الكشف عن الفطر اســـبرجلس وسمومه المرافقة لبذور وكسبة القطن وتقويم تأثيرها في انبات البذور

كامل سلمان جبر حميدة عباس الربيعي
كلية الزراعة- جامعة بغداد الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور- وزارة الزراعة

المستخلص

بينت نتائج العزل والتشخيص لانواع الفطر *Aspergillus* المرافقة لبذور القطن المحلوقة وغير المحلوقة والمأخوذة من 25 موقع في محافظات بغداد ونينوى وواسط وتأميم وصلاح الدين بطريقة اطباق الاكر مرافقة ثلاثة انواع من *Aspergillus* لبذور القطن غير المحلوقة وهي *A. flavus* و *A. niger* و *A. terrus* وكان اكثر الانواع تكرارا في العينات جميعها هو *A. niger* اذ بلغت اعلى نسبة له 85% اما بذور القطن المحلوقة يدويا فقد احتوت على الانواع الثلاثة ايضا كما حتل الفطر *A. niger* اعلى تكرار اذ بلغت اعلى نسبة له 70% وفي كسبة القطن تواجد الفطر *Aspergillus flavus* بمفرده بتكرار 1200 مستعمرة/غم في كسبة المستخلصة بطريقة المعاصر و200 مستعمرة/غم في الاستخلاص الكيمياوي وبين اختبار تاثير ست عزلات من الفطر *Aspergillus flavus* في بذور القطن مخزنياً ان جميع العزلات احدثت خفضاً معنوياً في نسبة الانبات والمحتوى الرطوبي وقوة الانبات وعدد البادرات غير الطبيعية خلال مدة الخزن 2و4 و6 اشهر. اذ تراوحت نسبة الانبات في معاملات العزلات الستة المختبرة 62.3-83.5 و58.0-83.0 و54.8-75.8% بعد 2و4و6 اشهر من العدوى على التوالي في حين كانت في معاملة القياس 89.0 و88.0و 86.0% على التوالي لنفس المدد اعلاه، والنسبة المئوية لقوة الانبات 19.0-24.0 و18.2-24.0و 17.2-20.8 على التوالي بنفس المدد اعلاه في حين كان في معاملة القياس28.6و26.3و25.0 على التوالي، ونسبة البادرات غير الطبيعية 12.3-24.5 و14.0-28.0و18.4-30.8 في حين كانت في معاملة القياس 10.8 و11.3 و13.3،والنسبة المئوية للمحتوى الرطوبي للبذور 7.9-9.7 و9.2-10.2 و11.6-14.0 في حين كانت في معاملة القياس وللمدد الثلاث على التوالي7.9 و9.7 و10.1 كذلك تبين تلوث بذور القطن والكسبة الناتجة من الاستخلاص الكيميائي والمعاصر بسم الافلا B1 ، وكان اعلى تركيز للسم في كسبة بذور القطن الناتجة من المعاصر120 جزء بالبليون، كما تبين ان لعزلات الفطر *A.flavus* المرافقة لعينات بذور القطن قابلية على انتاج سم الافلا B1 عند فحصها بطريقتي التألق الضوئي وTLC.

The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (4) : 1-14 (2008) Juber & Al-Rubaiee

DETECTION OF THE FUNGUS ASPERGILLUS AND ITS TOXINS ASSOCIATED WITH COTTON SEEDS AND CAKES AND EVALUATION OF THEIR EFFECTS ON SEED GERMINATION.

KAMIL S. JUBER HAMEEDA A. AL-RUBAIEE
COLLEGE OFAGRICULTURE - UNIVERSITY OF BAGHDAD

Abstract

Results of isolation and identification for the associated Asprergillus species with the fibrous and unfiber cotton seeds collected from 25 locations at Baghdad, Ninewa. Wasit, Taameem and Salah Al-din governorates using Agar plate method revealed an association of three Aspergillus species, *A. flavus* ,*A. niger* and *A. terrus* with the fibrous cotton seeds with the high frequency of *A. niger* in the seed samples, the high percentage for it reached 85%. while the unfibrous cotton seeds contain also the same above three species with high frequency of *A. niger*, at rate 70%. Only *A. flavus* was isolated from cotton cakes at rate 1200 colony/g from squeezing cakes and 200 colony/g by the chemical extraction. The test of six isolates of *A. flavus* on the stored cotton seeds for 2, 4 and 6 months significantly caused negative effect reduced the percentage of seed germination, moisture content, germination vigority and number of abnormal seedlings. The percentage of seed germination in the treatments of the six isolates ranged 62.3-83.5, 58.0-83.0 and 54.8-75.8% after 2,4 and 6 months of inoculation respectively, while it was in the control treatment 89.0,88.0 and 86.0% respectively for the same above periods. The percentage of germination vigority ranged 19.0-24.0, 18.2-24.0 and 17.2-20.8 respectively for the same above period while it was in the control treatments 28.6, 26.3 and 25.0 respectively. The percentage of abnormal seedlings where 12.3-24.5, 14.0-28.0 and 18.4-30.8 while it was in the control treatments 10.8,11.3 and 13.3, and the moisture content for the seeds 7.9-9.7, 9.2-10.2 and 11.6-14.0 while it was in the control treatments 7.9, 9.7 and 10.1 for the three periods respectively. Besides the results showed the contamination of cotton seeds and cakes produced by squeezing or by chemical extraction by the aflatoxin B1, with the highest concentration of the toxin was found in contaminated cotton seed cakes produced by squeezing extraction which was 120ppb. The results showed that isolates of *A. flavus* associated with cotton seed samples were able to produce aflatoxin B1 when they were examined by TLC and photobrightness methods.

Part of M. Sc. thesis of the second author البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة:

تعد الفطريات المرافقة لبذور القطن من المشاكل الكبيرة في عمليات التصنيع والخزن وقد يمتد تأثيرها الى الياف القطن(25). وفي دراسة امكن عزل 24 نوعاً من الفطريات وجدت في زيت القطن الخام والمكرر وكان الجنس *Aspergillus* اكثرها تواجدا في العينات المفحوصة ونسبته 100-62.5 % وكان النوع *A. niger* اكثر تكرار تليه الانواع *A. flavus* و *A.fumigatus* و *A.terrus* ومن خلال فحص كروموتوكرافي الطبقة الرقيقة اظهرت النتائج وجود سموم الافلا في عينات الزيت الخام وعدم وجوده في الزيوت المكررة(26). واشار Olsen و Silver tooth (33) الى ان الثقوب الناتجة عن تغذية ديدان جوز القطن تعد منافذ رئيسية لغزو الفطر *A.flavus* الى جوز القطن ومهاجمته لالياف القطن مؤدياً الى رداءتها وتغير لونها الى الاصفر مما يقلل من قيمتها التصنيعية. يعد الفطر *A. flavus* من اهم فطريات الخزن المنتجة للسموم الفطرية التي تؤدي دوراً كبيراً في تلف الحبوب والبذور المخزونة وخاصة البذور الزيتية كالقطن وفستق الحقل وفول الصويا . فقد اثبت Ashworth واخرون (8) ان اصابة بذور القطن في كارولينا بالفطر *A.flavus* تؤدي الى تلوث البذور بسم الافلا B1 قبل عملية الجني واظهرت الدراسة ان 168 عينة من بذور القطن الماخوذة من جوز القطن الذي جمع من مستويات مختلفة من النبات (الاجزاء السفلى والوسطى والعليا)ان الفطر *A.flavus* افرز سم الافلا B1 في 52 و 3و 6 % من العينات الماخوذة على التوالي وبلغ التلوث الكمي 44 جزء بالبليون وكمية قليلة و3 جزء بالبليون . وفي دراسة اخرى فحص فيها 972 عينة من بذور القطن وجد ان 39% من هذه العينات خالية من الافلاتوكسين لعدم تعرضها للامطار والعوامل البيئية الملائمة لافراز السم في حين تعرض 25% من العينات للامطار ادى الى ظهور السموم فيها بمقدار30 جزء بالبليون (7). كما اشار Ashworth واخرون(8) الى ان الالياف والبذور الموجودة في الجوز غير المتفتح تكون اكثر عرضة للاصابة بالفطر *A.flavus* ويعود سبب ذلك الى وجود الرطوبة . ان اصابة البذور المخزونة بالفطر *A.flavus* تعد احدى الأسباب التي تؤدي الى خفض النسبة المئوية لانبات البذور(9),ففي تجارب للتخزين ,عندما تمت المقارنة بين بذور خالية تماماً من فطريات التخزين ,وبذور مصابة بتلك الفطريات وجد ان البذور المخزونه في 85% رطوبة نسبية و30م, فقدت قدرتها على الأنبات خلال ست اشهر ,نتيجة لأصابتها بالنوعين *A.flavus* و *A.ruber* في حين احتفظت البذور غير المصابة بنسبة انبات تصل الى 95% (18). ووجد Sharma و Roy(36) ان من بين الفطريات التي تسبب تعفن جوز القطن هما الفطران :- *Aspergillus niger*، *A. flavus* . وفي المسح الذي اجراه Mahgoub و El-Tayeb (29) للفطريات التي تصيب الجوز وجدا ان انواع الفطر *Aspergillus* تشكل السيادة الاولى على الازهار في الأسبوع الأول من التزهير وقد عزلت اربعة انواع من الفطر بعد 7 اسابيع من التزهير وهي :- *A. fumigatus*، *A. flavus*، *A. niger*، *A. nidulans* . وتمكن عبد الله (5) من عزل ثلاثة أنواع من الفطر *Aspergillus* وهي *A. flavus* ، *A. niger*، *A. parasiticus* من بذور القطن بطريقة اطباق الاكر. وقد هدفت هذه الدراسة الى الكشف عن انواع الفطر *Aspergillus* المرافقة لبذور القطن وكسبته وتأثير النوع *A. flavus* على بذور القطن المخزونة والكشف عن السموم الفطرية في بذور وكسبة القطن وتحديد قابلية عزلاته على انتاج سموم الافلا B1.

المواد وطرائق العمل

عينات بذور وكسبة القطن:

تم الحصول على 25عينة من بذور القطن للموسم الزراعي لعام 2001 من الهيأه العامة لفحص وتصديق البذور والتي أخذت وفق الطرق العامة لاخذ العينات (24) عند اجراء التفتيش الحقلي في حقول القطن في محافظات بغداد ونينوى وواسط والتاميم وصلاح الدين وديالى . والتي تعد من اهم مناطق زراعة القطن في العراق . وبواقع 5كغم / عينة (جدول 1). وضعت العينات في اكياس من البولي أثلين ثبت عليها اسم المحافظة ومنطقة وتاريخ الجمع .نقلت العينات الى المختبر ووضعت في الثلاجة تحت درجة 4 م° لاجراء الدراسة عليها . اما كسبة بذور القطن فقد تم الحصول على عينتان منها العينة الاولى من مخلفات الاستخلاص الفيزياوي

(المعاصر) والثانية من الاستخلاص الكيمياوي (باستخدام اليكسان) للزيت في مصانع المنصور في بيجي التابع الى المنشأة العامة للزيوت النباتية للعام 2003وبمقدار 5كغم /عينة . وضعت العينات في اكياس من البولي أثلين واحكم غلقها ثم نقلت الى المختبر ووضعت في الثلاجة لاجراء الدراسة .

جدول .1. التوزيع المكاني والزماني لعينات بذور القطن المستخدمة في الدراسة .

رقم العينة	منطقة التجمع	تاريخ الجمع
1	بغداد – ابو غريب	2001/9/1
2	بغداد – الراشدية	
3	بغداد – الطارمية	
4	بغداد – سلمان باك	
5	ديالى – الغالبية	
6	نينوى – تل أعفر	2001/9/4
7	نينوى – ربيعة	
8	نينوى – الحضر	
9	نينوى – حمام العليل	
10	نينوى – سنجار	
11	واسط – الصويرة	2001/9/10
12	واسط – العزيزية	
13	واسط – الزبيدية	
14	واسط – النعمانية	
15	واسط – الحفرية	
16	التأميم – الحويجة	2001/9/1
17	التأميم – الرياض	
18	التأميم – تازة	
19	التأميم – ألتون كوبري	
20	التأميم – داقوق	
21	صلاح الدين – بيجي	2001/9/5
22	صلاح الدين – تكريت	
23	صلاح الدين – الدور	
24	صلاح الدين – الشرقاط	
25	صلاح الدين – سامراء	

عزل وتشخيص انواع الفطر Aspergillus المرافقة لبذور القطن بأستخدام طريقة أطباق الاكر Agar plate method:

أخذت 800بذرة من كل عينة بصورة عشوائية ، قسمت الى قسمين قسم ترك مع الزغب والثاني أزيل منه يدوياً . عقمت سطحياً بمحلول هايبوكلوريت الصوديوم (1% كلور حر) لمدة ثلاث دقائق . غسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثم جففت بورق نشاف معقم . وزرعت في أطباق بتري زجاجية قطر 9سم حاوية على وسط اكر الديكستروز والبطاطا Potato dextrose agar (PDA) بواقع 5بذرة لكل طبق . حضنت الاطباق على درجة حرارة ±25 2 م° ولمدة 5-7أيام فحصت جميع البذور تحت القوى الصغرى للمجهر المركب. وشخص الجنس اعتمادا على الصفات المزرعية والمظهرية لعزلاته. ونقيت العزلات بأعادة زراعتها على الاوساط الزرعية Czapek yeast extract (CYA)agar و Malt extract agar (MEA) (34)واعتماداً على طبيعة نمو المستعمرة ومعدل نموها وشكل الابواغ وطريقة حملها والتراكيب التي تكونها باستخدام المفتاح التصنيفي اللذي وضعه (34).

وتم حساب النسبة المئوية لتلويث البذور بكل فطر كما يأتي:-

$$\% \text{ للبذور الملوثة بالفطر} = \frac{\text{عدد البذور الملوثة بالفطر}}{\text{العدد الكلي للبذور (400)}} \times 100$$

تقدير الكثافة العددية لمستعمرات الفطر *Aspergillus* المرافقة لكسبة بذور القطن باستخدام طريقة التخافيف

لتقدير كثافة الفطريات المرافقة لكسبة بذور القطن اتبعت طريقة التخافيف .أخذ 10غم من كسبة بذور القطن على اساس الوزن الجاف (24) اذ تم طحن كمية من كسبة بذور القطن مع الزغب واخذ 10غم من المسحوق ووضع في علبة معدنية محكمة الغلق معلومة الوزن. وضعت العلبة في الفرن تحت درجة حرارة 103م° ولمدة 17ساعة بعدها تم اخراج العلبة من الفرن وتركت حتى تبرد في المجفف Desicator لمدة 30-40 دقيقة لمنع اكتساب الرطوبة اثناء عملية التبريد . وحسبت الرطوبة وفق المعادلات الاتية :-

وزن الوعاء مع العينة قبل التجفيف – وزن الوعاء مع العينة بعد التجفيف = الوزن المفقود

$$\text{النسبة المئوية للرطوبة} = \frac{\text{وزن الوعاء مع العينة قبل التجفيف- وزن الوعاء مع العينة بعدالتجفيف}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

وضعت كسبة البذور المذكورة انفاً في دورق مخروطي سعة 250مل وتم اضافة 90مل من محلول الببتون المذاب في الماء المقطر المعقم (1غم ببتون / لتر ماء مقطر معقم). ورج جيداً حتى يصبح المحلول متجانساً فيكون التركيز 1/10 .نقل 1 مل من هذا التركيز بواسطة ماصة معقمة الى دورق يحتوي على 9مل ماء مقطر معقم فيكون التركيز 1/100 وهكذا حتى الحصول على التخافيف المطلوبة . أخذ 1مل من كل تخفيف ووضع في طبق بتري قطر 9سم وصب عليه 15-20مل من وسط PDA المعقم والمبرد الى درجة 45م° المضاف اليه المضاد الحيوي Streptomycin 50ملغم / لتر PDA (8). حركت الاطباق حركة رحوية لمدة دقيقة واحدة .وقد استعملت أربعة اطباق كمكررات لكل تخفيف .واستخدمت اربعة اطباق اخرى اضيف لكل منها 1مل ماء مقطر معقم كمقارنة .وضعت الاطباق في حاضنة تحت درجة حرارة 25 ± 2 م° بشكل مقلوب . وبعد ثلاثة ايام فحصت الاطباق تحت القوى الصغرى للمجهر المركب وشخصت المستعمرات الفطرية الى مستوى الجنس ونقيت جميع المستعمرات بزراعتها على الاوساط الملائمة وشخصت الى مستوى النوع بأستخدام المفتاح التصنيفي الذي وضعه Pitt و Hocking (34).وحسبت اعداد المستعمرات الفطرية لكل فطر في 1غم كسبة وفق المعادلة الاتية :-

عدد المستعمرات الفطرية في 1غم كسبة = (معدل عدد المستعمرات المحسوبة في مكررات التخفيف – معدل عدد المستعمرات في المقارنة) × مقلوب التخفيف

تأثير تلقيح بذور القطن صنف كوكر 310 بالفطر *Aspergillus flavus* على انبات البذور بعد 2 و 4و6 أشهر من الخزن.

انتخبت ست عزلات للفطر *A.flavus* (جدول 2) ونميت على وسط الرز بعد تقدير نسبة الرطوبة فيه (39) اذ وضع 50غم من الرز في دورق زجاجية سعة 250مل واضيف لكل منها 27مل من ماء المقطر وعقمت مرتين في الموصدة على درجة حرارة 121م° وضغط 1.5كغم / سم 2 لمدة 20دقيقة في كل مرة ، بعدها لوثت الدوارق بعزلات الفطر *A.flavus* كل عزلة على حده وبمعدل قرصين قطر 5ملم من الوسط المزرعي الحاوي على نموات كل عزلة لكل دورق وتركت الدوارق المقارنة بدون تلويث . وضعت الدوارق في حاضنة تحت درجة حرارة 25±2م° ولمدة 21يوماً (37)مع تحريك الدوارق لمدة 15دقيقة يومياً لضمان التهوية وتوزيع النمو على جميع حبوب الرز داخل الدوارق . بعد انتهاء مدة الحضن وتكامل نمو العزلات داخل الدوارق ، افرغ محتواها داخل اكياس ورقية ولكل عزلة على حده مع غلق فتحات تلك الاكياس وتركت في جو الغرفة لحين جفافها ثم طحنت كل عزلة بمطحنة نوع Wiley mill standard model No.3 Arthar Thomas CO. تحوي على غربال حجم 1.5مش مع مراعاة التنظيف التام والتعقيم والغسل بالكحول وتركها حتى تجف بعد طحن الوسط الزرعي لكل عزلة .حفظت محتويات كل عزلة في كيس بولي اثلين في الثلاجة لحين استخدامها . أضيف 5غم من وسط العزلة المطحونة الى كغم واحد من بذور القطن وباربعة مكررات لكل عزلة ووضعت البذور الملوثة في اكياس قماش وحفظت في درجة حرارة الغرفة . حسبت نسبة الانبات وقوة الانبات ورطوبة البذور وعدد البادرات غير الطبيعية بعد 2و 4 و 6 اشهر من الخزن وفق ماتتبع في ISTA (24).

جدول. 2. عزلات الفطر *Aspergillus flavus* المستخدمة في الدراسة ومصادرها.

رقم العزلة	مصدرها
HA1	بغداد – ابو غريب
HA2	بغداد – الراشدية
HA3	بغداد – الطارمية
HA4	بغداد – سلمان باك
HA5	نينوى – تل عفر
HA6	نينوى – ربيعة

الكشف عن الافلاتوكسين B1 في بذور وكسبة القطن .

قدر الافلاتوكسين B1 في بذور وكسبة القطن في مختبرات الثروة الحيوانية بتتبع طريقة (35) اجري الفحص باستخدام نظام الفصل المتكون من كلوروفورم :داي اثيل ايثر : حامض الخليك 85 :15: 1.5 استغرقت عملية الفصل 60-45 دقيقة. فحصت صفائح الكروماتوكرافي الرقيقة تحت الاشعة فوق البنفسجية .

اختبار قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على انتاج أفلا B1

للكشف عن قابلية عزلات الفطر *A.flavus* على انتاج الافلا B1 انتخبت ستة عزلات من الفطر (جدول 3)وزرعت

بطريقة البوغ المنفرد للتاكد من نقاوتها وجرى الكشف باتباع طريقة (16) فحصت الصفائح تحت الاشعة الفوق البنفسجية، واجري التقدير الكمي للافلاتوكسين B1باستخدام جهاز المفراس الالكتروني .

جدول .3. عزلات الفطر Aspergillus flavus التي تم الكشف عن قابليتها على انتاج الافلاتوكسين B1

العزلة	العينة التي عزلت منها
AF1	2
AF2	7
AF3	13
AF4	20
AF5	21
AF6	كسبة القطن (استخلاص المعاصر)
AF7	كسبة القطن (استخلاص كيمياوي)

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص انواع الفطر *Aspergillus* المرافقة لبذور القطن باستعمال طريقة اطباق الاكر Agar plate method

اظهرت نتائج العزل والتشخيص مرافقة ثلاثة انواع من الفطر *Aspergillus* لبذور القطن غير المحلوجة (جدول 4) . وكان اكثر الانواع تكرارا في جميع العينات هو الفطر *Aspergillus niger* , اذ بلغت اعلى نسبة له 85 % ويعد الفطر *A. niger* من الفطريات التي تهاجم زهرة القطن في مراحل التكوين الاولى للجنين وهذا ما يفسر زيادة النسبة المئوية لوجوده , ويؤكد ذلك ما ذكره (29) من ان الفطر *Aspergillus* قد شكل السيادة الاولى على الازهار في الاسبوع الاول من التزهير واستنتجا ايضا بان الفطريات التي تصيب الجوز كانت هي نفسها التي تصيب الازهار , كما وجد الفطر *Aspergillus flavus* في سبع عينات وهو من اكثر الانواع المعزولة اهمية وقد بلغ معدل النسبة المئوية لتلوث البذور به 2.5 % وهذا يؤيد قدرة هذا الفطر على اصابة الازهار واستعمار الياف وبذور جوز القطن (33) ومن ثم ظهوره كملوث للبذور والكسبة فضلاً عن وجود افرازاته السمية سموم الافلا في الزيت الخام الناتج من تلك البذور. وقد تؤدي تلك الفطريات دوراً خطيرا مسببه تلف البذور تحت ظروف الخزن السيء اما بالنسبة الى بذور القطن المحلوجة يدوياً فتشير نتائج العزل والتشخيص الى مرافقة نفس الانواع الانفة الذكر للفطر *Aspergillus* للبذور(جدول 4) , وكان اكثر الانواع تكراراً الفطر *A. niger* 70 % كما وجد الفطر *A. flavus* في معظم العينات , و ان هذين الفطرين لهما القدرة على اصابة ازهار القطن ومن ثم الاجنة والبذور الناتجة عنها(29). وفضلاً عن اصابة الالياف التي يتحول لونها الى الاصفر نتيجة اصابتها بالفطر *Aspergillus flavus* (33) .

جدول. 4. انواع الفطر *Aspergillus* المرافقة لبذور القطن غير المحلوجة والمحلوجة باتباع طريقة اطباق الاكر Agar plate method

اسماء الفطريات	رقم العينة التي تحتوي على الفطر	% للتلويث	
		اعلى تكرار	المعدل
بذور القطن غير المحلوجة			
Aspergillus flavus Link ex Gray	23-20,17,16,3,2	4	2.5
A. niger Van Tieghem	24-21,19,17,16,13,11.10,8,6,4-2	85	24.2
A.terrus Thom	22-21	1	1
بذور القطن المحلوجة			
Aspergillus flavus Link ex Gray	25-21,12,10,8-1	10	3.6
A. nigerVan Tieghem	25-1	70	12.8
A. terrus Thom	21,18,16	3	2

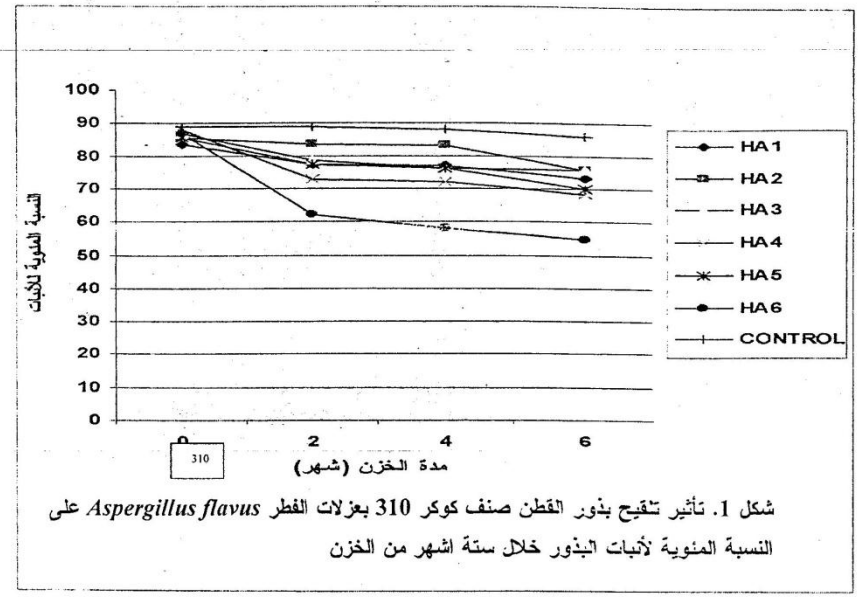
تقدير الكثافة العددية لمستعمرات الفطر *Aspergillus* المرافقة لكسبة القطن باستعمال طريقة التخافيف

اظهرت النتائج وجود النوع *A. flavus* في كسبة القطن الناتجة عن المعاصر وبمعدل 1200 مستعمرة/ غم وربما يعود سبب ذلك الى ان البذور لازالت تحتوي على الزغب بعد حلجها يدويا وعدم تعرضها الى تاثيرات كيميائية او حرارية عن طريق الاستخلاص كذلك تشير نتائج الاستخلاص بالطريقة الكيميائية الى وجود نفس الفطر في كسبة القطن بمعدل 200 مستعمرة/ غم وهو عدد منخفض مقارنة بطريقة المعاصر وربما يعود سبب ذلك الى تعرض البذور اثناء الاستخلاص وعلى الرغم من احتوائها على الزغب الى التأثير الكيميائي للمذيب العضوي الهكسان فضلا عن تأثير الحرارة عند غلي المزيج وايصاله الى 70 درجة مئوية كما تشير النتائج الى قدرة الفطر *Aspergillus* الى تحمل ذلك التأثير وبصورة عامة ان ظهور الفطر *A.flavus* في كلتا طريقتي الاستخلاص مرافقاً للكسبة يشير الى وجود سم الافلاتوكسين في الزيت الخام الناتج عن تلك البذور كما تشير المصادر فقد ذكر (31) تلوث الزيت الخام بسم الافلاتوكسين الناتج من بذور ملوثة بمجموعة فطريات *Aspergillus* .

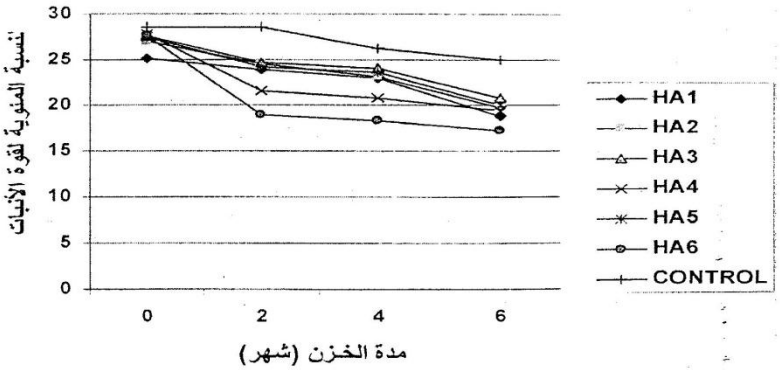
تأثير تلقيح بذور القطن صنف كوكر 310 بعزلات الفطر *Aspergillus flavus* في انبات البذور خلال ستة اشهر من الخزن

أظهرت النتائج بأن جميع العزلات احدثت تأثيرات سلبية معنوية ($P = 0.05$) في جميع المعايير المدروسة قياسا بمعاملة المقارنة غير الملوثة بالفطر (الاشكال 1-4)، فقد احدثت جميع العزلات المختبرة خفضاً معنوياً ($P = 0.05$) في نسبة الانبات خلال 2 و 4 و 6 أشهر من التلقيح اذ تراوحت نسبة الانبات في معاملة العزلات الستة المختبرة 62.3 -83.5 % و 58.0 -83.0 % و54.8 -75.8 % على التوالي في حين كانت النسبة في معاملة المقارنة 89 % و 88 % و86 % على التوالي لنفس المدد أعلاه . وقد تباينت العزلات في تأثيرها في نسبة الانبات فقد أحدثت العزلة HA6 أعلى خفضاً في نسبة الانبات اذ كانت نسبة الانبات في معاملتها 62.3 و 58.0 و54.8 % للمدد أعلاه على التوالي في حين أحدثت العزلة HA2 ادنى نسبة خفض في الانبات اذ كانت نسبة الانبات في معاملتيا 83.5 و 83.0 و 75.8 % للمدد أعلاه على التوالي(شكل1) .كما احدثت جميع العزلات خفضاً معنوياً ($P = 0.05$) في قوة الانبات وللمدد الثلاثة التي تم حساب النسب فيها (شكل 2) اذ تراوحت النسبة المئوية لقوة الانبات في معاملات عزلات الفطر سته المختبرة 19-24 و 18.2-24 و 17.2-20.8

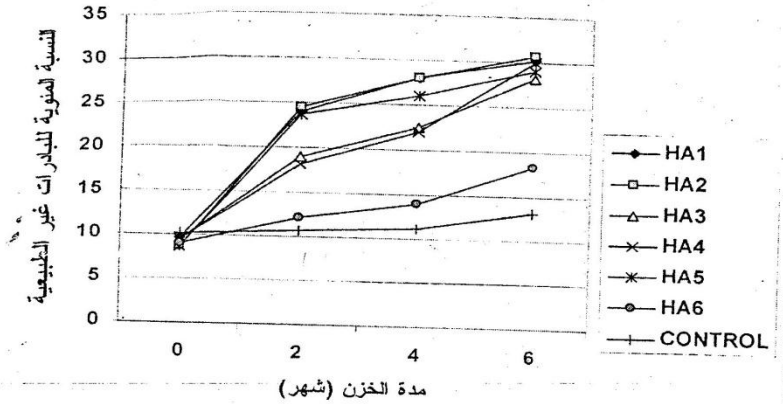
بعد 2 و 4 و 6 أشهر من التلقيح على التوالي في حين كانت في معاملة المقارنة 28.6 و 26.3 و 25.0 على التوالي لنفس المدد اعلاه . كما تباينت العزلات أيضاً في تأثيرها في قوة الانبات اذ أحدثت العزلة HA6 أعلى خفضاً في النسبة المئوية لقوة الانبات اذ تراوحت قوة الانبات في معاملتها وللمدد الثلاث على التوالي 19 % و 18.2 % و 17.2 % في حين احدثت العزلة HA3 ادنى نسبة خفض في قوة الانبات اذ كانت النسبة المئوية لقوة الانبات في معاملتها 24.8 و 24.0 و 20.8 %على التوالي لنفس الثلاث . كما أظهرت النتائج (شكل 3) ارتفاعاً معنوياً (P = 0.05) في النسبة المئوية للبادرات غير الطبيعية في معاملة جميع عزلات الفطر المختبرة قياساً بمعاملة المقارنة . اذ تراوحت نسبة البادرات غير الطبيعية في معاملة العزلات الستة المختبرة وللمدد الثلاث على التوالي 12.3 – 24.5 % و 14.0 – 28.0 % و 18.4 – 30.8 % في حين كانت في معاملة المقارنة وللمدد أعلاه على التوالي 10.8 % و 11.3 % و 13.3 % وقد تباينت العزلات في تأثيرها في البادرات وللمدد الثلاث اذ احدثت العزلة HA2 اعلى نسبة للبادرات غير الطبيعية اذ كانت النسبة في معاملتها ولنفس المدد الثلاث على التوالي 12.3 % و 14.0 % و 18.4 % في حين أحدثت العزلة HA6 ادنى نسبة اذ كانت النسبة المئوية للبادرات غير الطبيعية في معاملتها للمدد الثلاث على التوالي 24.5 و 28.0 و 30.8 .ان انخفاض نسبة البادرات غير الطبيعية في معاملة العزلة HA6 التي تفوقت على جميع العزلات في تأثيرها في النسبة المئوية للانبات وقوة الانبات ربما ناتج عن كون هذه العزلة قد تؤدي الى موت جنين البذرة وتؤدي الى تعفنها ومنعها من الانبات نتيجة للمركبات الايضية التي تنتجها والتي قد تشتمل على سموم او أنزيمات تنتشر الى داخل البذرة وتؤدي إلى قتل الجنين(12). ان تأثير الفطر A.flavus في البذور المخزونة وخفضه لنسبة الانبات وقوة الانبات وزيادة عدد البادرات غير الطبيعية امر اثبته العديد من الباحثين في محاصيل مختلفة كالبزاليا (18) والذرة الصفراء (28) والسمسم (20) والعصفر (22). وهذا ربما ناتج عن مهاجمة الفطر للاجنة مما يؤدي الى قتلها او خفض حيويتها وهذا ماأشار اليه (12) و(21). كما وجد(13) ان اجنة بذور القطن السليمة ذات لون ابيض كريمي الا ان خزنها تحت مستوى رطوبي اعلى من 20% ادى الى مهاجمتها بفطريات الخزن وخاصة الانواع التابعة للجنس *Aspergillus* مما ادى الى تلون الاجنة باللون البني الغامق. كما ان الفطر يفرز العديد من المركبات الايضية الثانوية ومنها السموم الفطرية وان اكثر هذه السموم انتشارا وخطورة هي سموم الافلا B1 التي تلعب دورا رئيسيا في خفض حيوية البذور اثناء الخزن (6) كما أدى نشاط الفطريات في البذور الى رفع معدل الرطوبة النسبية والذي ادى بدوره الى رفع المحتوى الرطوبي للبذور بشكل معنوي (P = 0.05) في معاملات جميع العزلات المختبرة قياساً بمعاملة المقارنة (شكل 4) اذ تراوحت النسبة المئوية للمحتوى الرطوبي للبذور في معاملة عزلات الفطر الستة خلال المدد الثلاث على التوالي 7.9 –9.7 و 9.2-10.2 و11.6-14.0 في حين كانت في معاملة المقارنة وللمدد الثلاث على التوالي 7.9 و 9.7 و 10.1. ان هذه النتائج جائت مطابقة لما وجده باحثين اخرين من ان بذور فستق الحقل المصابة بالفطر *A.flavus* والمخزونة بمحتوى رطوبي 15-30% قد ارتفع محتواها الرطوبي الى 20-31% بعد اربعة ايام من الخزن (14،15).



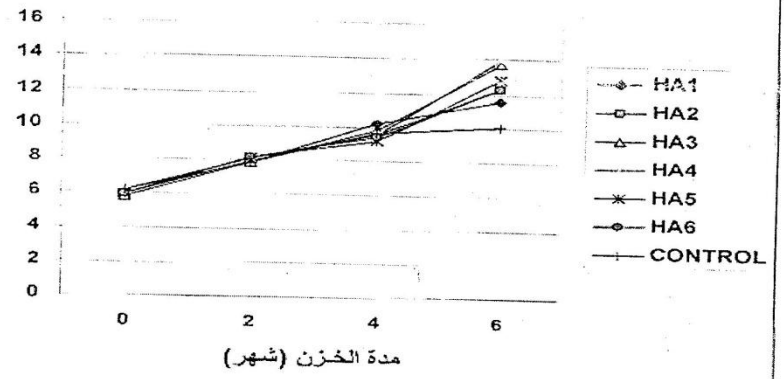
شكل 1. تأثير تنقيح بذور القطن صنف كوكر 310 بعزلات الفطر *Aspergillus flavus* على النسبة المئوية لأنبات البذور خلال ستة اشهر من الخزن



شكل 2. تأثير تنقيح بذور القطن صنف كوكر 310 بعزلات الفطر *Aspergillus flavus* على النسبة المئوية للبادرات غير الطبيعية خلال ستة اشهر من الخزن



شكل 3. تأثير تلقيح بذور القطن صنف كوكر 310 بعزلات الفطر *Aspergillus flavus* على النسبة المئوية للبادرات غير الطبيعية خلال ستة اشهر من الخزن



شكل 4. تأثير تلقيح بذور القطن صنف كوكر 310 بعزلات الفطر *Aspergillus flavus* على المحتوى الرطوبي للبذور خلال ستة اشهر من الخزن

الكشف عن سم الافلا B1 في بذور وكسبة القطن

أظهرت نتائج فحص خمس عينات من بذور القطن وكسبتي بذور القطن الناتجة من الاستخلاص الكيميائي والاستخلاص بوساطة المعاصر (جدول 5) تلوث بذور وكسبة القطن بسموم الافلا B1 . ان هذه النتائج تؤكد نتائج العزل اذ كان اعلى تكرار للنسب المئوية لتلوث العينات بالفطر *A.flavus* 12 و 20 و10 و20 و200 و1200 مستعمرة في كل 1 غم بذور او كسبة قطن على التوالي . وكان أعلى تركيز لسم

الافلا B1 في الكسبة المستخلصة من المعاصر اذ بلغ 120 ppb وربما يعزى ذلك الى عدم تعرض البذور الى تاثيرات كيميائية وحرارية عن طريق الاستخلاص بالمعاصر . اما انخفاض نسبة سم الافلا B1 في كسبة القطن الناتجة من الاستخلاص الكيميائي ربما ناتج عن التاثير الكيمياوي للمذيب العضوي الهكسان اثناء عملية استخلاص الزيت من البذور ومن ثم استخدام المذيب العضوي نفسه عند استخلاص السم من تلك الكسبة للمرة الثانية عند اجراء الكشف عن السم، الامر الذي ادى الى تعرض العينة الى عملية استخلاص الاولى لفصل الزيت والتي تم فيها استخلاص اغلب موادها والثانية عند الكشف عن السم. وهذه النتائج مطابقة لما وجده (27) من ان بذور القطن المعدة تجاريا كانت تحوي سموم الافلا B1 نتيجة نمو الفطر *A.flavus* على البذور المخزونة. يعد الفطر *A.flavus* من اهم فطريات الخزن المنتجة للسموم الفطرية وفي مقدمتها سم الافلا B1 وان هذه السموم تلعب دورا كبيرا في تلف الحبوب والبذور المخزونة وخاصة البذور الزيتية كالقطن وفستق الحقل وفول الصويا (26،23،17،10). فقد اثبت (8) ان اصابة بذور القطن بالفطر *A.flavus* في كارولينا ادت الى تلوث البذور بسم الافلاB1 قبل عملية الجني.

جدول 5. كمية الافلا B1 في عينات بذور وكسبة القطن الناتجة من الاستخلاص الكيميائي والاستخلاص بوساطة المعاصر .

العينة	كمية السم (PPb)
1 (بذور)	3.5
2 (بذور)	6.25
3 (بذور)	3.5
4 (بذور)	40
5 (بذور)	3.5
كسبة القطن (أستخلاص كيميائي)	6.25
كسبة القطن (أستخلاص بالمعاصر)	120

أختبار قابلية بعض عزلات الفطر *A. flavus* على انتاج سم الافلا B1

اظهر فحص سبع عزلات من الفطر *A. flavus* تحت الاشعة فوق البنفسجية قابليتها على انتاج سم الافلا B1 فضلا ان وجود تألق حول المستعمرات النامية يعد فحص موجب لقابليتها على انتاج الافلاتوكسين . وأكد الفحص بالتحليل الكيميائي والفصل على صفائح الكروماتوغرافي الطبقة الرقيقة . وعند تقدير كمية السم بأستخدام جهاز المفراس الالكتروني ان اعلى انتاج كان في العزلة AF6 واقل انتاج له في العزلة AF4 (جدول 6).وهذا يتفق مع ما ذكره (3) من ان عزلات الفطر *A. flavus* تنتج مستويات مختلفة من الافلاتوكسين ويعزى ذلك الى الاختلاف الوراثي بين العزلات في قابليتها على انتاج الافلا B1 . ويتفق هذا مع كثير من الدراسات التي اشارت الى تباين عزلات الفطر في انتاج السم (32،4،1)

جدول.6. كمية الافلا B1 المنتج من قبل سبع عزلات من الفطر *A. flavus* المعزولة من عينات بذور القطن وكسبته

العزلة	كمية السم/ PPb
Af 1	5.25
Af 2	15.50
Af 3	20.60
Af 4	3.15
Af 5	6.50
Af 6	26.92
Af 7	19.90

المصادر

1. الجنابي، سندس جميل .1998. تاثير بعض المواد الحافظة للاغذية في نمو الفطر *A.flavus* Link ex Fries وانتاجه للافلاتوكسين في الطحين. رسالة ماجستير. قسم علوم الحياة. كلية التربية . ابن الهيثم . جامعة بغداد .103صفحة.
2. العبودي ، هادي محمد كريم .2003. تاثير الكثافة النباتية والسماد الفوسفاتي في صفات النمو والحاصل والنوعية لبعض تراكيب القطن الوراثية (Gossypium hirsutum L.) رسالة ماجستير . قسم المحاصيل الحقلية. كلية الزراعة . جامعة بغداد .
3. الصلاحي، قائد مسعد عبد الله. 2003. الفطريات المرافقة لبذور الحنطة المستوردة واهميتها الامراضية. رسالة ماجستير. قسم وقاية النبات. كلية الزراعة . جامعة بغداد.
4. النزال، احمد اسماعيل احمد . 1996. التحري عن الافلاتوكسينات في الرز المحلي والمستورد وتقويم بعض طرق ازالة سميتها . رسالة ماجستير . قسم الصناعات الغذائية. كلية الزراعة . جامعة بغداد .96صفحة .
5. عبد الله ،عفيف محمد راجح .2003.الفطريات الممرضة والمنتجة للسموم المصاحبة لبذور القطن ومكافحتها . اطروحة دكتوراه . قسم وقاية النبات. كلية الزراعة والغابات . جامعة الموصل .
6. Allen , J. and E. Sweets .2004. Aflatoxin in corn . Missouri Agricultural Experimental station . Selta Research Center . Microsoft Internet Expolorer.
7. Ashworth , L.J., J.L McMeans. J.L Pyle. T.M Brown, J.W Osgool, and R.E. Poton .1968. Aflatoxin in cotton seed , influence of weathering on toxin content of seed and method for mechanical sorting seed lots. Phytopathology . 58 : 102-107.
8. Ashworth . J.L Mcmeans. and O.M Brown .1969. Infection of cotton by Aspergillus flavus time of infection and the influence of fiber moisture . Phytopathology . 59 : 383-385.
9. Bruegel, P. 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Council for Agriculture Science and Technology. Ames, Iowa, USA. pp217.
10. Castro , L. and A. V. Eugenia .2001. Determining aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in maize using florisil clean up with thin layer chromatography and visual densitometeric quantification. Tecnol. Aliment. 1(1):21(Abstract).
11. Christensen , C.M. 1973. Loss of viability in storage microflora , Seed Sci. and Technol. 1 : 547-562.
12. Christensen , C.M. and H.H. Kaufmann .1974. Microflora in storage of cereal grains and their products . Assoc. Cer. Chem. St. Paal, Minn, 158-192.
13. Christensen , C.M., .1991. Fungi and seed quality , in Handbook of applied mycology . vol. III , Food and Seed , Arora D.K., K.G. Mukerjii , and E.H. Marth, Eds., Marcel Dekker , New York. pp. 99.
14. Dicksen , J.W., and H.E. Patte .1966. The effects of time , temperature , and moisture on aflatoxin production in peanuts

peanut genotypes with reduced linoleic acid composition. Plant Dis. 84 : 148-150.

24. ISTA. 1999 . International rules for seed testing . Seed Sci. and Technol. 27, Supplement .pp. 333.

25. Kappelman , A.J. 1982. Resistance to Fusarium wilt pathogen in currently used cotton cultivars. Plant Dis . 66 : 837-839.

26. Leszczynska , J., J. Maslowska , A. Owczarek and U. Kucharska . 2000. Determination of Aflatoxin in food products by ELISA, Czech , J. Food Sci. 19 : 8-13.

27. Loosemore , R.M., R. Allcroft , E.A. Tutton and R.B. A. Carnlaglen .1964. The Presence of aflatoxin in a sample of cotton seed cake. Record, 76 : 64-65.

28. Lopez , L.C. and C.M. Christensin .1967. Effect of moisture content and temperature on invasion of stored corn by Aspergillus flavus. Phytopathology. 57 : 588.

29. Mahgoub , H. A , and M. N. El-Tayeb .1981. Preliminary survey of cotton flower mycoflora from Sudan . Trans. Br. Mycol. Soc. 76 : 367-370.

30. Mathew , J.L. 1981. In Agricultural outlook .. Committee on Agriculture , nutrition and forestry . U.S. Government printing office. Washington , D.C.P. 183. (C.F. J. Am. Oil Chem. Soc. 1983. 60 : 360-367).

31. Mazen , M.E. , I.A. El-Kady and S. Saber .1990. Mycoflora and mycotoxins of cotton seed oil in Egypt. Suez – canal Univ. Ismaileyah (Egypt). The fourth Egyptian Conference of Botany . Part 1 : Microbiology . Ismaileyah . Apr. 1985. P. 124-133.

32. Miller , J.D. and H.L. Trenholm .1994. Mycotoxins in grain compounds other than aflatoxin . Eagan Press , st. Paul. Minnesota. pp. 195.

33. Olsen , M and J.S. Silvertooth .2001. Diseases and production problems of cotton in Arizona . Cooperative Extension , College of Agriculture and Life Science , the University of Arizona , Tucson , Arizona 85721, AZ 1245 . P. 16

34. Pitt , J.I. and A.D. Hocking .1997. Fungi and food spolage , Blackie Academic and Professional , 593 pp.

inoculated with atoxic strain of Aspergillus falvus. (C.F. Goldblatt , L.A. 1969. Aflatoxin : Scientific Background , Control , and Implications. Academic Press . New York and London , pp. 472.

15. Diener , U.L., and N.D. Davis .1967. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acid by Aspergillus flavus in sterile peanuts. J. Am. Oil Chemists Soc. 44 : 259-263.

16. Dorner , J.W., R.J. Cale and P.D. Blankship .1992. Use of Biocompetitive agent to control preharvest Aflatoxin in drought stressed peanut , J. of Food Protection. 55 : 888-892.

17. Duncan , H.E. and J. R.Hagler .2000. Aflatoxins and other mycotoxin . North Carolina State University . http://souextra. Com/pdfs/CR-2105 Web. Pdf. Microsoft internet Explorer.

18. Fields , R.W. and T.H. King .1962. Influence of storage fungi on the deterioration of stored pea seed. Phytopathology. 52 : 336-339.

19. Halloin ,J .M. .1975. Post-harvest infection of cotton seed by *Rhizopus arrhizus* , *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. Phytopathology 65: 1229-1232.

20. Hammad , A.A. I., M.M. Ragab , E.A. Zaher , and A.A.M. Shahin .1995. Effects of fungal infection and irradiation on high moisture sesame seed. Asean food J. (Malaysia). 10 (4):119-124.

21. Harman , G.E. and G. Nash .1972. Derterioration of stored by Aspergillus ruber : evidence for involvement of atoxin . Phytopathology , 62 : 209(Abstract).

22. Hasan , H.A.H. 1999. Mycoflora and changes of safflower , wheat and faba bean seed quality during the storage . Rostlinna vyroba-UZPI. V. 45 (2). P. 85-91. (Abstract).

23. Holbrook , C.C., D.M. Wilson , M.E. Matheron, J.E. Hunter , D.A. Knauft , and D.W. Gorbert .2000. Aspergillus colonization and aflatoxin contamination in

35. Pons , W.A., L.S. Lee and L. Stoloff .1980. Revised method for aflatoxin in cotton seed products and comparison of thin-layer and high performance liquid chromatography determinative steps. Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63 : 899-906.

36. Sharma , R.B. and A.N. Roy .1979. Boll rot of cotton from Agra. Current Science 48 : 413-414.

37. Shotwell , O.L., C.W Hessettine and R.D. Stubblesorenson .1966. Production of Aflatoxin on rice. Appl. Microbiol. 14 , 425-428.

38. Simpson , M.E.. P.B. Marsh, G.V. Merola, R.J. Ferrett, and C.E. Filsinger. 1973. Fungi that infect cotton seed before harvest. Applied Microbiology 26 : 608-613.

39. West , S., R.D. Wyatt and P.B. Hamilton .1973. Improved yield of aflatoxin by incremental increases of temperature . Appl. Microbiol. 25 : 1018-1019.