الفصل والتقييم الحيوي لتوكسينات عزلات مختلفة لفطر *Alternaria solani* المسببة لمرض اللفحة المبكرة على الطماطم بمنطقة الجبل الأخضر

نوارة علي محمد[1] محمد علي سعيد[1] مجدي جاد الرب السمان[2]

عيسى أبو غرسة[1]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v9i1.486

الملخص

أجريت هذه الدراسة بكلية الزراعة جامعة عمر المختار واستهدفت فصل التوكسينات من عزلات مختلفة لفطر *Alternaria solani* وإجراء التقييم الحيوي لهذه التوكسينات . حيث تم الحصول على سبع عزلات مختلفة لهذا الفطر من مواقع مختلفة بمنطقة الجبل الأخضر وهي (الغريقة ، الوسيطة ، الحنية ، مسة ، الفتائح ، الدبوسية والعويلية) وتم الحصول على بلورات من حمض الألترناريك (Alternaric acid) بحالة نقية من هذه العزلات ، وأظهرت النتائج وجود اختلافات في قدرة العزلات على إنتاج هذا الحمض (التوكسين) والمفصول على TLC ، ولوحظ اختلاف في كمية التوكسين المنتج باختلاف البيئات الغذائية المتفاوتة في إنتاجها للصبغة والمستخدمة في دراسة التوكسينات وأظهرت نتائج عدوى أوراق الطماطم المفصولة بجراثيم الفطر بداية ظهور أعراض البقع الميتة بينما لم تعط التوكسينات المفصولة على TLC سوى أعراض الشحوب وبداية تلون الأوراق بلون أصفر ، كما تبين أن التوكسينات الخام وبعد فصلها على TLC والراشح الفطري تقلل من إنبات بذور الطماطم وطول الجذير مما يدل على عدم تخصيصه التوكسين .

المقدمة

خلايا النبات منظومة معقدة تحدث فيها تفاعلات متكاملة ، هذه التفاعلات تفضي إلى عمليات التعضي المعقدة الأساسية للحياة وإن الاضطراب في أي من هذه التفاعلات الأيضية يسبب خللاً في العمليات الفسيولوجية مؤدياً إلى تكشف المرض ومن بين العوامل التي تحث على مثل هذه الاضطرابات مواد سامة تنتج بواسطة الكائنات الحية الدقيقة الممرضة للنبات والتي تعرف بالتوكسينات .

[1] قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة ، جامعة عمر المختار ، ص.ب. 919 البيضاء – ليبيا .

[2] قسم النبات الزراعي ، جامعة عين شمس ، جمهورية مصر العربية .

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

هـذه التوكسـينات تعمـل كسـموم عامـة للبروتـوبلازم وتـؤثر علـى عـدة أنـواع مـن النباتـات والـبعض الآخـر يكـون سـاماً فقـط علـى قليـل مـن الأنواع النباتية أو الأصناف وغير ضارة إطلاقاً على النباتـات الأخـرى ، ويـؤثر التوكسـين ويسـبب أضـراراً لخلايا العائل أما بواسطة تـأثيره على نفاذية أغشية الخليـة أو بواسـطة تثبيطـه للإنزيمـات وبالتـالي يعـوق التفـاعلات الإنزيميـة المتكاملـة (1969) Walker ، دكسـون (1981) وتشـير الأبحـاث إلى أن الفطـر *Alternaria solani* المسبب لمرض اللفحة المبكرة ينتج توكسين حمض الألترناريك (Alternaric acid) ويمكن الحصول عليه في صورة بلورات ، ولوحظ أن الزيـادة في تركيـز هـذا التوكسـين تسـبب تـدلي وذبـول ومـوت أوراق الطمـاطم (*Lycopersion esculantum* Mill) ، وأن هنـاك اختلافاً واضـحاً بـين العـزلات المختلفـة للفطـر في كميـة إنتـاج هـذا الحمـض El-Samman (1986) كمـا أشـارت العديـد مـن الأبحاث إلى أن هذا التوكسين مضاد فطري اختياري يثبط نمـو بعـض الفطريـات بينمـا أنـواع أخـرى مـن الفطريـات والبكتيريـا لا تتـأثر بـالتركيزات المنخفضـة لهذا التوكسين ، وقد أكدت العديد من الأبحاث أن معاملـة نباتـات الطمـاطم بالتوكسـين تسـبب بقعـاً مشابهة لتلك المنتجة من الطفيل الممرض وأن إنتاج التوكسين يختلف باختلاف العزلة وليس هناك ارتباط بين القـدرة الإمراضية وإنتـاج التوكسـين Langsdorf وآخـرون (1990) كمـا أن هنـاك اختلافـات في الحساسية لهذا التوكسين بين الطماطم والبطاطس والنباتـات الأخـرى الـتي تصـاب بهـذا المـرض . كمـا بينت العديد من الأبحاث النشاط البيولوجي لحمض الألترناريك في نباتات الطماطم ولوحظ تأثيره الحيوي على الاتزان المائي والتنفس والنتح ، ووجد أن هناك زيادة في هذه المسارات مقارنة بالنباتات غير المعاملة Pritchard و Porte (1921) و Chellemi (1995) . وقد أجريت هذه الدراسة بمنطقة الجبل الأخضر وتهدف إلى عزل التوكسين من عـزلات مختلفـة مـن فطـر *Alternaria solani* في منطقة الجبل الأخضر وتقييمها حيوياً .

المواد وطرائق البحث

جمع العينات وعزل المسبب المرض

تم جمـع العـزلات الفطريـة مـن الأجـزاء المصابة من نباتات الطماطم (أوراق وسيقان وثمار) والـتي تظهـر عليهـا أعـراض المـرض مـن مواقـع مختلفـة بمنطقـة الجبـل جـدول (1) وهـي الغريقـة ، الوسـيطة ، الحنيـة ، مسـة ، الدبوسـية ، الفتـائح والعويليـة ، وأعطيت لها الرموز 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 7 على التوالي .

جدول 1 يبين المواقع المختلفة لعزلات الفطر وأجزاء نبات الطماطم المصابة ونوع الزراعة

مكان الجمع	الموقع	رقم العزلة	الجزء النباتي	نوع الزراعة
البيضاء	الغريقة	1	أوراق	الصوبات
	الوسيطة	2	أوراق ، ثمار	الصوبات
	الحنية	3	أوراق ، سيقان ثمار	الحقلية
	مسة	4	ثمار	الحقلية
درنة	الدبوسية	5	أوراق ، ثمار	الحقلية
	الفتائح	6	أوراق ، سيقان ثمار	الصوبات
المرج	العويلية	7	ثمار	الصوبات

لعزل وتعريف المسبب المرضي ، غسلت الأجزاء النباتية المصابة بالماء الجاري للتخلص من التربة والغبار الملوثة لأسطح الأنسجة وقطعت بالمشرط وعقمت بوضعها في 0.2% هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) لمدة دقيقتين ثم غسلت بالماء المعقم ثلاث مرات متتالية وجففت بورق الترشيح ونقلت إلى أطباق بترية محتوية على بيئة أجار مائي وحضنت على درجة حرارة 26 ± 2°م لمدة أربعة أيام . للحصول على عزلات نقية تم استخدام طريقة أجار (PDA) وحضنت على درجة حرارة 25°م . بعد الحصول على عزلات نقية ، تم تعريف الفطر بالاستعانة بصفات الفطر التي ذكرها Barenett و Hunter (1972) و Ellis و Gibson (1975) لتعريف الفطر وأعطي لكل عزلة رمز خاص لسهولة تمييزها .

فصل التوكسينات (استخلاص حمض الألترناريك)

تم معملياً استخلاص توكسين فطر *A. solani* (حمض الألترناريك) باستخدام طريقة Pound و Stahmann (1951) وطريقة Lazarovits و Stoessl (1988) .

طريقة Pound و Stahmann 1951

اتبع في هذه الطريقة تنمية عزلات الفطر المختلفة على البيئة المغذية السائلة Czapek's-Dox Agar التي وصفها Tuite (1969) لمدة 21–30 يوماً وتم ترشيحها خلال ورقة ترشيح وضبط الرقم الهيدروجيني (pH 3.5) بواسطة حمض الخليك ثم أضيف الكلوروفورم بكمية تعادل كمية المترشح الفطري وبعد رجه لمدة 10 دقائق تم ضبط الرقم الهيدروجيني عند (pH 5.5) بالمنظم الفوسفاتي ثم عومل المترشح بالكلورفورم ثلاث مرات متتالية بواسطة أقماع الفصل جمع الرائق في كل مرة ، وبعد

الانتهاء من عملية الفصل ضبط الرقم الهيدروجيني مرة أخرى إلى (pH 3.5) وبعدها فصل مرة أخرى برابع كلوريد الكربون CCl_4 ثم أجريت عملية التطاير إلى أن تم الحصول على فيلم رقيق .

طريقة Lazarovits و Stoessl 1988

تم استخلاص التوكسينات لفطر *A. solani* النامي على بيئات مغذية صلبة Potato Dextrose Agar (PDA) ، TDA ، V-8 juice ، Czapek's Dox-agar ، Pepton glucose agar و Tuite Ritchard (1969) على درجة حرارة 28°م لمدة 7 أيام ومزق الأجار النامية عليه العزلات لقطع صغيرة بواسطة إبرة ووضع في دوارق مخروطية الشكل مع إضافة ما يساوي أربعة أحجام من حجمها بالمذيبات العضوية إيثيل أسيتات والميثانول بنسبة (1 : 1) ورج بالهزاز لمدة 4 ساعات ثم رشح وأضيف إليه حجمان جديدان من المذيبات السابقة وركزت المستخلصات لحجمها الأصلي ، ثم أضيف إليه قطرات من حمض الخليك وتم استخلاصها مرة أخرى بواسطة أقماع الفصل المحتوية على إيثيل أسيتات بمعدل ثلاث مرات متتالية بحجم متساو من المستخلص الأصلي وجمعت المستخلصات وتم تنقيتها بترشيحها فوق كبريتات الصوديوم لنزع الماء وبعد ذلك بخرت المستخلصات للحصول على فيلم رقيق من بلورات التوكسين الذي أذيب في حجم 5 مل من إيثيل أسيتات وحفظ في قنينات داكنة اللون ، صغيرة الحجم في ثلاجة لحين الاستعمال .

بعد الحصول على التوكسين ، أجري الفصل على الصفائح الرقيقة للتحليل الكروماتوجرافي Thin Layer Chromatography (TLC) المطلية بطبقة من السليكا جل (Kiesl gel Gf 254 type 60) باستخدام الماصة الميكرولتيرية تم تنقيط المستخلصات بطريقة Pound و Stahmann (1951) و Lazarovits و Stoessl (1988) بمعدل 50 ميكرولتر على الألواح ووضعت الصفائح في أحواض الفصل المحتوية على مذيبات الفصل وهي (الميثانول : كلورفورم : حمض الخليك) بنسبة (10 : 90 : 1) ثم فحصت الصفائح بالأشعة فوق البنفسجية وقدر معدل السيلان Rate of flow (R*f*) للعزلات والبيئات وكشطت البقع ووضعت في قنينات صغيرة بها إيثانول لإجراء الاختبارات الحيوية .

اختبارات التقييم الحيوي للتوكسينات المفصولة من العزلات المختلفة لفطر *Alternaria solani*

أجريت الاختبارات الحيوية للراشح الفطري للعزلة 4 والتوكسين الخام ولكل معدل سيلان R*f* لتحديد درجة سميتها على إنبات البذور والأوراق المفصولة للطماطم ، صنف Rio-grand .

1- التأثير على إنبات بذور الطماطم صنف Rio-grand

تم وضع 40 بذرة طماطم لصنف Rio-grand لكل تخفيف (10^{-1} ، 10^{-2}) من المترشح الفطري للعزلة 4 وحمض الألترناريك الخام (قبل الفصل على ألواح السيلكا جل) والمتحصل عليه بالطريقتين السابقتين وكل معدل سيلان (R*f*) ناتج من فصل بلورات التوكسين الخام على ألواح السيلكا جل بمعدل 50 ميكرولتر ، حيث توضع البذور في أطباق بترية مائلة وتنقع في التخفيفات وتترك لمدة ساعتين ثم تنقل البذور إلى أطباق بها أوراق ترشيح مبللة لتنميتها على درجة حرارة ±25°م بعد 5 أيام من المعاملة وتحت ظروف رطوبة ملائمة في وجود شاهدين (أحدهما معامل بالماء والآخر معامل بالإيثانول) ، تم قياس نسبة الإنبات وطول الجذير Batchvarova وآخرون (1992) .

2- التأثير على أوراق الطماطم المفصولة صنف Rio-grand

باستخدام كل معدل سيلان مفصول (R*f*) على ألواح السيلكا جل والراشح الفطري للعزلة 4 والتوكسين الخام وكذلك معلق جراثيم العزلات المختلفة للفطر بتركيز 2.5×10^5 جرثومة/مل ، تم الحقن باستخدام الماصة الميكرولتيرية (Micropipette) بمعدل 50 ميكرولتر/ورقة على أوراق مفصولة من نباتات الطماطم سليمة على الشريحة في أطباق بترية معقمة تحتوي على ورق ترشيح بمعدل 5 مكررات/معاملة في وجود شاهدين وتم تسجيل الأعراض بعد 24 ساعة من المعاملة لمدة ثلاثة أيام متتالية .

النتائج

جمع العينات وعزل المسبب المرضي

تم عزل الفطر من العينات النباتية المصابة التي تم جمعها من المناطق المشار إليها سابقاً بالجبل الأخضر ، يبين شكل (1) جراثيم فطر *Alternaria solani* الكونيدية والتي تتميز بأنها بنية داكنة اللون بيضوية الشكل لها منقار طوله مساو لطول جسمها ، بينما يوضح جدول (2) الصفات المورفولوجية والشكلية للجراثيم الكونيدية ، حيث لوحظ أن متوسط أطوال الجراثيم تتراوح ما بين (139.5–177.5) ميكرون ، ومتوسط عرض الجرثومة ما بين (16.1–17.51) ميكرون ، وطول المنقار (54.69–106.30) ميكرون . في حين كان عدد الخلايا في مدى (7.50–10.48) ومتوسط عدد الجدر (022–1.11) للجرثومة .

جدول 1 يوضح تأثير الإصابة بالنوع *M. incognita* على تطور الإصابة بفطر *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* لأصناف الطماطم الثلاثة

	الأصنـــاف											
المعاملات	Special back			Rio grande			Rutgers			المتوسط العام		
الزمن بالأيام	F	F + N	المتوسط	F	F + N	المتوسط	F	F + N	المتوسط	F	F + N	المتوسط
15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
30	19.3	20.6	20.0	16.0	17.3	16.6	2.0	4.6	3.3	12.4	14.2	13.3
45	38.0	55.3	46.6	29.3	43.3	36.3	6.6	20.0	13.3	24.6	39.5	*32.1
60	63.3	78.0	70.6	37.3	66.0	51.6	11.3	34.6	23.0	37.3	59.5	48.4
المتوسط	30.1	38.5	34.3	20.6	31.6	26.1	5.0	14.8	9.9	18.6	28.3	

L.S.D (0.05) بين الأصناف = 1.5

L.S.D (0.05) بين المعاملات = 1.2

L.S.D (0.05) بين الفترات الزمنية = 1.7

التداخل بين الأصناف والمعاملات غير معنوي

L.S.D (0.05) للتداخل بين الأصناف مع الزمن = 3.0

L.S.D (0.05) للتداخل بين المعاملة مع الزمن = 2.4

L.S.D (0.05) للتداخل بين الأصناف والمعاملة والزمن = 4.3

F = *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici*

N + F = *M. incognita* + *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici*

* = متوسط معدل الإصابة

جدول 2 الصفات المورفولوجية للجراثيم الكونيدية لفطر *Alternaria Solani*

العزلات	الصفات المورفولوجية				
	عدد الخلايا	عدد الجذر العرضية	طول الجرثومة (µ)	العرض (µ)	طول المنقار (µ)
1	7.52 e*	0.22 c	168.28 ab	16.86 b	63.10a
2	8.59 d	0.48 b	177.50 a	16.69 b	57.69 a
3	9.38 b	0.27 c	170.10 ab	16.10 c	106.30 a
4	10.48 a	0.94 a	171.10 a	16.31 c	68.30 a
5	8.04 e	0.96 a	139.50 c	16.47 d	54.69 a
6	8.87 c	1.11 a	157.28 bc	16.24 c	65.53 a
7	8.97 c	0.42 b	161.90 b	17.51 a	56.88 a

* متوسط 100 جرثومة / عزلة

- المتوسطات التي لها نفس الحروف للعمود الواحد لا تختلف معنوياً عن بعضها عند مستوى احتمال 5%

شكل 1 الجراثيم الكونيدية لفطر *Alternaria solani* ذات المنقار الطويل

دراسات على توكسينات فطر *Alternaria solani*

فصل التوكسينات (استخلاص حمض الألترناريك)

توضح النتائج المبينة بجدول (3) وجود اختلافات في معدل إنتاج التوكسين ما بين عزلات فطر *A. solani* المختلفة وذلك بقياس معدل السيلان (R*f*) للتوكسينات الناتجة باستخدام طريقة Pound و Stahmann (1951) ، وطريقة Lazarovits و Stoessl (1998) المبينة بالجدول (4) بعد فصلها على رقائق السيلكا جل الكروماتوجرافية (TLC) .

اختبارات التقييم الحيوي للتوكسينات المفصولة من العزلات المختلفة لفطر *Alternaria solani*

1- على إنبات بذور الطماطم صنف Rio-grand

يتضح من الجدول (5) أن أعلى نسبة تثبيط لإنبات بذور الطماطم كان عند معاملتها بواسطة التوكسين المعزول من البقع ذات معدل سيلان (0.133)R*f* و (0.52)R*f* بتركيز 10^{-1} و (0.488)R*f* بتركيز 10^{-2} بالإضافة للتوكسين الخام (طريقة II) قبل فصله على رقائق السيلكا جل أو التوكسين الخام (طريقة I) فقد ثبط نمو الجذير

جدول 3 نتائج فصل توكسينات عزلات فطر *Alternaria solani* المختلفة على الرقائق الكروماتوجرافية (TLC) باستخدام طريقة Pound و Stahmann

العزلات	Rf				
	Rf (0.1-0.2)	Rf (0.21-0.4)	Rf (0.41-0.6)	Rf (0.61-0.8)	Rf (0.81-1)
1	–	–	–	0.723	0.961
2	0.133	–	–	0.673	0.900
3	0.207	0.266	–	–	–
4	0.133	0.317	0.541	0.683	0.840
5	0.133	0.327	0.489	0.659	0.797
6	0.133	0.353	0.516	–	0.805
7	0.133	0.314	0.551	0.694	0.875

جدول 4 نتائج فصل توكسينات فطر *Alternarie solani* من بيئات مختلفة على الرقائق الكروماتوغرافية (TLC) باستخدام طريقة Lazarovits و Stoessl

البيئات	Rf				
	Rf (0.1-0.2)	Rf (0.21-0.4)	Rf (0.41-0.6)	Rf (0.61-0.8)	Rf (0.81-1)
PDA	0.221	0.230	0.571	0.679	0.930
TDA	0.170	–	0.520	0.682	0.944
V-8 Juices	0.166	–	–	0.691	–
Czapek's-Dox agar	0.174	–	–	–	–
Ritchard	–	0.362	–	0.746	–
Pepton glucose agar	–	0.362	–	0.746	–

جدول 5 التقييم الحيوي لإنبات بذور الطماطم* (صنف Rio-grand) وطول الجذير المعامل بتركيزات مختلفة من الراشح الفطري لعزله (4) والتوكسين الخام وبعد فصله على الرقائق الكروماتوجرافية (TLC)

المعاملات	% للإنبات / تركيز		طول الجذير (سم) / تركيز	
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-2}
الماء	85.00*	85.00	3.66	3.66
الإيثانول	62.50	83.75	1.21	2.21
الراشح الفطري للعزلة 4	60.00	65.00	0.84	1.21
طريقة I**	67.50	75.00	0.39	1.49
طريقة II***	47.50	70.00	0.73	1.96
Rf بعد الفصل				
0.133	37.50	67.50	0.73	0.96
0.327	70.00	78.50	2.00	2.48
0.488	52.50	55.00	0.73	2.39
0.520	37.50	67.50	0.73	1.98
0.658	62.50	80.00	1.28	1.99
0.797	62.50	77.50	0.91	1.74

* بمتوسط 40 بذرة / معاملة

** I التوكسين الخام المفصول بطريقة Pound و Stahmann

*** II التوكسين الخام المفصول بطريقة Lazarovits و Stoessl

حيث وصل متوسط طوله إلى (0.39) سم فقط ، أما الراشح الفطري للعزلة (4) بمتوسط (0.827) سم عند 10^{-1} . وأما التركيز 10^{-2} كان طول جذير لـ Rf(0.32) بمتوسط (2.47) سم وأقصر طول (1.21) سم عند معاملة البذور بالراشح الفطري للعزلة (4) مقارنةً بالشاهد المعامل بالماء (3.66) سم والمعامل بالإيثانول (2.21) سم .

2- على أوراق الطماطم المفصولة صنف Rio-grand

يبين جدول (6) عدم ظهور أعراض على أوراق الطماطم صنف Rio-grand المفصولة عند معاملتها بالماء أو الإيثانول كلاً على حدة و Rf(0.488) و Rf(0.52) إلا أن جراثيم العزلتين (1 و 3) والتوكسين الخام المتحصل عليه بالطريقتين Rf(0.133) ، Rf(0.327) ، Rf(0.6) ، Rf(0.7)

جدول 6 أعراض الإصابة بجراثيم الفطر بتركيز (2.5×510 جرثومة/مل) على أوراق الطماطم المفصول (لصنف Rio-grand) والراشح الفطري والتوكسين قبل وبعد الفصل

المعاملة	ظهور الأعراض على الورقة المفصولة
الماء	−
الإيثانول	−
جراثيم العزلة 1	±
جراثيم العزلة 2	+
جراثيم العزلة 3	±
جراثيم العزلة 4	+
جراثيم العزلة 5	+
جراثيم العزلة 6	+
جراثيم العزلة 7	+
المترشح الفطري للعزلة 4	+
توكسين خام بطريقة I	±
توكسين خام بطريقة II	±
بعد الفصل (معدل السيلان *Rf*)	
Rf (0.133)	±
Rf (0.327)	±
Rf (0.488)	−
Rf (0.52)	−
Rf (0.6)	±
Rf (0.7)	±

− لا تظهر أعراض موت الأنسجة (Necrosis)

± شحوب وبداية اصفرار وموت الخلايا (موت الأنسجة Necrosis)

+ بداية ظهور بقع ميتة

جميع هذه المعاملات عكست أعراضاً على شكل اصفرار ، أما جراثيم عزلات الفطر (2 ، 4 ، 5 ، 6 ، 7) فقد أعطت أعراضا بداية ظهور البقع الميتة .

المناقشة

يتضح من نتائج هذه الدراسة أن العزلات التي تم الحصول عليها تنسب إلى فطر *Alternaria solani* المسبب لمرض اللفحة المبكرة على الطماطم حيث اتفقت نتائج أوصاف ومقاييس جراثيم عزلات هذا الفطر في هذه الدراسة والتي تعد عاملاً هاماً ورئيساً في تعريفه مع ما ذكر في دراسات سابقة (Barnett و Hunter 1972 ؛ Ellis و Gibson 1975 ؛ El-Samman 1986 ؛ Chellemi 1995) وهذا يؤكد ما توقعه بعض الباحثين (اليسيري وثابت 1976) عن تواجد هذا المرض بمنطقة الجبل الأخضر . وقد تم الحصول على توكسين حمض الألترناريك من العزلات المختلفة بحالة نقية في صورة بلورات وهذا يتفق مع ما توصل إليه الباحث في دراسات سابقة (Brain وآخرون 1949 ، Brain وآخرون 1951) ، وأظهرت نتائج هذه الدراسة أن حمض الألترناريك

يسبب اصفراراً وشحوباً عند اختباره على الأوراق المفصولة وكذلك عند التقييم الحيوي لبذور الطماطم حيث أدى إلى خفض نسبة إنباتها وقصر طول الجذير ، وتشير الدراسات السابقة إلى أن حمض الألترناريك لا يسبب أعراضاً مشابهة للمرض لذا يعتبر حمض الألترناريك توكسين غير متخصص وليس هناك ارتباط بين إنتاج حمض الألترناريك والقدرة الإمراضية لجراثيم العزلات المختلفة وهذا ما أكدته دراسات سابقة (Lishu وآخرون 1997 ؛ Zheng وآخرون 1997) .

وتبين النتائج المتحصل عليها من طريقة فصل توكسينات الفطر بطريقة Lazarovits و Stoessl (1988) على الرقائق الكروماتوغرافية (TLC) وجود عدد من التوكسينات تظهر في شكل بقع (Spots) على الألواح ، وقد استخدمت كل هذه البقع في التقييم الحيوي لإنبات بذور الطماطم وعلى الأوراق المفصولة كلاً على حدة لدراسة تأثيرها ، كما وجد أن هذه التوكسينات مختلفة في تأثيرها على إنبات بذور الطماطم وأطوال جذورها .

تظهر النتائج أن هنالك العديد من التوكسينات ينتجها الفطر على شكل معدلات سيلان (R*f*) مختلفة على الرقائق الكروماتوغرافية (TLC) ونظراً لقلة إمكانية التعريف لكل معدل سيلان (R*f*) مختلف فهناك احتمال كما بينه بعض الدارسين (Lazarovits و Stoessl 1988 ؛ Okamura وآخرون 1996) أن الفطر ينتج أنواعاً مختلفة من التوكسينات مثل Altersalonols متعددة الأنواع Altersalonols (A-B-C-F-D-G) وهناك أيضاً كثيرا من الباحثين عزلوا 5-Methyl tetra hydroaltersaonals
5-Methylsulponatmeltylen - altersalonols

وقد فسر العديد من الباحثين (Pound و Stahmann ، 1951 ؛ Maitlen ، 1954 ؛ El-Samman ، 1986 ؛ Ozzcelike و Ozcelik ، 1990 ؛ Okamura وآخرون ، 1996 ؛ Haraguchi وآخرون ، 1996) أن هذه التوكسينات لها دور في تثبيط النقل الإلكتروني للميتوكوندريا عن طريق عملها كمستقبلات للإلكترونات . وتبين النتائج المتحصل عليها اختلاف تكوين التوكسينات باختلاف نوع العزلة والبيئة وهذا ما يتفق مع ما أكد في دراسات سابقة (Brain وآخرون 1951 ؛ Langsdorf وآخرون 1990) ، وكذلك أوضحت نتائج هذه الدراسة أن المترشحات الفطرية للعزلات المختلفة لها تأثير سام بظهور أعراض الاصفرار والشحوب وكذلك على إنبات بذور الطماطم وأطوال الجذير ، وهذه النتائج تتفق مع ما تم التوصل إليه في دراسات سابقة حيث أكدوا على أن توكسينات macrosporin alterporriols هي المشابهات لمركبات الألترسولانول وأيضاً مركبات غير معروفة كتوكسينات تم اختبارها كمترشحات فطرية ولها تأثير سام على النباتات (Phytotoxic) وخاصة العائلة الباذنجانية وهي منتجة من فطر *A. solani* (Stoessl و Lazarovits 1988 ؛ Okamura وآخرون 1996) .

Isolation and bio-estimation of toxin from different isolates of *Alternaria solani* the causal of early blight disease of tomato in Al-Gabal Al-Akther district

Nwara A. Mohamed[(1)] **Mohammed A. Saeed**[(1)]
M.G. El-Samman[(2)] **Issa A. Abugharsa**[(1)]

Abstract

This study was conducted in the faculty of Agriculture in the University of Omar Al-Mukhtar (GSPLAJ). The study aimed to isolate the toxins from different isolates of *Alternaria solani* and bio-estimation of these toxins. Seven isolates from the mention fungus was collected from different Locations of Al-gabal Al-Akhdar district included (Derna, Elbedia and El-Marg). Crystal of Alternaric acid was obtained in pure case from these isolates. The results indicated that there were significant differences between isolates in their capability to produce the toxin that isolated on TLC and there was a different in the quantity of the produced toxin, according to the used cultural media, inoculation of tested tomatoes leaves with fungal spore gives the ideal symptoms while the tested toxins gives only discoloration of the tested leaves. The raw toxin and fungal filtrates cause decreases in the germination of tomato seeds and the length of the rootlettes indicated that the toxin is not from primary determinant group.

(1) Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Omar ElMokhtar, Libya.
(2) Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Egypt.

المراجع

اليســـــــيري ، م. و ثابـــــــت ، م. (1976) . أهـــــم الأمـــــراض والآفـــــات الزراعيـــــة وطرق مقاومتها ، الهيئة التنفيذية لمنطقة الجبل الأخضر ، ص108 .

دكســـون ، غ.ز. (1981) . أمـــراض محاصـــيل الخضر ، ترجمة عبد النبي محمد أبو غنية وصالح النويصـري ، الـدار العربيـة للنشـر والتوزيـع ، ص647 .

Barnett. HL.; and Hunter, B.B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd Ed. Burgress publishing Co., Minnesota, U.S.A.

Batchvarova, N. N.; Morozova, N. E.; Prostakova, Z h. G.; Darakov, O. B.; Meliyan, L. G.; Bronshtein, A. I.; Lazu, M. N., and yurku, Al. (1992). Pollen selection in crop plants for resistance to pathogens causing fungal disease. Buletinul, Academiei – de – stiinte – a – Republicii – Moldova – Stiinte, Biologicesi Chimice No. 23-11.

Brian, P.W.; Curtis, P.J.; Hemming, H.G.; Jeffreys, E.G.; Unwin, C.H.; and wright, J.M. (1949). Alternaric acid, a biologically active metabolic product of the fungus *Alternaria solani*. Nature 164: 534.

Brian, P.W.; Curtis, P.J.; Hemming, H.G.; Jeffreys, E.G.; Unwin, C.H.; and wright, J.M. (1951). Alternaric acid, a biologically active metabolic product of *Alternaria solani* (E11. & Mart.) Jones & Grout; its production, isolation and antifungal properties. J. Gen. Microbial. 5: 619-632.

Chellemi, D.O. (1995). A new *Alternaria* leaf blight disease on tomato in north Florida. Plant Dis. 79: 426. (Abs).

Ellis, M.B.; and Gibson, I.A.S. (1975). *Alternaia solani*. No. 475 in: Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria Common W. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biolkew, Surrey. England.

El-samman, M.G. (1986). Studies on early blight disease of tomato. M.Sc. Thesis. Fac. Of Agric. Ain Shams Univ. Egypt.

Haraguchi, H.; Abo, T.; Fukuda, A.; Okamura, N.; and Yagi, A. (1996). Mode of phytotoxic action of altersolanols. Phytochemistry, Oxford. Oxford: Elsevier Science Ltd. 43: 989-992.

Langsdort, G.; Furuichi, N.; Doke, N.; and Nishimura, S. (1990). Investigations on *Alternaria solani* infections: detection of alternaric acid and a susceptibility inducing factor in the spore-germination fluid of *A. solani*. J. Phytopathol. 128: 271-282.

Lazarovits, G.; and Stoessl, A. (1988). Tricyclazole induces melanine shunt products and inhibits altersolanol accumulation by *Alternaria solani* Pesticide-

production by three *Alternaria* spp. Mycopatholgia. 109: 171-175.

Pound, G.S.; and Stahmann, M.A. (1951). The production of a toxic material by *Alternaria solani* and its reaction to the early blight disease of tomato Phytopathology 41: 1104-1114.

Pritchard, F.J.; and prote, W.S. (1921). Collar-rot of tomato Jouinal of Agric. Res. 21: 179-184.

Tuite, J.C. (1969). Plant Pathological Methods. Minnea polis, Minn. Burgess Publishing Co., 239pp.

Walker, J.C. (1969). Plant patholgy. McGraw-Hill Book Co., N.Y. 819pp.

Zheng, L.; Dongxia, V.; Qiang, Z.; Suhua, Z.; Zhao, V.; and Zhiming, Z. (1997). The study on some compounds in activating alternaric acid. Acta phytophulacica Sinica 24: 273-277 (c. f. Rev. Plant Pathol. 77: 179. 1998).

Biochemistry and Physiology 31: 36-45.

Li Shu Zheng, Yue Dongxia; Zeng Qiang; Zhang Suhua; Yang Zhao and Zhang Zhiming, (1997). The study on some compounds in activating alternaric acid Acta Phytophylacica Sinica 24: 373-277 (c.f. Rev. Plant pathol. 77: 179 1998).

Maitlen, E.G. (1954). The biological Activity of Alternaric acid Abstr, 14. 10p. 1492. (c.f. Rev. Appl. Mycol. 34: 312-313, 1955).

Okamura, N; Mimura, K; Haraguchi, H.; Shingu, K.; Miyahara, K.; and Yagi, A. (1996). Altersolanol-related compounds form the culture liquid of *Alternaria solani*. Phytochemistry, Oxford. Oxford Elsevier Science 42: 77-80.

Ozzcelike, S. and Ozcelik, N. (1990). Interacting effects of time, temperature, PH and simple sugers on biomass and toxic metabolite