ l of the Bufffer comes with the kit for the test on 600 µ l of the filtrate in special tubes with a cap with simple shaking to ensure the homogeneity of the solution together, Secondly, injection with special materials consisting of a standard solution. enzyme conjugate, substrate, chromogen and stop solution, and zearalenone readings were taken by ELISA READER device, where it was proved through this research that F. oxysporum is one of the fungi that secrete zearalenone toxin.

Keywords: *Onion - Fusarium oxysporum - Zearalenone - ELISA READER.*