دراسة تأثير سموم فطر الألترناريا (AAL) على القمم النامية لجذور نبات الفول

عيسى علي أبو غرسة[1] هدى الطيب[2] عبد القادر رواف المالح[2]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v17i1.834

الملخص

أجريت هذه الدراسة في معامل فسيولوجيا النبات جامعة عمر المختار / كلية العلوم خلال 2003 ، أشارت الاختبارات والفحوص المجهرية لتأثير سم فطر الألترناريا (AAL) على معامل الانقسام والتشوهات الكروموسومية لخلايا القمم النامية لجذور نبات الفول *Vicia faba* حدوث نقص تدريجي في معامل الانقسام Mitotic index مع زيادة في التركيزات المستخدمة من السم (11% عند أعلى تركيز 10 ملجم/مل) مقارنة بالجذور غير المعاملة (18.1%) ، وتبين من الفحوصات المجهرية ظهور العديد من التشوهات الكروموسومية Chromosomal aberrations مثل الجسور Bridges والكسور Breaks والقطع Frgments والتكتل والتشتت والكروموسومات المتأخرة Lagging ، حيث لوحظت هذه التشوهات في الأطوار المختلفة للانقسام كما أحدثت هذه التركيزات ارتفاع في نسبة الاختلالات الكروموسومية لأطوار الانقسام المختلفة ، وتبين أن الطور الاستوائي Metaphase أكثر الأطوار تأثراً بالتركيزات المستخدمة وكانت أعلى نسبة تشوهات 40% من العدد الكلي لخلايا هذا الطور عند التركيز 10 ملجم/مل ، من السم فجائي بينما في الطور التمهيدي كانت نسبة التشوهات 31.2% عند التركيز 8 ملجم/مل .

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

[2] قسم النبات ، كلية العلوم .

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

المقدمة

إن عديد من المواد السامة المنتجة بواسطة الكائنات الحية الدقيقة الممرضة تسبب بعض الأمراض ليس فقط على عوائلها ولكن أيضاً على أنواع أخرى من النباتات فمثلاً يفرز فطر الفيوزايم سموم مختلفة منها سم اليكومراسمين *Lycomarasmin* المسبب لذبول وموت الخلايا بين العروق في أوراق الطماطم كما ينتج سم آخر هو حمض الفيوزاريك Fusaric acid بالإضافة إلى أعراض الذبول يكون البقع المائية على الأوراق وتتلون الأنسجة باللون البني ويسبب قليلاً من موت الخلايا بين عروق الأوراق ، وكذلك فإن كلاً من السمين (ليكومراسمين وحمض الفيوزاريك) ترتبط بالمعادن الثقيلة مثل الحديد والنحاس مما يؤثر على أغشية الخلية ويثبط التفاعلات الأنزيمية بها (Smith ، 1983 و Nair ، 1998) .

كما لوحظ أن فطر *Pyricularia oryzae* المسبب لمرض لفحة الأرز يفرز سم باريليولارن *Piricularin* الذي يسبب اصفرار وتخطيط وتقزم البادرات وكذلك تبقع الورقة وتعفن عقد الساق عند قاعدة الأوراق في النباتات الناضحة ، وهذا السم يؤثر على عدد من النباتات الراقية حيث أن التركيزات العالية تثبط نمو وتنفس العائل (Tamari وآخرون معه ، 1966) بينما ينتج فطر *Helminthosporium victorae* سم فاكتورين Victorin وذلك عند تطفله على عدد من الحشائش النامية في التربة حيث يسبب موت خلايا الساق والجذر ويؤثر على نفاذية الخلايا ، ولقد لوحظ أن هذا الفطر عند إصابته لعوائل نباتية مقاومة ، فإنه يؤدي إلى اضطرابات سريعة في الخلية مؤدية إلى موت الخلية والفطر معاً دون زيادة في نموه ، أما العوائل الحساسة للإصابة بالفطر فإن سم فاكتورين يقوم بمنع الاستجابة السريعة للخلايا مما يؤدي إلى تطور المرض مع نمو الفطر (Scheffer وآخرون معه ، 1964) .

لوحظ أن فطر *Alternaria* ينتج ما لا يقل عن تسع أنواع من السموم التي يتكون متخصصة لعوائل دون الأخرى ويظهر أنها سموم متباينة في تركيبها الكيميائي (Kohmoto وآخرون معه 1991) ونبين أنها عبارة عن مواد أيضية ثانوية منخفضة الوزن الجزئي (Yoder, 1980) كما تبين في دراسة سابقة أن فطر الالترناريا أثناء إصابته للنبات أو زراعته على بيئة صناعية ينتج سموم متخصصة في عوائل معينة (Host Specific Toxins) دون غيرها (Kohmoto وآخرون معه ، 1991) .

وخلال الخمس عشرة سنة الأخيرة بدأ العمل الحقيقي بالسموم المختارة الخاصة بعوائل (HSTs) ، في أنواع فطر الألترناريا ، لذلك لاتزال المعرفة بالسموم الفطرية بدائية وتتطلب الكثير من البحوث .

ومنذ ظهور الدراسة التي أشار إليها كلاً من Gilchrist و Gorgan (1976) حول فطر جديد ممرض يسبب تقرح الساق على أصناف محددة من الطماطم ، ومقدرة هذا الفطر الممرض *Alternaria alternate* على إنتاج HS ، هو سم AAL (وقد أعطى هذا الاسم إشارة إلى الحروف الأولى من اسم الفطر المنتج له ، *Alternaria alternate* f. sp. *Lycopersici* كما أشارت بحوث عديدة إلى وجود عزلات من الفطر *Alternaria alternate* والمنتجة لهذه السموم في مناطق مختلفة من العالم ؛ كاليابان وأمريكا ، مما زاد الحاجة لدراسة هذا الفطر والسموم الناتجة عنه واستخدمت كرموسومات القمم النامية لجذور نبات الفول *Vicia faba* في كشف تأثير سم AAL على معامل الانقسام Azidoglycerol) .

كما أن جميع أنظمة اختبار النبات تستخدم خلايا القمم النامية لجذور نبات الفول في فحص العوامل المسببة للتشوهات الكروموسومية وفي ذلك استخدمت ستة كيماويات مختلفة حدد مصدرها السام ، تم إثبات مقدرتها على إحداث تشوهات كروموسومية ، وأثناء الفحص المجهري لقمم جذور الفول المعاملة بهذه الكيماويات لوحظ ظهور النويات الصغيرة ولزوجة الكروموسومات وانقسامها وكذلك تأخير تكوين الكروماميندات (Sandhu و Acedo ، 1980) .

وتهدف هذه الدراسة لعزل فطر الألترفارماين ثمار طماطم مصابة على شبه PDA والحصول على سم AAL ودراسة تأثيره على كروموسومات القمم النامية لجذور نبات الفول .

المواد وطرق البحث

1- جمع العينات وعزل الممرض

تم جمع أجزاء مصابة من نباتات الطماطم عليها أعراض الندوة المبكرة من منطقة الوسيطة ، وبعد غسل الأجزاء المصابة بالماء الجاري للتخلص من الأتربة والغبار العالق على سطحها ، تم قطعها إلى أجزا ء صغيرة بالمشرط ، وعقمت سطحياً بتركيز منخفض من محلول هيبو كلوريت الصوديوم (NaOCI) ، لمدة دقيقتين وذلك للتخلص من الطفيليات الثانوية ، ثم غسلت بالماء المعقم وجففت بورق الترشيح ، ونقلت إلى أطباق بترية تحتوي على بيئة أجار مائي ، وحضنت عند درجة حرارة 26 ± 2°م لمدة 4 أيام ، وبعد تنقيتها بطريقة القمة الهيفية (Tuit ، 1969) نقلت إلى بيئة (Potato Dextrose Agar) PDA وحضنت على درجة 25°م ، وبعد الحصول على عزلة نقية تم تعريف الفط بالصفات المظهرية لجراثيمه (Barentt و Hurnt ، 1972) .

2- استخلاص السم (AAL) من الفطر *Alternaria alternate* f. sp. *Lycopersici*

وتم ذلك باستخدام طريقة Scott و Kanhere (1980) ، حيث نميت عزلات الفطر النقية على بيئة البطاطس السائلة (PD broth) لمدة ثمانية وعشرين يوماً ، بعد ذلك رشحت خلال أقماع تحتوي على ورق ترشيح واتمان (No. 01) ، وضبط الرقم الهيدروجيني للراشح عند pH 3.5 ، باستخدام حمض الخليك ، مع إضافة كمية معادلة من أسيتات الميثيل ، وتم التخلص من الشوائب باستخدام أقماع الفصل ، مع الرج لمدة عشر دقائق في جهاز الهزاز ، وكررت هذه العملية عدة مرات مع ضبط الرقم الهيدروجيني للراشح في كل مرة ، بعد ذلك جفف الراشح وحفظ في قنينات داكنة في الثلاجة لحين استعماله .

3- استخدام القمم النامية لجذور نبات الفول في كشف التشوهات الكروموسومية المستحثة بسم AAL

وتم ذلك بتنمية بذور نبات الفول *Vicia faba* صنف (Giza) بإمرار الماء الجاري عليها عند درجة حرارة 20 ± 1°م لمدة خمسة أيام حتى يصل طول الجذر الابتدائي 1-2 سم ثم بعد ذلك تنقل البذور إلى كؤوس صغيرة سعتها 20 مل مع مراعاة تغير الماء المستخدم كل 24 ساعة ، وعند وصول طول جذور هذه البادرات إلى 7سم قطعت لتحفيز نمو الجذور الثانوية والتي تم معاملتها بتراكيز مختلفة من سم الفطر *A. alternate* f. sp. *Lycopersici* (0 و 2 و 4 و 6 و 8 و 10 ملجم/مل) بعد أن وصل طولها 4سم ، واستخدم في هذه التجربة ثلاثة مكررات لكل تركيز وأخذت القراءة بعد 24 ساعة من المعاملة (Packa ، 1997) وتم تحضير الشرائح باستخدام طريقة (Davin وآخرون معه ، 1983) وذلك بجمع القمم الجذرية للمكررات المختلفة والشاهد (Control) وتثبيت هذه القمم باستخدام مثبت كارنوي ، وصبغت بالستيواورسين في وجود حمض الخليك الثلجي حيث هرست أربعة قمم جذرية لكل شريحة باستخدام غطاء الشريحة وتم بعد ذلك حساب معامل الانقسام باستخدام العدسة الزيتية حسب المعادلة التالية :

$$\text{معامل الانقسام} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{عدد الخلايا الكلي (المنقسم وغير المنقسم)}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

أشارت نتائج تأثير سم الفطر (AAL) *Alternaria alternate* f.sp. *lycopersici* على خلايا القمم النامية لجذور نبات الفول *Vicia faba* والمعاملة بتراكيز مختلفة (2 و 4 و 6 و 8 و 10 ملجم/مل) منه لمدة 24 ساعة ، حيث تم ملاحظة حدوث تغيرات متعددة على نفس

الانقسامات الفتيلية Mitotic division ، ونقص تدريجي في معامل الانقسام Mitoitic index لهذه الخلايا ، جدول (1) . وهناك تناسب طردي ما بين هذا النقص وزيادة التركيز شكل (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5) حيث أن سم AAL أدى إلى اضطراب في الدورة الطبيعية لانقسام الخلايا والذي يؤدي بدوره لنقص في عدد الخلايا الداخلية في الطور التمهيدي Prophase لعملية الانقسام ، وذلك لأن السم AAL يتداخل مع الدورة الطبيعية لانقسام الخلايا عن طريق إضعاف Impairing الطور G_1 للخلية وتثبيط دخولها إلى طور التخليق (S phase) وبالتالي تثبط انقسامها وهذا يشابه ما توصل إليه Ahmed و Nelly (1997) عند دراسة تأثير المبيد الحشري (Temik) على خلايا القمم النامية لجذور نبات الفول كما أن معاملة هذه الجذور باسم AAL أدى إلى حدوث تشوهات كروموسومية مختلفة في جميع مراحل الانقسام الفتيلي للخلية مثل ظهور طور النويات الصغيرة (Micronucle) بسبب حدوث كسر لامركزي في أطوار الانقسام الخيطي (الفتيلي) ، وظهور الكسور الكروموسومية وتكوين الجسور الثنائية والمتعددة في الطورين الاستوائي والانفصالي ، ويرجع ذلك لتحطيم الكروموسومات من تأثير السموم ومن ثم إعادة التحامها Reunion وهذا ما لاحظه Amer و Farah (1979) عند معاملة نبات الفول بمركبات الفوسفور العضوية .

ظهور الكسور الكروموسومية في خلايا الجذور المعاملة بسموم AAL يماثل ما توصل إليه Soliman و Alnajjar (1980) عند معاملة جذور نبات الفول بمواد كيميائية ، ولقد لوحظت زيادة تدريجية في عدد التشوهات الكروموسومية في الطور الاستوائي وكان 40% عند تركيز 10 ملجم/مل جدول (1) ، وحركة الكروموسومات أثناء انقسام الخلية تعتمد على نظام إنتاج الطاقة وإن الكيماويات المستخدمة تؤدي إلى اضطراب في المسار التنفسي الناتج من نقص المركبات المهمة مثل ATP *Aderine triprosphate* والجلوكوز والبروتين مما يؤدي في النهاية إلى إعاقة حركة ألياف المغزل (Ajey و Sarbhoy ، 1988) ، وإن سموم الممرضات تثبط تخليق الطاقة (ATP) في العوائل المصابة (Braun وآخرون معه ، 1990) .

ومن هذه الاختبارات الإيجابية على نبات الفول الموضحة بالجدول (1) يبين مدى تأثير هذه السموم على النباتات بصفة عامة على نبات الفول والطماطم بصفة خاصة وهذا ما أشار إليه Gorgang Gilchrist (1976) في قدرة فطر *A. ahernata* في إنتاج سموم متخصصة في عوائل معينة .

Study the Effect of *Alternaria* Toxins (AAL) on Root Tip Cells of *Vicia faba*

I. A. Abogharsa[1] **A. A. El-Maleh**[2] **H. A. Khattab**[2]

Abstract

The aim of this study to isolate the toxins of *Alternaria alternate* F. Sp. *Ycopersiei* (AAl) from tomato plant, and study their effect on chromosomes of a very sensitive eukaryotic eukaryotic organism (*Vicia faba*) to chemical toxins.

The results of the effect of these toxins on tested plant indected that decreased in mitotic index, produced excessive condensation of pro-and metaphase chromosomes, and caused an accumulation of metaphase, in addition to chromosome stickiness and low frequencies of chromosomal aberrations as well as induced micronuclei chromosome breaks.

(1) Plant Protection Department, Fac. Of Agriculture.

(2) Plant Science. Fac. of Sei.

المراجع

Ahmed, G. and Nelly, M .(1997) .Cytotoxicity of insectiside Temik 15 G (Decarb) in Mitotic and Meiotic cells of Vicia faba plant Cytologia 62 : 259 -263 .

Aist, J .R. (1974) .A freeze etch of membranes in Plasmaophora infected and non -infected root hairs, Can. J. Bot., 52: 1441-1449.

Ajay, K. J .and Sarbhoy , R .K (1988) .Cytogenic studies on the effect of some chlorinated pesticides. Cytologia, 53 : 427- 436 .

Alexopoulus, C. J .and Mims, C. w. (1979) .Indroductory Mycology third edition. John wily and Sons New york Chicter Brisbane Toronto pp .3 08 -319 .

Amer, M. and Farah, o. R. (1979) .Cytological effects of pesticides. IX Effect of phosphonothioate insecticide (Leptophos) on Vicia faba. Cytologia, 44 : 907 -913 .

Barnett, H. L .and. Hunter, B .B. (1972) .IllistTated genera of imberfct fungi. 3 rdEd .Burgress publishing Co ., Minnesota, U.S.A.

Braun, C. J ., Siedow. J .N .andLeving, C.S.III. (1990) .Fungal toxins bind to the URF 13 protein in maize mitochondria and Esherichia coli. Plant cell, 2 : 153 -161 .

Centeno, S, and Calvo, M .A . (2002) .Mycotoxins production byfungi isolated from wine crok stoppers .Pakistan J. of Nutrition. 6 : 267-269.

Gilchrist, D .G. and Grogan, R. G. (1976) production and nature of host-specific toxin from Alternaria alternata f. sp .lycopersici . Phytopathol. , 66: 165 -171 .

Kohmoto , K., Nishimura, S. and Otani, H .(1982).Actionn site for AM toxin produced by thy apple pathotype of Alternaria alternata . In plant infection: the physiological and biochemical basis. Edited by Asada et al .japan scientific society bress .tokyo, and Sbringer -VerI age -Berlin. pp .253 -263 .

Nair, M .G (1998) Fumonisins and human health. Ann. Trop. Paedlatr., 18: 47 -52.

Packa , D .(1997) .Cytogenic effect off usarium mycotoxins on root tip cells of rye (Secale cereal L.) wheat (Triticum aestivum L.) and field bean (Viciafaba L .var. minor). J. of Applied Genetics, 38 (3) : 259 -272.

Scheffer, R .P. and Pringle, R .B. (1964) .Uptake of Helminthosporium victoriae toxins by oat tissue. Phytopathol., 54 : 832 -835.

Scott, P. M. and Kanhere , S. R. (1980) .Liquid chromatographic determination of tenuozonic acid in tomato paste. J .A .0 .A .C. 63 : 672.

Siler, D .J .and Gilchrist, D. G. (1982) .Determination of host -selsctive phytotoxin from Alternaria alternata f. sp .lycopersici as theirmaleyl derivatives by high -performance liquid chromatograbhy. J . Chromatogr ., 238 : 167 -173.

Smith, J .E. (1983) .The filamentous fungi. Fungal tecnology (vol. 4)

Edward Arnold Pub. Great Britain, 239 -265.

Soliman,A. S. and AI- Najjar, N. R. (1980) .Cytological affect of Vita vax -200 and Dithane S-60 in meiotic cells of Wheat and two related species. Cytologia, 54 : 169 -175.

Tamari, K., Ogasawara, N., Kaji, J. and Togashi. (1966). On The effect of apiricularindetoxyfying substance, ferulic acid, on the tissue resistance of rice plantto the blast-fungal infection. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 32: 186 -193.

Tuit, J .C. (1969) .Pathological Methods. M innea polls Minn .Burgress Puplishing Co .

Yoder, o. C. (1980). Toxins in pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol., 18: 103 -129.

جدول 1 تأثير سموم الفطر *A. alternate* f.sp. *lycopersici* على أطوار ومعامل الانقسام لخلايا القمم النامية لجذور نبات الفول *Vicia faba*

التركيز	العدد الكلي	عدد الخلايا	% الطور التمهيدي		% الطور الاستوائي		% الطور الانفصالي		% الطور النهائي		MI
مليجرام/مل	للخلايا	المنقسمة	الطبيعي	التشوهات	الطبيعي	التشوهات	الطبيعي	التشوهات	الطبيعي	التشوهات	
0	1564	283	99.2	0.81	100	0	98	2	100	0	18.1
2	1538	265	82	18	84	16.1	85	15.4	95.2	5	17.2
4	1487	245	80	20.2	78	27	82	18.1	93.3	70	16.5
6	1265	178	70	31	73	27.4	79	21.4	94	6.3	14.1
8	1575	200	70	31.2	65.3	34.7	76	24	100	0	13.0
10	1235	136	73.3	27	60	40	74.2	26.0	100	0	11.0

* MI (Mitotic Index) : معامل الانقسام

$$\text{معامل الانقسام} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{عدد الخلايا الكلي (المنقسم وغير المنقسم)}} \times 100$$