عزل وتشخيص الفطريات المسببة لتعفن ثمار نبات الفلفل الاخضر ودراسة قدرتها على انتاج انزيمات Protease و Lipase

اعداد

د هبة هادي طه أ.د/ اديبة يونس شريف

ايمان محمد طاهر

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

Doi: 10.21608/asajs.2020.88552

استلام البحث : ١٥ / ٢ / ٢٠٢٠ قبول النشر: ٢٥ / ٤ / ٢٠٢٠

المستخلص :

هدفت الدراسة الى عزل أنواع من الفطريات المسببة لتعفن ثمار نبات الفلفل الاخضر ، جمعت ٣٠ عينة من ثمار الفلفل الاخضر (*Capsicum annuum* L.)من الاسواق المحلية لمدينة الموصل ، تم عزل ٧ اجناس فطرية من هذه الثمار وهي *Alternaria alternata* (٧٨) عزلة و (29) *Aspergillus niger*عزلة و *Aspergillus flavus* (14) عزلة و *Geotrichum candidum*(11) عزلة و *Rhizopus stolonifer* (١٠) عزلة و *Rhizoctonia solani* (٦) عزلة و*Penicillium* sp. (4) عزلة ، وبنسب مختلفة وكانت اعلى نسبة مئوية للعزل كانت للفطر *Alternaria alternata* ٥١,٣ % . وللتحري عن بعض عوامل امراضيتها للنبات تم التحري عن قدرة الانواع المعزولة لانتاج الانزيم المحلل للبروتين من قبل الفطريات المعزولة ووجد ان الفطر*Alternaria alternata* كان اكثر الفطريات انتاجا للانزيم يليه الفطر *Aspergillus niger* وبنسبة % اما الفطر *Geotrichum candidum* فلم يظهر القدرة لانتاج الانزيم . اما بالنسبة لانتاج الانزيم المحلل للدهون فقد لوحظ ان الفطريات *Penicillium* sp. و *Rhizopus stolonifer* و*Alternaria alternata* و *Aspergillus niger*كان لها القابلية على انتاجه بينما لم تظهر الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Aspergillus flavus* و*Geotrichum candidum* القابلية على انتاجه .

كلمات مفتاحية : ثمارالفلفل الاخضر، الفطريات ، انزيم البروتتيز ، انزيم اللايبيز .

Abstract :

The study aimed to isolate the types of fungus that cause the rotting of green pepper fruits , 30 specimens of green pepper (*Capsicum annuum L*.) were collected from the local markets of Mosul. Seven fungal strains of these fruits were isolated: *Alternaria alternata* (78) isolation and *Aspergillus niger* (29) isolation and *Aspergillus flavus* (14) *Geotrichum candidum* (11) Isolation and *Rhizopus stolonifer* (10) Isolation and *Rhizoctonia solani* (6) Isolation and *Penicillium* sp. (4) Isolation, with different percentages The highest percentage of isolation was for fungi *Alternaria alternata* 51.3%. To investigate some of the plant's disease factors, the ability of isolated species to produce the proteolytic enzyme was investigated by isolated fungi, *Alternata alternaria* was found to be the most common fungus of the enzyme, followed by *Aspergillus niger* but *Geotrichum candidum* can not produce this enzyme . As for the production of lipolytic enzyme it has been observed that the fungus *Penicillium* sp. ,*Rhizopus stolonifer*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus niger* had the ability to produce it, while *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus* and *Geotrichum candidum* did not show the ability to produce it.
Key words : the fruits of green pepper , Fungi ,Protease , Lipase.

المقدمة

ينتمي نبات الفلفل الاخضر للعائلة الباذنجانية Solanaceae التي تتضمن الطماطة والبطاطا وغيرها من المحاصيل، وهو يزرع في انواع مختلفة من الترب. (Nuraddeen *etal*. ,2015) يعد الفلفل الاخضر من الخضراوات

المهمة لاحتواءه على كميات كبيرة من الفيتامينات خاصة فيتامين A وC (Wagner *etal*.,2001; Sharfun –Nahar *etal*.,2004). والفينولات المتعددة والكلوروفيل والكاروتينويدات فضلا عن العديد من الزيوت الاساسية (Yahaya *etal*.,2017). يستخدم الفلفل الاخضر بشكل طازج او مطبوخ ، ويستخدم مع الخضار لتحضير الحساء ، ويستخدم الفلفل المجفف كتوابل لاغراض الطهي وفي الطب يعد منبها قويا وطاردا للريح وهو يحافظ على الصحة . فضلا عن انه يمنع امراض القلب ويمنع تجلط الدم وله خواص كمانع للاكسدة (Lema *etal*., 2018) .

ويشير مصطلح التعفن Spoilage الى تكاثر الكائنات المجهرية غير المرغوبة في الغذاء وتجعله غير صالح للاستهلاك البشري (Nester *etal*.,1995). وان الفعالية الميكروبية تعد مهمة في تلف الاغذية (Batzing,2002) وهناك عدد كبير من الكائنات المسببة لتعفن ثمار الفلفل وتعد الفطريات الاكثر اهمية مها فطريات *Penicillium,Aspergillus, Alternaria* وبعض الفطريات الزايكوتية مثل *Mucor* و *Rhizopus* وهذه الانواع من الفطريات تنتج عدد من السبورات والتي تنتشر في اي مكان في مناطق نمو الثمار ونقلها وبذلك فان اي ضرر قد يحدث للثمار يؤدي الى اصابتها في مراحل الحصاد الى الاستهلاك (Campbell ,1985). وقد تبين ان الفطريات تدخل انسجة المضيف من خلال الفتحات مثل الثغور والعديسات ومن خلال الطبقة الطلائية السليمة من خلال تكوين انابيب النمو (Ewekeye *etal*.,2014) . وقد تحمل بعض الثمار العديد من الممرضات والتي قد تحدث الاصابة وتتكاثر خلال التخزين وبذلك تقلل من قيمة المنتج التسويقية (Kenneth *etal*.,2017) . اذ تم عزل *Aspergillus niger* و *Fusarium moniliforme* و *Fusarium oxysporum* و *Colletotrichum aeianum* و*Bipolaris Zeicola* وشكل *Aspergillus niger* اعلى النسب (Ainyemi and liamngee,2018).

تعد الافات والامراض من العوامل المهمة التي تؤثر على الانتاج الامثل بسبب الفقدان الضخم في كلا المجالين في الحقل وفي التخزين ، تتضمن الامراض الموجودة في التربة وتلك التي تؤثر على الجذور والسيقان واخرى تؤثر على الاوراق والثمار وهذه الامراض تسببها انواع من البكتريا وفطريات

وفايروسات ، والتي تختلف من بلد لاخر اعتمادا على الظروف المناخية وعوامل الضراوة للكائنات الممرضة (Agrios , 2005) .

يعرف التعفن على انه تلف الاغذية مما يقلل من قيمتها او قد تصبح غير نافعة ، هذا المصطلح يتسبب عن الكائنات المجهرية التي تخترق الاغذية وتجعلها غير امنة للاستهلاك البشري ، هناك العديد من الكائنات المسببة للتعفن تصيب الفلفل وتكون الفطريات هي الاكثر اهمية ،فضلا عن صفات الفطريات التعفنية ، حيث هناك العديد من فطريات *Penicillium* و *Aspergillus* و *Alternaria* وبعض الفطريات الزايجوتية خاصة *Mucor* و *Rhizopus* تنتج العديد من السبورات وتتواجد على العديد من الثمار في المزرعة تستفيد من وجود اي ضرر او كدمات فتهاجم هذه الفاكهة في اي مرحلة ابتداءا من الحقل الى حين وصولها للمستهلك (Fatimoh ,2017: Lema,2018) . سجلت اصابات ثمار الفلفل من قبل Fatimoh *etal*. ، ٢٠١٧ بالفطريات *Rhizopus* ، *Aspergillus niger*، *Alternaria alternata* ، *stolonifer*، *Fusarium solani* ، *Geotrichum candidum* . *Mucor*كما سجلت دراسات اخرى من قبل Imarenezor *etal*. ، ٢٠١٧ اصابات ثمار الفلفل بالفطريات *Aspergillus niger* ، *Aspergillus nidulans* ، *Aspergillus fumigatus* ، *Penicillium sp.*، *Fusarium oxysporium* .

تنتج الاحياء المجهرية التي لوحظت على سطح الفواكه والخضر التي قد يكون مصدرها من التربة العديد من الانزيمات الخارجية المحللة تعتمد عليها في امراضيتها منها انزيمي البروتييز واللاييز Nagaraju and) Divakar,2012) . والتي تلعب دورا مهما في ميكانيكية ضراوتها خلال دورة نمو الكائن الممرض ، اذ يسهل البروتييز المفرز قدرة الفطر على الاختراق والانتشار في المضيف وتحليل الحواجز الميكانيكية للمضيف (Hueck, 1998)

اضافة الى دوره في استعمار العائل من خلال تثبيط الاليات الدفاعية للمضيف وتعد بعض الانزيمات المحللة للبروتين من انظمة السيطرة النوعية والتي تكون مسؤولة عن تعطيل دفاعات المضيف ويسهل الاصابات البكتيرية وهناك العديد من الانزيمات الحالة للبروتين والتي لها ادواراً تنظيمية لاستجابات معينة للمرضات للتغييرات البيئية وتشجع حدوث الاصابة بانواع

البكترية ، كما ان هذه الانزيمات تعد مكونات مهمة لنظام السيطرة على نوعية البروتين والتي تعد المسؤولة عن الحفاظ على الدفاعات الخلوية والتي يتم تعطيلها وبذلك تسهل حدوث الاصابات البكتيرية (Gimenezetal.,2014) . وان الاصابة الناجحة تقترح وجود اليات في الممرضات النباتية والتي تؤدي الى اختراق الانسجة والاستعمار (Valueva ,*etal*.,2016) .

مواد وطرائق العمل

١- جمع العينات :

تم جمع ٣٠ عينة من ثمار الفلفل الاخضر من الاسواق المحلية المختلفة لمدينة الموصل .

٢- عزل الفطريات من ثمار نبات الفلفل الاخضر :

عزلت الفطريات من ثمار نبات الفلفل الاخضر بعد غسلها بالماء وذلك بنقل 1سم^{٢} من المنطقة المصابة بالفطريات وعقمت بمحلول هايبو كلورات الصوديوم ١% ثم غسلت بالماء النقطرالمعقم وجففت بين ورقتي ترشيح معقمة ، وبواقع ٥ قطع وزرعت على اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar الحاوي على المضاد الحيوي سلفات الستربتومايسين بنسبة ٥٠ ملغم / لتر وحضنت الاطباق مدة ٧ ايام بدرجة حرارة ٢٨ C° (Chiejina ,2008) .

٣- تشخيص الفطريات المعزولة :

بعد نمو الفطريات على الوسط الغذائي ، اخذت اجزاء صغيرة بوساطة ابرة الزرع من حافة كل مستعمرة فطرية وزرعت بصورة مفردة على اوساط غذائية لغرض الحصول على مزارع نقية للفطريات و تشخيصها ، وبعد نمو هذه الفطريات فحصت بالمجهر الالكتروني وشخصت اعتمادا على المفاتيح التشخيصية للفطريات (Gilman ,2012 ; Barnett and Hunter ,2006).

حسبت النسبة المئوية لتردد الفطريات حسب المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد مستعمرات النوع الفطري}}{\text{العدد الكلي لمستعمرات الانواع الفطرية}} * ١٠٠$$

٤- اختبار انتاج انزيم Protease من قبل الفطريات المعزولة :

حضر الوسط من المواد الاتية : الاكار المغذي الصلب Nutrient agar ٩٥٠ مل والجلاتين كمادة اساس ، حضر محلول الجلاتين بتركيز ٨% في الماء المقطر وعقم بشكل منفصل ثم اضيف الى الاكار المغذي المعقم بمقدار ٥ مل / ١٠٠ مل ووزع في اطباق بتري وترك ليجمد، نقل قرص من كل فطر بوساطة ثاقب الفلين بقطر ٠,٥ ملم ووضع وسط طبق بتري الحاوي على الوسط المحضر وبواقع ٣ اطباق لكل فطر حضنت الاطباق بدرجة حرارة C° ٢٨ مدة ٧ ايام مع المشاهدة المستمرة .

تم الكشف عن انزيم البروتييز باضافة كاشف Fraziers reagent المتكون من:

$Hgcl_2$ ٥غم ، HCl ٢٠ مل ، ماء مقطر ١٠٠ مل . اضيف الكاشف الى الاطباق وترك مدة ٥ دقائق ثم سكب ، وثم التحري عن الهالة الشفافة حول المستعمرة الفطرية المنتجة لانزيم البروتييز وتم قياس نشاط الفطر المنتج للانزيم بقياس عرض الهالة مقاسا بالمليمتر (Hankin and Anaguostakis ,1975) .

٥-اختبار انتاج انزيم Lipase من قبل الفطريات المعزولة :

احضر الوسط المستخدم في اختبار انتاج Lipase من المكونات الاتية : Peptone ١٠ غم ، $CaCl_2.2H_2O$ 0.1 غم ، NaCl ٥ غم ، Agar ٢٠ غم، Tween20 ١٠ مل كمادة اساس ، Distal Water ١٠٠٠ مل ، عقم الوسط بجهاز المؤصدة ، عقمت مادة Tween 20 بصورة منفصلة وبردت ثم اضيفت الى بقية مكونات الوسط المعقم بمقدار ١مل / ١٠٠ مل وصب في اطباق بتري وترك ليجمد ، ثم نقل قرص من كل فطر بوساطة ثاقب الفلين بقطر ٠,٥ ملم ووضع وسط طبق بتري حاوي على الوسط المحضر وبواقع ٣ اطباق لكل فطر حضنت الاطباق بدرجة حرارة C° ٢٨ مدة ٧ ايام مع المشاهدة المستمرة .

تم التحري على قدرة الفطر على انتاج انزيم اللايبيز من خلال ظهور راسب ابيض او بلورات بيضاء تحت المستعمرة (Gopinath *etal* ,2005) .

النتائج والمناقشة

عزلت ٧ أجناس فطرية من ثمار نبات الفلفل الاخضر والمأخوذ من الاسواق المحلية لمدينة الموصل *Alternaria alternata* و *Aspergillus*

niger و *Aspergillus flavus* و *Geotrichum candidum* و *Rhizopus stolonifer* و *Rhizoctonia solani* و *Penicillium* sp. وكانت اعلى نسبة مئوية للعزل للفطر *Alternaria alternata* ٥١,٣ %يليه الفطر *Aspergillus niger* ١٨,١% والفطر *Aspergillus flavus* ٩,٢ % على التوالي كما مبين في(الجدول ١) .

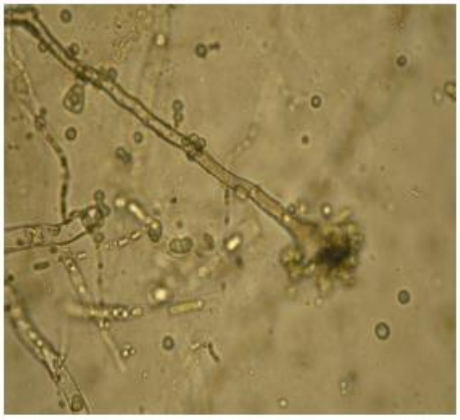
الجدول (١) يبين النسبة المئوية لعزل الفطريات

Table (1) : Shows the percentage of isolation of fungi

النسبة المئوية للعزل % The percentage of isolation	الفطريات fungi
٥١,٣	*Alternaria alternata*
١٨,١	*Aspergillus niger*
٩,٢	*Aspergillus flavus*
٧,٢	*Geotrichum candidum*
٦,٦	*Rhizopus stolonifer*
٤,٠	*Rhizoctonia solani*
٢,٦	*Penicillium* sp.

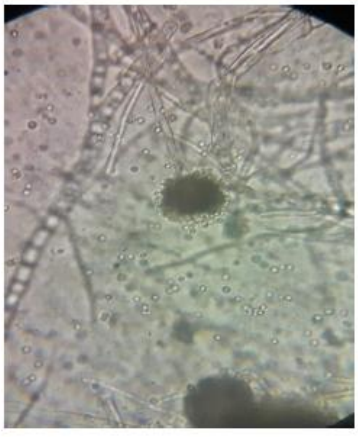
وان تكرار تواجد هذه الفطريات وخاصة فطر *Alternaria alternata* على ثمار الفلفل يدل على امتلاكه العديد من عوامل الضراوة التي تمكنه من غزو الثمار واحداث الاصابة التي تظهر بشكل بقع سوداء وقد يكون اول عامل ضراوة تمتلكه هو الانزيمات المحللة للجدر الخلوية او قد يكون بسبب انتاج هذه الانواع الفطرية للسموم الفطرية المختلفة التي تؤدي الى حدوث اضرار في الثمار وتكاثر الفطر في انسجتها ، ومنها سموم الاقلا المفرزة من فطر *Aspergillus flavus* اما الفطريات الاخرى التي ظهرت بنسب اقل من الفطرات السابقة ايضا لها تاثيرات وعلامات مرضية على الثمار ومنها الفطر *Alternaria alternata* بنسب عالية في الحقل وقد تفرز مواد تؤثر على هذه الانواع الاخرى من الفطريات مما يقلل من نسب ظهورها على ثمار الفلفل او قد يعود السبب الى انتاج نبات الفلفل عوامل ضراوة تقاوم هذه الانواع من الفطريات بالمقارنة مع الانواع الاخرى .

Doi:10.21608/asajs.2020.88552

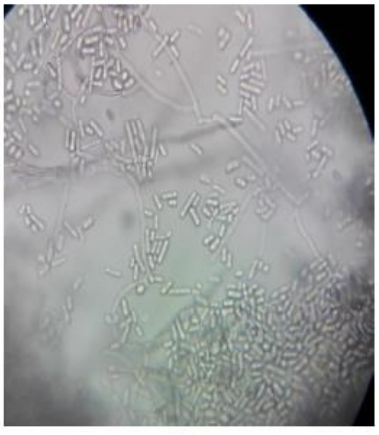


Aspergillus flavus

Rhizoctonia solani

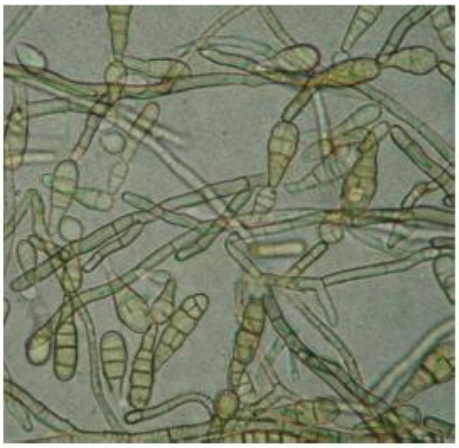


Aspergillus niger

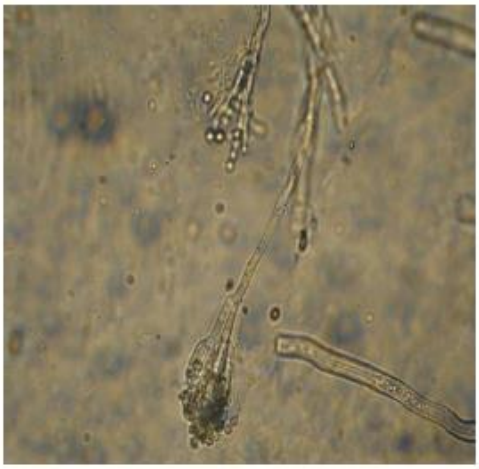


Geotrichum candidum

Rhizopus stolonifer



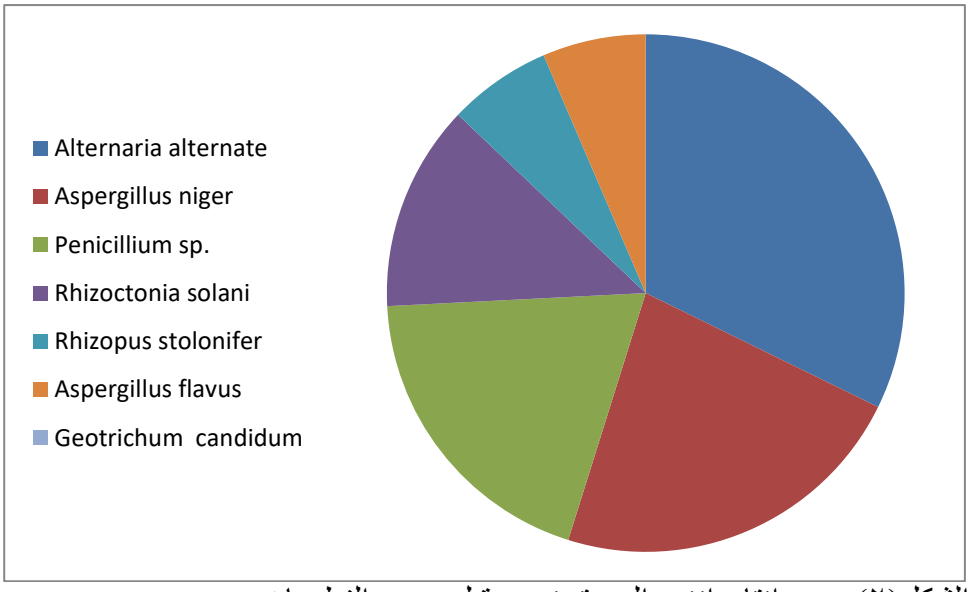
Alternaria alternata



Penicillium sp.

الشكل (١) : يبين الفطريات المعزولة من ثمار نبات الفلفل الاخضر .

Figure(1) : Shows the fungi isolated from the fruits of green pepper



الشكل(٢): يبين انتاج انزيم البروتييز من قبل بعض الفطريات

Figure(2) : Shows the Protease enzyme production by some fungi

اوضحت النتائج ان الفطر *Alternata alternata* على الوسط المستخدم ادى ظهور هالة شفافة حول المستعمرة بقطر ٥ ملم حيث كان اكثر الفطريات انتاجا للانزيم يليه الفطر *A.niger* وبقطر ٣,٥ ملم ثم الفطر *penicillum* sp. بقطر ٣ ملم والفطريات *Rhizictonia solani* و Rhizopus و *A.flavus* وباقطار ٢ ملم و ١ ملم و ١ ملم على التوالي ، اما الفطر *Geotrichum candidum* فكان غير محلل لانزيم Protease وقد يكون اجتياح فطر *Alt. Atternata* لثمار الفلفل الاخضر بكثرة مقارنة مع بقية الفطريات يعود لانتاجه انزيم البروتييز بكمية اكبر من البقية وان هذا الانزيم يعد من عوامل الضراوة للفطريات لانه من الانزيمات المحللة للجدر الخلوية مما يمكن الفطر من استعمار النسيج النباتي والتكاثر بداخله .

الجدول (٢) : يبين انتاج انزيم اللايبيزمن قبل بعض الفطريات
Shows the Lipase enzyme
Table (2) : production by some fungi

الفطريات Fungi	انتاج انزيم اللايبيز production of lipase
Alternaria alternata	+
Aspergillus niger	+
Penicillium sp.	+
Rhizoctonia solani	+
Rhizopus stolonifer	-
Aspergillus flavus	-
Geotrichum candidum	-

+ انتاج الفطريات لانزيم اللايبيز

عدم انتاج الفطريات لانزيم الايبيز

الجدول الثاني يوضح قابلية الفطريات على تحلل الدهون ، حيث لوحظ ان بعض الفطريات ادت الى تحليل الدهون مثل الفطريات *Penicillium* sp. و*Rhizopus stolonifer* و *Alt.alternata* و*A.niger* اما بقية الفطريات مثل *Rhizoctonia solani* و *A.flavus* و *Geotricum candidum* فلم تظهر القابلية على تحليل الدهون قد يعود السبب الى ان هذه الفطريات قد تنتج انزيم Lipase بكميات قليلة جدا او لاتفرزها نهائيا اما الفطريات التي انتجت الانزيم فتعد احد عوامل ضراوتها وامراضيتها واصابتها للثمار حيث انها كانت منتجة لانزيم Protease فضلا عن انتاجها انزيم Lipase القادر على تحليل الدهون حيث تعد الدهون من مكونات الجدر الخلوية ايضا وبذلك كلما كانت الفطريات قادرة على انتاج انزيمات محللة للجدر الخلوية زادت امراضيتها لانها تعد الخط الاول لغزو الفطر للثمار وتحليله للجدر الخلوية وبذلك تمكنه من الدخول الى الانسجة الداخلية وامتصاص المواد الغذائية منها وتحليلها وفسادها، وبالتالي تصبح غير صالحة للمستهلك وتسبب خسائر اقتصادية بسبب هذه الفطريات والتي اقد يكون مصدرها من الحقل و بعد الحصاد اثناء النقل والتخزين خاصة للانواع المستوردة (Barth,*etal*.2009) .

References

AgrIos,G.N. 2005 .Plant Pathology.5th Edition Elsevier inc.pp962.

Akinyemi,B.K. and K. Liamngee 2018. Isolation and Identification of Fungi Causing Decay in Pepper (Capsicum spp) from Selected Markets in Makurdi, Asian Journal of Research in Crop Science 1(2): 1-6 .

Barth,M., T.R.Hankinson, H. zhuang and F. Breidt 2009. Microbiological spoilage of fruits and vegetables. Springer scence food microbiology and food safety ,pp.135-183.

Barnett,H.L., B.B. Hunter 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi Burgess publishing company 241pp.

Chiegina ,N.V. 2008 . Mycoflora of some Salad Vegetables. Biological Resarch, 6(2):392-395 .

Ewekeye. T. S.,O.A. Oke, A.I.Quadri, A.O.Isikalu, M.O. Umenwaniri and M. L.Durosinmi 2013. Studies on post harvest deterioration of some fruits and vegetables in selected markets in Lagos State, Nigeria. American Journal of Research Communication, 1 (10): 209-223

Fatimoh,A.O. A.A.Moses, O.B.Adekunle, O.E. Dare 2017. Isolation and Identification of rot fungi: on post-harvest of pepper (Caps:Cum annum L.). fruits.Journal of Biology 3(5):24-29.

Gilman ,J.E. 2012. Amanual of soil fungi Biotech.Books/Astral inter national (p) Ltd.pp:400.

Gopinath,S.C.B., P. Anbu and A. Hilda 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated form oil rich environments Mycoscience.

Gimenez-Ibanez, S., M. Boter, G.Fernández-Barbero, A. Chini, J.P.Rathjen and R. Solano 2014 . The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in Arabidopsis. PLoS Biology 12(2) : e1001792 .

Hankin,L. and S,L.Anagnostakis 1975. The use of Solid Media for Detection of Enzyme production by fungi: mycologia,67:(3), pp.597-607.

Hueck, C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 379–433.

Kenneth,P., O. E. Augustine , E.Daniel 2017 .Identification of Fungi Allied with the Rot of Unripe Pepper (Capsicum annuum) Grown in Wukari, Taraba State, Nigeria. International Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. 4(4): 22-25.

Lema,A.A., A.Mudansiru, B.A. Alexander, and M.J.Sakinatu 2018. Evaluation of Fungal species isolated from three different Varieties of pepper (Capsicum chinense ,C.frutescens and C.annum L.) in Dutsin-Ma ,Katsina state.Annals of Biological Sciences 6(1): 13-17 .

Nuraddeen ,w., S.H. Bawale , S. Zakariya 2015. Isolation and identification of fungi associated with fruit rot of sweet pepper (capsicum annum L.) In sokoto

Nigeria . Katsina journal of naTural and applied sciences 4:1

Nahar,S., M. Mushtaq and I. .pathan 2004. Seed-borne mycoflora of capsicum annuum imported from india, pak,j.bot.,36(1) : 191-197.

Nagaraju, E.V. and G.Divakar 2012. Screening and characterization of protease producing Bacillus Spp. From Spoiled Vegetables and fruits .IjAPBC 1(4):495-488

Nester ,E. W. and N. Roberts 1995. Microbiology: A human perspective WMC Brown Publishers, England, p 718-719.

Wagner A., A.strudz iñaka, M.kaweeka 2001. Grezy by zasiedlajace nasiona, liščie iowoce papryki Dstrej(Capsicum annumL.) .zesz. Nauk. AT-R Bydg.234,Roln.46:139-143.

Valueva, T. A., B. Ts. Zaichik, and N. N. Kudryavtseva 2016. Role of Proteolytic Enzymes in the Interaction of Phytopathogenic Microorganisms with Plants, Biochemistry (Moscow), Vol. 81(13): 1709-1718.

Yahaya,S.M., D.Mukhtar, M.U.Ali , M.Lawan, A.M.Ibrahim, L.A.Amina, A.M.Tasiu, A. B. sadiya, M.D.Maimuna, and M.j. Musa 2017. Susceptibility to fungal in fection :Acomparison between Capsicum annum and capsicum frutescens . Africon journal of microbiology Research 11(34):1355-1359.