

## عزل وتشخيص الفطريات المسببة لتعفن الفاكهة والخضراوات ودراسة قدرتها على انتاج انزيمات محللة للجدر الخلوية

هبة هادي طه

قسم علوم الحياة – كلية العلوم / جامعة الموصل

[Emil:hiba.aldabbagh2017@yahoo.com](mailto:Emil:hiba.aldabbagh2017@yahoo.com)

### الخلاصة

تم عزل 22 فطر من الخضراوات والفاكهة المصابة والمعروضة في الاسواق المحلية خلال الاشهر الستة من تشرين الاول 2013 ولغاية اذار 2014 وظهرت الفطريات التالية *Alternaria alternata* وثلاثة انواع من الفطر *Curvularia* ، *Colletotrichum sp.* ، *Cladosporium sp.* ، *Cephalosporium sp.* ، *Aspergillus spp.* ، *Epicoecum sp.* و نوعين من الفطر *Macrophomina* ، *Geotrichum sp.* ، *Fusarium spp.* ، *lunata* ، *Rhizopus stolonifer* ، *Rhizoctonia solani* ، *Pythium sp.* ، *Penicillium sp.* ، *phaseolina* ، *Stemphylium sp.* ، *Trichoderma harzianum* ، *Trichothecium sp.* وأظهر فطر *A.alternata* اعلى نسبة تكرار خلال اشهر تشرين الاول و الثاني وكانون الاول والثاني بينما سجل الفطر *Penicillium sp.* اعلى نسبة تكرار في شباط واذار. و اظهر التحليل الاحصائي وجود تباين بين الانواع الفطرية في انتاج الانزيمات فقد اعطت الفطريات *C.lunata* و *Fusarium sp.* ، *Stemphylium sp.* ، *Pencillium sp.* و *R.solani* الانزيمات الثلاثة (البكتينيز والسيلوليز والاميليز) بينما الفطريات *F.oxysporum* ، *Colletotrichum sp.* و *M.phaseolina* غير منتج لانزيم الاميليز والفطر *Cladosporium sp.* غير منتج للانزيمات الثلاث. اظهر فطر *M.phaseolina* اعلى نسبة انتاج لانزيم البكتينيز و اقل انتاج للانزيم كان من قبل الفطر *A.alternata* . وانتجت جميع الفطريات انزيم السيلوليز عدا فطر *Cladosporium sp.* واعطى الفطر *F.solani* اعلى كفاءة في انتاج الانزيم . اما عن كفاءة انزيم الاميليز فقد اظهر الفطر *R.solani* كفاءة عالية في تحليل النشا وكان الفطر *Stemphylium sp.* اقل الفطريات كفاءة في تحليل النشا .

تاريخ تسلم البحث: 2017/10/5 ، وقبوله: 2018 /4 /12.

### المقدمة

تشكل الفاكهة والخضراوات سلع غذائية ضرورية وذات اهمية تجارية وتلعب دور اساسي في غذاء الانسان عن طريق تجهيزه بالفيتامينات والمعادن الاساسية في الغذاء اليومي وايضا تساعد في الحفاظ على الصحة الجيدة للإنسان، وان تناول الخضراوات بكميات كافية تزيد من الشهية وتوفر كميات مناسبة من الالياف وتلعب دور مفتاحي في معادلة الاحماض الناتجة خلال هضم الاغذية الدهنية والبروتينية وتجهز مادة نباتية نافعة مثل السليلوز الذي يحفز الهضم ويمنع الامساك (Barkai-Golan,2001). إن احد العوامل المحددة التي تؤثر على القيمة الاقتصادية للخضراوات والفاكهة هي الاحياء المجهرية التي تهاجمها وتؤثر في نوعية وكمية الاغذية التي تعد وسط ملائم لنمو الاحياء وتسبب الامراض التي قد تحدث خلال موسم النمو والحصاد والنقل والخزن والتسويق (ما بعد الجني) أو الخزن من قبل المستهلك (Izzati, N.A.and H.,Wan,2011; Buka *etal.*,2009) من هذه الكائنات الفطريات وهي احياء مجهرية حرة المعيشة ومنتشرة بشكل واسع ومعظمها تكون رمية المعيشة او طفيلية وان بعض هذه الفطريات تفرز سموم فطرية تحت الظروف الملائمة من درجات الحرارة والرطوبة وبذلك تشكل خطر على صحة الانسان عند تناولها مثل الفطرين *Aspergillus* و *Fusarium* لذلك يجب الحذر خلال تناول الفاكهة والخضراوات (Ibrahim and Rahma, 2009; Petzinger and Weidenbach,2002). الجدار الخلوي الابتدائي للفواكه والخضراوات مكون تقريبا من 10% بروتينات و90% متعدد السكريات التي تصنف الى ثلاثة مجاميع: السليلوز واشباه السليلوز والبكتين (Nathalie,2006). العديد من الانزيمات المحللة للجدار الخلوي تفرز بوساطة الفطريات الممرضة تساعد على اختراق الجدار الخلوي للنباتات واستخدامه كمصدر غذائي مما يجعلها غير صالحة للاكل ويجعل نوعيتها غير مرغوب بها مما يسبب خسائر اقتصادية فادحة بسبب التعفنات التي تسببها هذه الفطريات ، تتضمن الانزيمات المحللة للسكريات المتعددة *Polygalacturonases* و *Pectin Methylesterases* و *Pectinlyases* و *Acetyl esterases* و *Xylanases* والعديد من المواد البكتينية التي تخترق السليلوز و *Zyloglucan* و *Kolokanats* اخرى (Gordon *etal.*, 2002; Lebeda *etal.*,2001). الانزيمات المحللة للبكتين *Pectinases* هي اول الانزيمات التي تفرز من قبل الفطريات الممرضة عندما تهاجم الجدر الخلوية للنباتات وتضعفها وتعرض بوليميرات اخرى للتحلل بوساطة انزيمات *Hemicellulases* و *Cellulases* ، ان الانزيم الاول الذي يحلل الجدار الخلوي والمفرز من قبل الفطريات تعد من اهم عوامل الضراوة التي يملكها الفطر الممرض (Tomassini *etal.*, 2009). الهدف من البحث هو التعرف على الفطريات المسببة لتعفن الفاكهة والخضراوات واختبار قدرتها على انتاج الانزيمات المحللة للجدر الخلوية

## مواد وطرائق العمل

### 1- جمع العينات:

اختيرت انواع من الخضراوات والفاكهة المختلفة المعروضة في الاسواق المحلية في مدينة الموصل، اخذت ثلاث مكررات شهريا لكل نوع ظهرت عليه اعراض الاصابة المرضية وعلى مدار ستة أشهر للفترة من تشرين الاول 2013 ولغاية اذار 2014.

### 2- عزل الفطريات من الفاكهة والخضراوات:

غسلت عينات الفاكهة والخضراوات بماء جاري لمدة 15 دقيقة لإزالة التربة العالقة بها وقطعت الى قطع صغيرة لا تتجاوز 0.5 سم من حوافي مناطق الاصابة، عقت سطحيا بمحلول 1% هايبيكلورايت الصوديوم لمدة ثلاث دقائق و غسلت بماء معقم وجففت بوضعها بين ورقتي ترشيح معقمة ونقلت كل خمس قطع من كل نوع من الفاكهة والخضراوات الى طبق بتري حاوي على الوسط الغذائي PDA Potato Dextros Agar (المحضر بإذابة 39 غم /لتر والمنتج من قبل شركة LAB ، U.K.) المعقم مضافا اليه المضاد الحيوي سلفات الستربتومييسين بتركيز 50 ملغم /لتر قبل تصليه لمنع نمو البكتريا وكررت المعاملة بثلاث اطباق. حضنت الاطباق في درجة حرارة  $25 \pm 2$  سيليزية لمدة سبعة ايام.

### 3- تنقية وتشخيص الفطريات:

نقبت الفطريات النامية على وسط PDA بأخذ قطع من الغزل الفطري مع الوسط ونقل الى اطباق بتري حاوية على وسط PDA المعقم وبعد نموها فحصت وشخصت الفطريات المعزولة باستخدام المجهر المركب نوع Olympus واعتماداً على المفاتيح التصنيفية التي ورد ذكرها في المصادر التالية (Ellis, 1971; Domsch *et al.*, 1980; Leslie; Barnett and Hunter, 2006 and Summerell, 2006; Pitt and Hocking, 2009) حفظت الفطريات المعزولة والمشخصة في انابيب اختبار تحوي عل وسط PDA المائل في  $5$  سيليزية لحين اجراء الدراسات اللاحقة عليها .

### 4- دراسة فعالية الانزيمات:

#### 1-4 فعالية انزيم البكتينيز Pectolytic enzyme activity

استخدم الوسط الموصوف من قبل Hankin و Anagnostakis (1975) لدراسة فعالية انزيم البكتينيز (Pectinase) والمحضر كما يأتي : 1غم مستخلص خبيرة ، 5 غم بكتين البرتقال، 15 غم اكار، أذيتت في 500 مل من الماء المقطر، اضيف لها 500 مل من محلول الاملاح المعدنية Mineral salts solution المكون من : 2 غم كبريتات الامونيوم، 4 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين، 6 غم فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين 0.2، 10 مايكروغرام كبريتات الحديدية المائية، 1 ملغم كلوريد الكالسيوم، 10 مايكروغرام حامض البوريك ، 10 مايكروغرام كبريتات المنغنيز ، 70 مايكرو غرام كبريتات الخارضين ، 50 مايكروغرام كبريتات النحاس ، 10 مايكروغرام اوكسيد الموليبدنيوم ، خلط المزيجان السابقان وضبط الاس الهيدروجيني عند 7.0. حضنت الاطباق الملقحة والحاوية على الوسط في درجة  $25 \pm 1$  سيليزية لمدة 5 ايام استدل على انتاج الانزيم بأضافة 1% من المحلول المائي لمادة (CTAB) Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide ، المصنعة من قبل شركة Sigma ، ترك الطبق الحاوي على الكاشف لمدة خمس دقائق ثم سكب، ان ملاحظة ظهور هالة رائقة شفافة حول المستعمرة الفطرية دلالة على انتاج الانزيم وكلما زاد قطر الهالة دل ذلك على زيادة نشاط العزلة في انتاج الانزيم .

#### 2-4 فعالية انزيم الاميليز Amylase activity

حضر الوسط الزراعي الخاص بالكشف عن فعالية العزلات الفطرية في تحليل النشا والموصوف من قبل Gessner (1980) والمكون من 2غم نشا ذائب (Soluble starch) 1غم بيتون ، 15 غم خلاصة الخميرة (Yeast extract) ، 18 غم اكار ثم يكمل الحجم الى اللتر بالماء المقطر . مزج الاكار مع كمية من الماء المقطر ووضع على نار هادئة و اضيف اليها خلاصة الخميرة المذابة في كمية من الماء المقطر بالتتابع مع التحريك المستمر حتى امتزجت جيدا ثم اضيف اليها بقية المكونات واكمل الحجم الى لتر واحد بالماء المقطر . ضبط الاس الهيدروجيني عند 6.0 وعقم بجهاز المعقم ، صب الوسط في اطباق بتري معقمة وتركت الاطباق حتى التصلب وحفظت الاطباق في الثلاجة لحين الاستعمال ، استخدم محلول ايوديد البوتاسيوم  $I_2$  (3غم /لتر + KI ، 15 غم /لتر ) للكشف عن قابلية العزلات الفطرية في انتاج انزيم الاميليز باضافته للاطباق الحاوية من المستعمرات النقية وتركه لعشرة دقائق ثم سكبه وترك الطبق لخمس دقائق . ان تكون هالة صفراء حول المستعمرة الفطرية يدل على تكسر النشا الى سكريات بسيطة بينما يأخذ بقية الطبق اللون البنفسجي الناتج عن تعرض النشا لليود وكلما زاد قطر الهالة الصفراء دل ذلك على زيادة نشاط العزلة في انتاج الانزيم وبعبارة اخرى ظهور الهالة الصفراء .

#### 3-4 فعالية انزيم السليوليز Cellulase activity

أعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Yeoh وآخرون (1985) وحضر الوسط الزراعي من المواد: 1.4 غم كبريتات الامونيوم، 2 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين ، 0.3 غم كبريتات المغنيسيوم المائية ، 0.3 غم كلوريد الكالسيوم المائي، 1 غم بيتون ، 10 غم ملح الصوديوم لكاربوكسي ميثيل السليلوز CarboxeMethylCellulose Sodium Salt (CMC-Na salt) ، 15 غم اكار، 0.3 غم يوريا، أذيتت ملح CMC-Na بالماء المقطر باستخدام محرك مغناطيسي Magnetic stirrer مع رفع درجة حرارة المزيج ، وأذيتت بقية

المكونات كل على حدى. مزج المحلولان السابقان وأكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني عند 6.0 وعقم الوسط ، اضيفت اليوريا بعد تعقيمها بمرشحات غشائية دقيقة (Membrane filters، 0.22 مايكروميتر) . لقتح الاطباق الحاوية على الوسط الزراعي باللقاح الفطري وبثلاثة مكررات لكل عزلة و حضنت في درجة  $25 \pm 2$  سيليزية لمدة 5 ايام ، أستدل على انتاج الانزيم باستخدام كاشف يود - حامض الهيدروكلوريك HCL-Iodin المحضر من 100 مل HCL (0.1) مولاري +500 مل من المحلول 1% I وزن / حجم + 2% KI وزن / حجم . أضيف محلول الكاشف الى الطبق الحاوي على المستعمرة الفطرية وترك لعشر دقائق ، وسكب المحلول وترك الطبق لدقائق . ظهور هالة فاتحة اللون حول المستعمرة الفطرية دلالة على انتاج الانزيم ويزداد قطر الهالة بزيادة مقدرة الفطر على الانتاج .

### النتائج والمناقشة

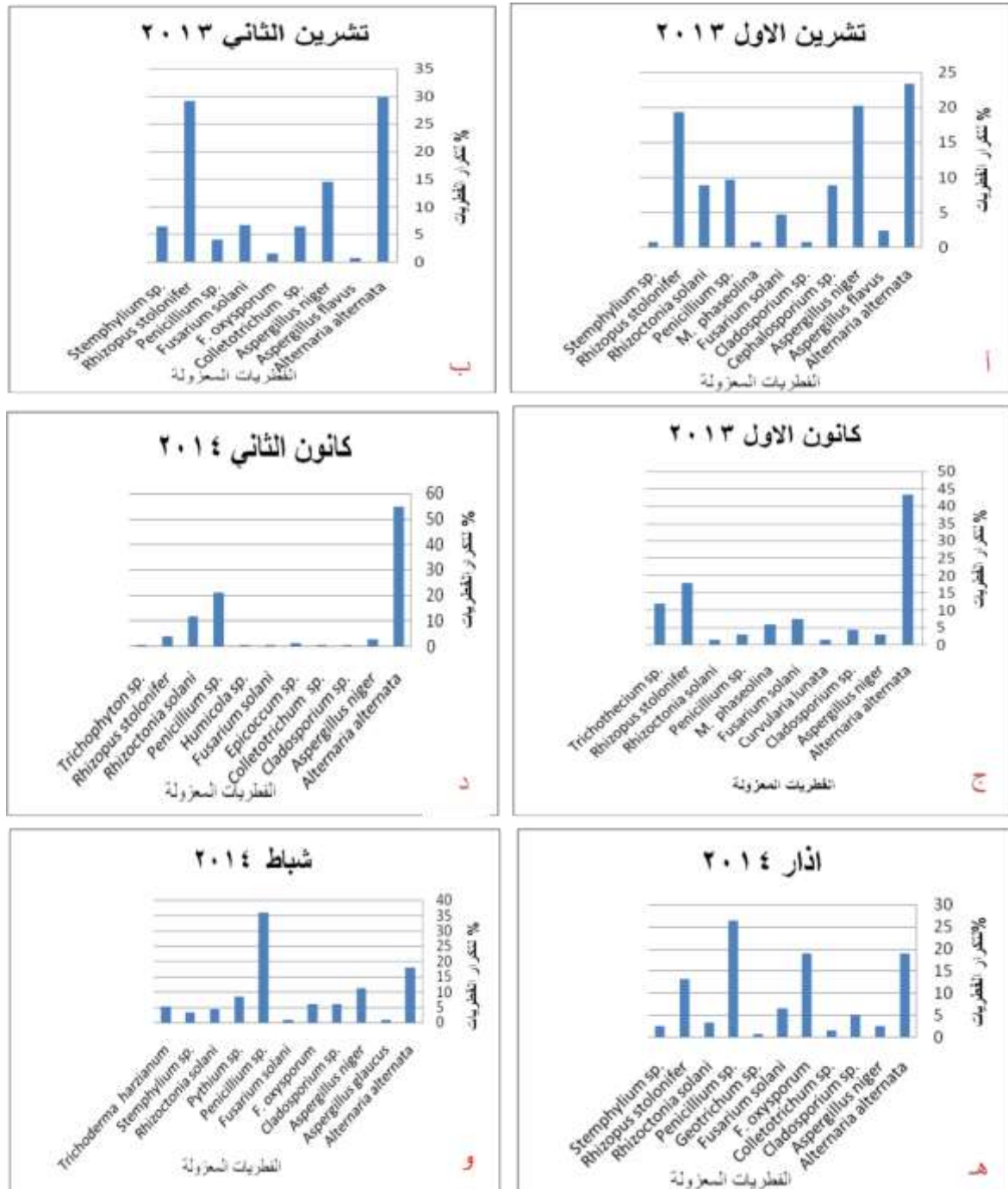
عزل 22 فطر من الخضراوات والفاكهة المصابة والمعروضة في الاسواق المحلية خلال ستة اشهر (تشرين الاول 2013 ولغاية اذار 2014) . الشكل (1) يبين الفطريات المعزولة خلال الاشهر الستة وهي *Alternaria alternata* و *Aspergillus glaucus* و *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* و *Cephalosporium sp.* و *Fusarium sp.* و *Cladosporium sp.* و *Colletotrichum sp.* و *Curvularia lunata* و *Humicola sp.* و *Geotrichum sp.* و *Macrophomina phaseolina* و *Penicillium sp.* و *Pythium sp.* و *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus stolonifer* و *Stemphylium sp.* و *Trichoderma harzianum* و *Trichophyton sp.* و *Trichothecium sp.* . عزل الفطر *Alternaria alternata* في اشهر تشرين الاول وتشرين الثاني و كانون الاول وكانون الثاني باعلى نسبة تكرار 43.4 و 30 و 54.6% على التوالي (الشكل أ ، ب ، ج ، د) بينما ظهر الفطر *Penicillium sp.* باعلى نسبة تكرار في اشهر شباط واذار 36 و 26.4% على التوالي (الشكل هـ ، و) فضلا عن فطريات *F. solani* و *Aspergillus niger* وكانت نسبة التكرار لها خلال شهر تشرين الاول ثم شهر تشرين الثاني 20.2 و 14.6% على التوالي مقارنة ببقية الاشهر وفطريات اخرى ظهرت لخمسة اشهر مثل *Cladosporium sp.* و *Rhizoctonia solani* (الشكل أ، ج، د، هـ، و) فضلا عن *Rhizopus stolonifer* (الشكل أ ، ب ، ج ، د ، و) بينما فطريات اخرى اقتصر ظهورها في شهر واحد فقط (*Aspergillus glaucus sp.* و *Cephalosporium sp.* و *Curvularia lunata* و *Epicoccum sp.* و *Geotrichum sp.* و *Humicola sp.* و *Pythium sp.* و *Trichophyton sp.* و *Trichothecium sp.*) .

الجدول (1) يبين الفطريات المعزولة من عينات الخضراوات التي تعود الى 7 عائلات نباتية ضمت 17 نوع من الخضراوات الموجودة في الاسواق المحلية ، كانت الفطريات الاكثر ظهورا تعود للجناس *Alternaria* و *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و *Rhizoctonia* و *Rhizopus* . من نباتات العائلة الخيمية *Ammiaceae* عزل الفطر *Alternaria alternata* من نباتي الجزر والكرفس (46.1 و 64.5%) فضلا عن الفطريات *Colletotrichum sp.* و *Epicoccum sp.* و *F. solani* و *Humicola sp.* و *Trichophyton* و *Stemphylium sp.* و *Penicillium sp.* و *Rhizoctonia solani* بينما من نبات الكزبرة عزل الفطر *Alternaria alternata* بنسبة عزل 100% . نباتات العائلة المركبة *Asteraceae* عزل منها الفطر *Alternaria alternata* بنسبة 100% من نبات الخس . اما من نباتات العائلة الصليبية *Brassicaceae* عزل من نبات الجرجير اربع فطريات منها الفطر *A. niger* بنسبة 38.4% والفطر *R. solani* 7.7% وعزل من القرنبيط فطر *Alternaria alternata* (64.3%) و *Rhizopus* (35.7%) اما من نبات اللهانة عزلت الفطريات *Penicillium sp.* و *A. niger* و *F. oxysporum* بنسبة 61.5 و 23.1 و 15.4% على التوالي . نباتات العائلة القرعية *Cucurbitaceae* عزل من الخيار 9 فطريات وبنسبة عزل للفطر *Alternaria alternata* 28.6% ، اما نبات قرع الكوسة عزل منه خمس فطريات هي *Alternaria alternata* و *A. flavus* و *Colletotrichum sp.* و *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus stolonifer* وكانت اعلى نسبة عزل للفطر *Rhizopus stolonifer* 63.3% . عزل من نباتات العائلة البقولية (الفراسية) *Fabaceae* ومنها نباتات الباقلاء فطريات *A. alternata* و *F. oxysporum* و *Geotrichum sp.* و *Penicillium sp.* و *Rhizopus stolonifer* و *Stemphylium sp.* ، وبلغت نسبة عزل الفطر *A. alternata* 37.5% ومن نباتات الفاصوليا فطر *A. alternata* بنسبة 100% .

عزل من الكراث (العائلة *Liliaceae*) فطريات *A. glaucus* و *Pythium sp.* و *Rhizoctonia solani* بنسب 6.7 و 66.6 و 26.7% على التوالي ومن البصل فطريات *A. niger* و *F. oxysporum* و *Penicillium sp.* بنسب 18.7 و 12.5 و 68.8% على التوالي.

عزل من الباذنجان (العائلة *Solanaceae*) فطريات *Alternaria alternata* و *A. niger* و *Cladosporium sp.* و *Penicillium sp.* و *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus stolonifer* وكانت نسبة عزل فطريات *Rhizopus stolonifer* و *Penicillium sp.* و *stolonifer* و *Alternaria alternata* 61.4 و 13.6% على التوالي بينما كانت نسبة عزل الفطر *Penicillium sp.* 2.3% ، ومن نباتات البطاطا تسع فطريات وان نسبة العزل للفطر *F. solani* 26.1% يليه الفطريات *Rhizopus stolonifer* و *Alternaria alternata* و *A. niger* بنسب 20.3 ، 16 ، 14.5% على التوالي واقل نسبة عزل للفطريات *A. flavus* و *Penicillium sp.* 1.4% . ومن نباتات الطماطة فطريات *Alternaria*

*Rhizoctonia solani* و *Penicillium sp.* و *F. oxysporum* و *F. solani* و *A. niger* و *alternata* واعطى الفطر *Alternaria alternata* اعلى نسبة عزل 65.1 % بينما كانت نسبة عزل فطريات *A. niger* و *Penicillium sp.* 1.6 % . ومن نباتات الفلفل فطريات *Alternaria alternata* و *A. niger* و *Penicillium sp.* وكانت نسبة عزل الفطر *Alternaria alternata* 56.8 % ثم الفطر *Penicillium* 27 % و اقل نسبة للفطر *A. niger* 61.2 % .



الشكل (1) يوضح الفطريات المعزولة من الفاكهة والخضراوات المعروضة بالأسواق خلال ستة اشهر

الجدول ( 1 ) الفطريات المعزولة من الخضراوات والمعروضة في الاسواق للفترة من تشرين الاول 2013 ولغاية اذار 2014 ونسب عزلها وحسب عائلاتها .

% للعزل	الفطر	الاسم العلمي	الاسم العربي	العائلات النباتية
46.1	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Daucus carota</i>	الجزر	Ammiaceae(Umbelliferae)
7.7	<i>Colletotrichum sp.</i>			
15.4	<i>Epicoccum sp.</i>			
7.7	<i>Fusarium solani</i>			
7.7	<i>Humicola sp.</i>			
7.7	<i>Trichophyton sp.</i>			
7.7	<i>Rhizoctonia solani</i>			
64.5	<i>A. alternata</i>	<i>Apium graveolens</i>	الكرفس	
3.3	<i>F. solani</i>			
3.2	<i>Penicillium sp.</i>			
29	<i>Stemphylium sp.</i>			
100	<i>A. alternata</i>	<i>Coriandrum sativum</i>	الكزبرة	
100	<i>A. alternata</i>	<i>Lactuca sativa</i>	الخس	Asteraceae (Compositae)
38.4	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Eruca sativa</i>	الجرجير	Brassicaceae (Cruciferae)
30.8	<i>Cladosporium sp.</i>			
23.1	<i>F. oxysporum</i>			
7.7	<i>R. solani</i>			
64.3	<i>A. alternata</i>	<i>Brassica oleraceal/cauliflower</i>	القرنبيط	
35.7	<i>Rhizopus stolonifer</i>			
23.1	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Brassica oleraceal/cabbage</i>	اللهاثة	
15.4	<i>F.oxysporum</i>			
61.5	<i>Penicillium sp.</i>			
28.6	<i>A. alternata</i>	<i>Cucumis sativus</i>	الخيار	Cucurbitaceae
7.1	<i>As. niger</i>			
10.7	<i>Cephalosporium sp.</i>			
3.6	<i>Cladosporium sp.</i>			
25	<i>F.oxysporum</i>			
10.7	<i>Penicillium sp.</i>			
3.6	<i>R. solani</i>			
3.6	<i>Rh.stolonifer</i>			
7.1	<i>Stemphylium sp.</i>			
13.3	<i>A. alternata</i>			
3.3	<i>As. Flavus</i>			
3.3	<i>Colletotrichum sp.</i>			
16.8	<i>R.solani</i>			
63.3	<i>Rh. stolonifer</i>			
37.5	<i>A. alternata</i>	<i>Vicia faba</i>	الباقلاء	Fabaceae (Leguminaceae)
25	<i>F. oxysporum</i>			
6.2	<i>Geotrichum sp.</i>			
12.5	<i>Penicillium sp.</i>			
6.3	<i>Rh. stolonifer</i>			
12.5	<i>Stemphylium sp.</i>			

100	<i>A. alternata</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	الفاصوليا	Liliaceae
6.7	<i>As. glaucus</i>	<i>Allium porrum</i>	الكرات	
66.6	<i>Pythium sp.</i>			
26.7	<i>R. solani</i>			
18.7	<i>As. niger</i>	<i>Allium cepa</i>	البصل	
12.5	<i>F. oxysporum</i>			
68.8	<i>Penicillium sp.</i>			
13.6	<i>A. alternata</i>	<i>Solanum melongena</i>	الباذنجان	Solanaceae
6.8	<i>As. niger</i>			
6.8	<i>Cladosporium sp.</i>			
2.3	<i>Penicillium sp.</i>			
9.1	<i>R. solani</i>			
61.4	<i>Rh. stolonifer</i>			
16	<i>A. alternata</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	البطاطا	
1.4	<i>As. flavus</i>			
14.5	<i>As. niger</i>			
8.7	<i>Cladosporium sp.</i>			
4.4	<i>F. xysporum</i>			
26.1	<i>F. solani</i>			
7.2	<i>Macrophomina phaseolina</i>			
1.4	<i>Penicillium sp.</i>			
20.3	<i>Rh. stolonifer</i>			
65.1	<i>A. alternata</i>			<i>Lycopersicon esculentum</i>
1.6	<i>As. niger</i>			
14.3	<i>F. oxysporum</i>			
12.7	<i>F. solani</i>			
1.6	<i>Penicillium sp.</i>			
4.7	<i>Rh. stolonifer</i>			
56.8	<i>A. alternata</i>	<i>Capsicum annum</i>	اللفل	
16.2	<i>As. niger</i>			
27	<i>Penicillium sp.</i>			

الجدول (2) يبين عزل الفطريات من الفاكهة المتوفرة في الاسواق المحلية لفترة الدراسة شملت اربع عائلات نباتية يعود اليها تسعة انواع من الفاكهة . عزل من ثمار الكيوي التابع للعائلة Actinidiaceae فطريات *A. niger* و *Rhizoctonia solani* بنسب عزل 6.7 و 93.3 % على التوالي . وعزل من ثمار الموز التابع للعائلة Musaceae فطريات *A. niger* و *Colletotrichum sp.* بنسب عزل بلغت 20 و 80 % على التوالي . عزل من نباتات العائلة Rosaceae منها ثمار الزعرور فطريات *A. niger* و *Penicillium sp.* بنسب عزل بلغت 42.9 و 57.1 % على التوالي . وثمار السفرجل فطريات *Alternaria alternata* و *Penicillium sp.* بنسب عزل بلغت 12.5 و 87.5 % على التوالي. وثمار الفراولة عزلت 8 فطريات وكانت اعلى نسبة مئوية للفطر *Penicillium sp.* بلغت 30.4 % يليه الفطريات *Alternaria alternata* و *Trichoderma harzianum* و *A. niger* بنسب عزل بلغت 13 و 11 و 19.6 % على التوالي و اقل نسبة للفطريات *Rhizoctonia solani* و *Stemphylium sp.* بلغت 4.3 % ، ومن ثمار التفاح تسع فطريات واعطى الفطر *Penicillium sp.* نسبة 38.3 % يليه الفطريات *Alternaria alternata* و *A. niger* و *Trichothecium sp.* بنسب 19.4 و 19.3 و 11.9 % على التوالي ثم الفطريات *Curvularia lunata* و *Rhizoctonia solani* و *Stemphylium sp.* بنسب 1.5 % . ومن ثمار الخوخ فطريات *Alternaria alternata* و *A. niger* و *Cephalosporium sp.* بنسب عزل (14.3 و 28.6 و 57.1 %) على التوالي . ومن ثمار اليوسفي فطريات *Alternaria alternata* و *A. niger* بنسب 87.5 و 12.5 % على التوالي . ومن ثمار البرتقال فطريات *Alternaria alternata* و *Penicillium sp.* و *Rhizopus stolonifer* بنسب عزل بلغت 11.1 و 85.2 و 3.7 على التوالي . مما سبق يتبين ان الفطريات *Alternaria alternata*

*Penicillium sp.* و *A.niger* هي اكثر الفطريات تكرارا من بين الفطريات الاخرى التي تم عزلها من الفاكهة المتواجدة في الاسواق المحلية .

ان الفطريات المعزولة من ثمار التفاح بعد الجني تدخل ابواغها بفعل الجروح الموجودة على الثمار من الحقل مثل *Penicillium* و *Rhizopus* و *A. alternata* و *Stemphylium* و *Cladosporium herbarium* في المملكة المتحدة وشمال اوربا ( Edney,1983 ) فضلا عن فطريات اخرى مثل *Trichothecium* و *Aspergillus* و *Trichoderma* (Snowdon ,1990) و *F. oxysporum* و (Chatanta et al.,2008) و *A.niger* (Oelofse etal A.niger) (Adisa, 1993) و *A.flavus* و (Yildz and Baysal , 2006) من ثمار الطماطة (2006) . عزل الفطر *A.niger* فضلا عن *Fusarium* و *Alternaria* (Oladiran and Iwu,1993) هي من الفطريات المسببة لتعفن ثمار الطماطة. فطر *A.niger* يسبب تلف ثمار البرتقال بعد الجني ( Bali et al. ,2008) . ويعد الفطر *Fusarium spp.* من الفطريات المحبة للرطوبة وبذلك يتواجد على الفاكهة ذات المحتوى العالي من الرطوبة مثل البرتقال (Tournas and Katsoudas ,2005) فضلا عن *Penicillium sp.* و *Rhizopus sp.* و *Alternaria sp.* (Bukar et al., 2009) . عزلت فطريات *Rhizopus stolonifer* و *Alternaria* و *Curvularia* من ثمار الخيار (Hoque and Shamsi ,2011)

ويعد الفطر *Colletotrichum musae* هو من الفطريات الممرضة لثمار الموز بعد الجني (Abd –Elsalam et al.,2010) . تعد فطريات *Rhizopus stolonifer* و *Mucor sp.* من الفطريات الممرضة الرئيسية لثمار الفراولة فضلا عن *Colletotrichum sp.* و *A. alternata* و *Penicillium* و *Cladosporium* (Snowdon,1990) . ان العديد من الفطريات تصيب ثمار الكيوي بعد الجني مثل *Colletotrichum sp.* و *A.alternata* و *Penicillium* (Sommer,et,al.,1994) . وجد ان الفطريات او ابواغها المقاومة المتصلة من الحقل وبعضها من ظروف الخزن يسبب تلوث الفاكهة والخضراوات وبالتالي تلفها (Jay ,2003) . ان المحتوى الرطوبي للفواكه والخضراوات هو احد العوامل الرئيسية التي تشجع نمو الفطريات (Hill and Waller,1999) و ظروف الخزن المختلفة قد تزيد من الرطوبة والحرارة للفواكه والخضراوات وبالنتيجة تشجع نمو الفطريات عليها (Ahmad ,2003) فضلا عن الظروف البيئية الخارجية مثل تطفل الحشرات والجروح التي تسهل دخول الفطريات وانتشارها ووجود المواد الغريبة مثل الرمل والغبار وبقايا الفاكهة التالفة الاخرى بينها (Dennis , 2002) .

الجدول(2) الفطريات المعزولة من الفاكهة ونسبة عزلها خلال الفترة من تشرين الاول الى اذار .

العائلات النباتية	الاسم العربي	الاسم العلمي	الفطر	% للعزل
Actinidiaceae	الكيوي	<i>Actinidia chinensis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	6.7
			<i>Rhizoctonia solani</i>	93.3
Musaceae	الموز	<i>Musa paradisiacal</i>	<i>Aspergillus niger</i>	20
			<i>Colletotrichum sp.</i>	80
Rosaceae	الزعرور	<i>Crataegus laevigata</i>	<i>Aspergillus niger</i>	42.9
			<i>Penicillium sp.</i>	57.1
			<i>Alternaria alternate</i>	12.5
الفراولة	السفرجل	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Penicillium sp.</i>	87.5
			<i>Alternaria alternate</i>	19.6
			<i>Aspergillus niger</i>	11
			<i>Cladosporium sp.</i>	8.7
			<i>Penicillium sp.</i>	30.4
			<i>Rhizoctonia solani</i>	4.3
			<i>Rhizopus stolonifer</i>	8.7
			<i>Stemphylium sp.</i>	4.3
			<i>Trichoderma harzianum</i>	13
			<i>Alternaria alternate</i>	19.4
			<i>Aspergillus flavus</i>	3
			<i>Aspergillus niger</i>	19.3
التفاح		<i>Malus domestica</i>	<i>Curvularia lunata</i>	1.5
			<i>Fusarium oxysporum</i>	3
			<i>Penicillium sp.</i>	38.3
			<i>Rhizoctonia solani</i>	1.5
			<i>Stemphylium sp.</i>	1.5

11.9	<i>Trichothecium sp.</i>			
14.3	<i>Alternaria alternate</i>	<i>Prunus domestica</i>	الخوخ	
28.6	<i>Aspergillus niger</i>			
57.1	<i>Cephalosporium sp.</i>			
87.5	<i>Alternaria alternate</i>	<i>Citrus reticulate</i>	اليوسفي	Rutaceae
12.5	<i>Aspergillus niger</i>			
11.1	<i>Alternaria alternate</i>	<i>Citrus sinensis</i>	البرتقال	
85.2	<i>Penicillium sp.</i>			
3.7	<i>Rhizopus stolonifer</i>			

الجدول (3) يبين كفاءة الفطريات المعزولة من الخضراوات والفاكهة المتوفرة في الاسواق المحلية للفترة من تشرين الاول 2013 ولغاية اذار 2014 على انتاج الانزيمات المحللة للجدر الخلوية . تم اختيار هذه الفطريات على اساس تكرارها خلال فترة الدراسة ، وتم التعرف على ضراوة انواع الفطريات المختلفة من خلال اجراء اختبار نوعي عليها لبيان قدرتها على انتاج انزيمات البكتينيز والسليوليز والاميليز .

اظهر التحليل الاحصائي (الجدول 3) وجود تباين بين الانواع الفطرية المختلفة في انتاج انزيم معين وكذلك الاختلافات للأنواع نفسها في انتاج الانزيمات المختلفة وقد اعطت (7) فطريات الانزيمات الثلاثة وهي *Aspergillus niger* و *Alternaria alternata* و *Curvularia lunata* و *Fusarium solani* و *Stemphylium sp.* و *Penicillium sp.* و *Rhizoctonia solani* بينما فطريات *Colletotrichum sp.* و *Fusarium oxysporum* و *Macrophomina phaseolina* غير منتج لانزيم الاميليز والفطر *Cladosporium sp.* غير منتج لاي من الانزيمات الثلاثة . لغرض التعرف على كفاءة الفطريات على انتاج انزيم البكتينيز استخدمت مادة البكتين كمداد اساس للوسط الصلب، اظهرت جميع الفطريات عدا فطر *Cladosporium sp.* كشفا موجبا لانتاج الانزيم من خلال ظهور هالة رانقة شفافة حول المستعمرة الفطرية دلالة على انتاج الانزيم وتحطيم البكتين (Hankin and Anagnostakis (1975). وقد اظهر الفطر *Macrophomina phaseolina* أعلى تحليل للانزيم يليه الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Curvularia lunata* و *Fusarium oxysporum* و *Aspergillus niger* و *Fusarium solani* على التوالي وظهر عدم وجود فروقات معنوية بين فطريات *Colletotrichum sp.* و *Penicillium sp.* و *Stemphylium sp.* و اقل انتاج للانزيم من قبل الفطر *Alternaria alternata* وعند اختبار كفاءة الفطريات على انتاج انزيم السليوليز استخدم الوسط الزراعي الصلب المحتوي على مادة الكاربوكسي مثيل السليوليز (CMC-Na salt) ، وأن ظهور منطقة رانقة حول المستعمرة الفطرية دليلا على تحلل (CMC-Na) بوساطة انزيم السليوليز المنتج من قبل الفطر وذلك لتحويل الكاربوهيدرات المعقدة الى سكريات بسيطة ويزداد قطر الهالة بزيادة قدرة الفطر على انتاج الانزيم وبعلاقة طردية (Ewad,etal.,1989)، اظهرت جميع الفطريات عدا فطر *Cladosporium sp.* كشفا موجبا لانتاج الانزيم واعطى الفطر *Fusarium solani* اعلى كفاءة في تحليل الانزيم يليه الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Colletotrichum sp.* و *Fusarium oxysporum* و *Curvularia lunata* و *Alternaria alternata* على التوالي ، فضلا عن عدم وجود فروقات معنوية بين الفطريات *Penicillium sp.* و *Macrophomina phaseolina* و اقل الفطريات كفاءة في تحليل الانزيم *Aspergillus niger* و *Stemphylium sp.* بدون فروقات معنوية بينهم.

الجدول (3) كفاءة الفطريات المعزولة من الخضراوات والفاكهة في انتاج الانزيمات المحللة للجدر الخلوية .

الانزيمات *			الفطريات
الاميليز	السليوليز	البكتينيز	
3.0d	5.7 e	** 1.7 g	<i>Alternaria alternata</i>
5.0 b	3.0 g	3.7 d	<i>Aspergillus niger</i>
0.0 f	0.0 h	0.0 h	<i>Cladosporium sp.</i>
0.0 f	8.7 c	2.3 f	<i>Colletotrichum sp.</i>
4.0 c	6.0 e	5.7 c	<i>Curvularia lunata</i>
0.0 f	8.0 d	4.0 d	<i>Fusarium oxysporum</i>
5.0 b	12.0 a	3.0 e	<i>Fusarium solani</i>
0.0 f	4.0 f	12.3 a	<i>Macrophomina phaseolina</i>
3.0 d	4.2 f	2.0 fg	<i>Penicillium sp.</i>
10.0 a	9.3 b	7.0 b	<i>Rhizoctonia solani</i>
1.2e	3.0 g	2.0 fg	<i>Stemphylium sp.</i>

\* وحدة الانزيم : كمية الانزيم التي تعمل على تكوين ملي مول واحد من الناتج / دقيقة.  
\*\* تمثل معدل ثلاث مكررات الأرقام المتبوعة باحرف متشابهة لكل عمود لاختلاف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5% .



استخدمت مادة النشا كمادة اساس للوسط الصلب لدراسة كفاءة الفطريات على انتاج انزيم الاميليز وعند ظهور الهالة الصفراء حول المستعمرة الفطرية دلالة على تكسر النشا الى سكريات بسيطة بينما يأخذ بقية الطبق اللون البنفسجي الناتج عن تفاعل النشا مع اليود وكلما زاد قطر الهالة الصفراء دل ذلك على زيادة نشاط الفطر لانتاج الانزيم (Gessner,1980)، اظهر الفطر *Rhizoctonia solani* كفاءة عالية في تحليل النشا يليه الفطريات *Fusarium solani* و *Curvularia lunata* ثم الفطريات *Alternaria alternata* و *Penicillium sp.* مع عدم وجود فروقات معنوية بينهم و اقل كفاءة لتحليل النشا تعود للفطر *Stemphylium sp.*

### Isolation and identification fungi from spoilage fruits and vegetables and study ability of it to produce enzymes lyase of cell wall

Hiba Hadi Taha

College of science / Biology department / University of Mosul

[Email: hiba.aldabbagh2017@yahoo.com](mailto:hiba.aldabbagh2017@yahoo.com)

#### ABSTRACT

The objective of this study was to isolate a potential fungi and characterize it from local markets fruits and vegetables during the period between October 2013 to March 2014 , 22 fungal strains were isolated as follow *Alternaria alternata* , three species of *Aspergillus sp.* *Cephalosporium sp.* , *Cladosporium sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Curvularia lunata* , *Epicoccum sp.*, two species of *Fusarium spp.*, *Geotrichum sp.*, *Macrophomina phaseolina* , *Penicillium sp.*, *Pythium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Stemphylium sp.*, *Trichoderma harzianum* and *Trichothecium sp.* . *A.alternata* and *Penicillium sp.* were most frequents during October ,November, December and January while *Penicillium* was most frequents during February and March. Observations showed that fungal species were significantly differed for their ability to produse Pectinase , Cellulase and Amylase . *Curvularia lunata* , *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizoctonia solani* , *Stemphylium*, were produced the three enzymes while *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina* and *Colletotrichum sp.*, produced both Pectinase and Cellulase , *Cladosporium sp.*, was predicted to be not produce of the three enzymes *Macrophomina phaseolina* predicted to be fungus to record highest activity for Pectinase test , low activity was recorded for Pectinase test with *Alternaria alternata* all isolated fungi showed positive response to Cellulase with one exeption *Cladosporium sp.*, highest activity for cellulase by *Fusarium solani* . *Rhizoctonia solani* recorded highest activity for amylase while *Stemphylium sp.* was the lowest.

Received: 5 /10 /2017 , Accepted: 12 /4/2018.

#### المصادر

- Abd-Elsalam ,K.A.;Roshdy,S.; Amin,O.E.;Rabani,M (2010).First morpho-genetic identification of the fungal pathogen *Colletotrichum musae* (phyllachoraceae) from imported bananas in Saudi Arabia. *Genet.Mol. Res.*,**9**,2335-2342.
- Adisa,V.A.(1993).Some extracellular enzymes associated with two tomato fruit spoilage molds . *Mycopathol.*,**91**,101-108.
- Ahmad,A.A.(2003).Susceptibility of date fruits to aflatoxin production .in : The International Conference on date palm ,16-19 September,2003,King Saud University, College of Agric .*Vet.Med.*, Qaseem Branch.P.395-407.
- Bali,R.V.;Bindu,M.G.;Chenga,R.V.;Reddy,K.(2008).Post harvest fungal spoilage in sweet orange (*Citrus sinensis* ) and acid lime (*Citrus aurentifolia* Swingla) at different stages of marketing .*Agric Sci Digest* .**28**,265-267 .
- Barkai-Golan,R.(2001)."Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables". *Elsevier Sci. B.V.* 418pp.
- Barnett , H.I. ; Hunter, B.B. (2006) . "Illustrated Genera of Imperfect Fungi" . Burgess Publishing Company . 241 pp.

- Bukar,A.;Mukhtar, M.D; Adamu ,S.(2009). Isolation and identification of postharvest spoilage fungi associated with sweet oranges (*Citrus sinensis*) traded in Kano metropolis . *Bayero J. Sci.*,**2** ,122-124.
- Chatanta,D.K.;Attri,C.;Gopal,K.;Devi,M.;Gupta,G.;Bhalla,T.C.(2008).Bioethanol production from apple pomace left after juice extraction. *J.Microbiol* .,**5**,2.
- Dennis,S.H.(2002)."Pests of Stored Products and Their Control". Belhaven Press, London,476 pp.
- Domsch , K.H .; Gams ,W.; Anderson, T.H . (1980) ." Compendium of Soil Fungi". *Academic Press* ,London. 859 pp .
- Edney, K.L. (1983)."Top Fruit In: C. Dennis (ed.) Post-Harvest Pathology of Fruits and Vegetables". *Academic Press*, London, . 43-71pp.
- Ellis, M.B. (1971) ." Dematiaceous Hyphomycetes" .Common Wealth Mycological Institute , Kew ,Surrey , England .603 pp.
- Ewad,M.J.S.;AL-Tai,A.M.;Abdul-Nour ,B.A.;AL-Attiyah,S.S.;Baban,R.S.(1989). Cellulase production from actinomycetes isolated from Iraqi soils :III ,Detection and quantitative assay of cellulase production by actionomycetes using Congo red staining of substrate. *J.Biol. Sci.Res.*,**20**,241-254.
- Gessner,R.V.(1980). Degradation enzyme production by Salt-marsh fungi. *Botanica Marina*, **23**,123-139.
- Gordon ,E;Anthon,Y.S.; Nobuo, W.;Diane ,M.(2002).Thermal inactivation of pectin methylesterase, Polygalacturonas, and peroxidase in tomato Juice . *J.Agric. Food Chem.*,**50**,6153-6159 .
- Hankin ,L;Anagnostakis ,S.L.(1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi .*Mycologia* ,**67**,597-607.
- Hill,D.S.; Waller,J.M.(1999)."Pests and Diseases of Tropical Crops" ,Vol.2 (ed) Longman ,Ghana .pp179-182.
- Hoque,J.;Shamsi,S.(2011).Study of fungi associated with some selected vegetables of Dhaka City . *J. Sci. Res. Bangladesh*, **24**,181-184.
- Ibrahim,S.;Rahma ,M.A.(2009) Isolation and identification of fungi associated with Date fruits (*Phoenix dactylifera* ,Linn.) Sold at Bayero University , Kano,Nigeria .*Bayero J. Sci.*, **2**,127-130.
- Jay,J.M.(2003). "Microbial Spoilage of Food". Modern Food microbiology.4<sup>th</sup> ed.Chapman and Hall Inc .NewYork, pp 187-195.
- Lebeda ,A.;Luhova,L.;Sedlakova,D.;Jankova,D.(2001). The role of enzymes in plant – fungal pathogens interactions .*J. Plant Dis. Prot.*, **108**,89-111.
- Leslie ,J.F.; Summerell, B.A. (2006) ."The *Fusarium* Laboratory Manual" . Black well Publishing . 388 pp.
- Nathalie ,J.(2006) .Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes .*Trends Plant Sci.*, **11**,359-367.
- Nur Ain Izzati ,M.Z .; Wan Hasmdida ,W.I. (2011) .Isolation of microfungi from malay traditional vegetables and secondary metabolites produced by *Fusarium* species. *Sains Malaysiana* ,**40**,437-444 .
- Oelofse, D.;Dubery, I.A.M.;Arendse, S.;Mm, S.;Gazendam ,I.; Berger, D.K. (2006) . Apple polygalacturonase inhibiting protein expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins . *Phytochem* .,**67**,255-263.
- Oladiran ,A.O. ;Iwu,L.N. (1993). Studies on the fungi associated with tomato fruit rote and effects of environment on storage . *Mycopathol.*, **121**,157-161.
- Petzinger ,E.; Weidenbach ,A. (2002) .Mycotoxins in the food chain :The role of ochratoxins . *Livest. Prod. Sci.*,**76**,245-250 .
- Pitt; J.L;Hocking ,A.D.(2009). "Fungi and Food Spoilage" 3th. Ed. .*Springer Sci.*519pp.

- Snowdon, A.L. (1990). "Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables", Vol. 1. General Introduction and Fruits, CRC Press, Inc., Boca Raton, 302 pp.
- Sommer, N.F.; Suadi, J.E.; Fortlage, R.J. (1994). Postharvest Storage Diseases. In: J. Hasey, R.S. Johnson, J.A. Grant and W.O. Reid (eds.), Kiwifruit Growing and Handling. Pub. 3349. University of California, Oakland, pp.116-122.
- Tomassini, A.; Sella, L.; Raiola, A.; D'ovidio, R.; Favaron, F. (2009) Characterization and expression of *Fusarium graminearum* endo – polygalacturonases *In Vitro* and during wheat infection. *Plant Pathol.*, **58**, 556-564.
- Tournas, V.H.; Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *Int. J. Food Microbiol.*, **105**, 11-17
- Yeoh, H.H.; Khew, E.; Lin, G. (1985). A simple method for screening cellulytic fungi. *Mycol.*, **77**, 161-162
- Yildiz, H. Baysal, T. (2006) . Effects of alternative current heating treatment on *Aspergillus niger*, Pectin methyl esterase and pectin content in tomato. *J. Food Eng.*, **75**, 327-332.

