تأثير التعريض للأشعة فوق البنفسجية في إنتاج السكر المتعدد والسم للفطر *Alternaria alternata* المعزول محلياً♦

محمد بشير إسماعيل عصام داود سليمان

قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل

ABSTRACT

Conidial spores of the fungus *Alternaria alternata* isolated from winter tomato fruits in Mosul were exposed to different periods of ultra violet light in order to test its effects on polysaccharide and toxin yield of the fungus. Production of polysaccharides were induced on the selective medium when exposed to (120) minutes of U.V. light and reached(3.78 g/ l) in shaken cultures .All mutated isolates inhibited toxin production.

الخلاصة

تم تعريض الابواغ الكونيدية للفطر *Alternaria alterenata* المعزول من ثمار الطماطة الشتوية في مدينة الموصل لفترات مختلفة من الأشعة فوق البنفسجية لغرض معرفة تأثيرها في إنتاجية السكريات المتعددة والسم الفطري. وقد تحفز إنتاج الفطر من السكريات المتعددة في الوسط الغذائي المنتخب عند تعريضها للأشعة لمدة(120) دقيقة وبلغ (3.78 غم/لتر) في المزارع المهتزة ، كما انعدم إنتاج السم في جميع العزلات المطفرة من الفطر.

المقدمة

تعد السكريات المتعددة والسموم الفطرية من نواتج الايض الثانوي للكائنات المجهرية ومنها الفطريات (1) وبذا ستكون شأنها شأن المنتجات الأخرى واقعة تحت السيطرة الجينية بحيث يمكن التأثير على كمية المنتج منها عن طريق التأثير على الجينات المسيطرة على إنتاجيتها من خلال تطفير هذه الجينات .

هناك العديد من العوامل الفيزياوية أو الكيمياوية التي يمكنها ان تتفاعل مع إل DNA (الجينات) وتحورها (تطفرها) ويطلق على هذه العوامل اسم المطفرات Mutagens (2).

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

وتعد الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول ألموجي في حدود 260 nm واحدا من أوسع المطفرات الفيزياوية استعمالا في ميدان البحث الوراثي (3). لذا فقد جرت محاولة في البحث الحالي لاستخدام الأشعة فوق البنفسجية للتأثير على إنتاجية الفطر *Alternaria alterenata* من السكريات المتعددة والسم الفطري.

مواد وطرائق العمل

الكائن المجهري وتحضير اللقاح

استخدمت عزلة الفطر *Alternaria alterenata* التي تم عزلها من ثمار الطماطة المصابة بمرض التبقع وذلك بغسل الثمار تحت تيار الماء الجاري لازالة الاوساخ العالقة بها . ثم اخذت المنطقة المصابة وقطعت الى قطع صغيرة متساوية الابعاد بطول (0.5 سم) وغمرت في محلول (1%) هايبوكلورات الصوديوم مدة ثلاث دقائق. بعد ذلك غسلت القطع بماء مقطر ومعقم وجففت بين اوراق ترشيح معقمة ونقلت بواسطة ملقط معقم الى اطباق بتري معقمة بقطر(9 سم) حاوية على الوسط الغذائي المعقم PSA المضاف اليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول بمعدل(10 ملغم/ لتر) وبمعدل خمس قطع للطبق الواحد موزعة توزيعا منتظما. حضنت الاطباق على درجة حرارة (27± 1 م°)ولمدة (2-5) ايام، بعدها فحصت ثم عزلت النموات الفطرية من القطع ا لمصابة .

تشعيع الفطر *A. alternata*

بالنظر لعدم توفر دراسات تطفيرية باستخدام اشعة U.V. في هذا الفطر فقد قمنا بتحديد الظروف المناسبة للحصول على افضل تكرار من الطافرات وذلك بتثبيت مسافة التعريض وتغيير فترة التعريض. تم تحضير ابواغ لقاح الفطر *A. alternata* بإضافة (5 مل) من الماء المقطر المعقم الى مزارع مائلة للفطر بعمر(7) ايام ورجها جيدا للحصول على معلق ابواغ الفطر بتركيز (2.1×10^8) الذي ينقل الى اطباق بتري صغيرة معقمة بقطر (5 سم) . عرضت الاطباق بصورة عمودية للاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز Desaga – Heidelberg-Minuvis وعلى بعد (12سم) من مصباح للاشعة فوق البنفسجية بطول موجي (260 نانوميتر) وبوساطة ماصة معقمة Micropipett تم سحب (100 مايكرو ليتر) وعلى فترات زمنية مختلفة كانت على التوالي(5 ، 10 ، 15 ، 20 ، 25 ، 30 ، 40 ، 50، 60 ، 75 ، 90 ، 105 و 120 دقيقة) .

نقل محلول معلق الابواغ الى سطح وسط غذائي صلب من اكار البطاطا والسكروز (PSA) في طبق بتري حجم(9 سم) ثم فرش على سطح الوسط باستخدام قضيب زجاجي بشكل حرف L ، وعمل لكل فترة من فترات التعريض ثلاث اطباق وفي نهاية كل فترة تم

سحب الاطباق وغلفت برقائق الالمنيوم بصورة جيدة وتركت لمدة ساعتين وذلك لتجنب حدوث اعادة التنشيط الضوئي Photo-reactivation . وضعت الاطباق في الحاضنة على درجة(27 ± 1 ْم). ولوحظ ظهور المستعمرات الفطرية النامية لحساب اعدادها في كل طبق. وتم حساب النسبة المئوية للقتل من المعادلة الاتية (4) :

$$\text{النسبة المئوية للقتل} = \frac{\text{عدد المستعمرات في المقارنة} - \text{عدد المستعمرات في المعاملة}}{\text{عدد المستعمرات في المقارنة}} \times 100$$

بعد ذلك لقح الوسط الزرعي المنتخب للفطر باقراص من المستعمرات المشععة للفطر لتقدير انتاجيتها من السكر المتعدد.

الوسط الغذائي

تم تحديد مكونات الوسط الغذائي القياسي الذي تم تركيبه اعتمادا على النتائج السابقة وهي (غم / لتر): السكروز(30)، اليوريا(0.7)، مستخلص الخميرة (3.0) كبريتات المغنيسيوم المائية(0.5) وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين(1.0) وثبت الاس الهيدروجيني عند(6.0) (5) .

الظروف الزرعية

اجريت التجارب بثلاث مكررات وبدوارق زجاجية حجم (250 مل) ووزع الوسط بمعدل (50 مل دورق) وبعد تعقيم الدوارق الحاوية على الأوساط الغذائية المختلفة ، تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت بقرص قطر(4 ملم) مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر المنتخب المنمى على وسط PSA بعمر سبعة ايام . بعدها وضعت الدوارق في الحاضن الهزاز عند درجة حرارة (27±1ْ م) وبمعدل رج (150) دورة/ دقيقة لمدة ثمانية أيام .

طرائق التحليل

تقدير الكتلة الحيوية

بعد انتهاء فترة التحضين اللازمة سحبت الدوارق من الحاضنة وقدّر الأس الهيدروجيني لكل دورق ورشحت محتويات الدوارق باستخدام طبقتين من الموسيلين الناعم . ترك الراشح جانبا لتقدير السكر المتبقي Residual sugar وكمية السكر المتعدد . تم جمع خلايا الفطر في أطباق زجاجية مجففة معلومة الوزن وجففت الأطباق في الفرن عند درجة حرارة(80ْ م) و (48) ساعة ، بعد ذلك تم تقدير الفرق في الكتلة الحيوية باستخدام الميزان الحساس metler طراز PC 180.

عزل وتقدير السكر المتعدد

اخذ (10 مل) من الراشح الخالي من خلايا الفطر وتم ترسيب السكر المتعدد بإضافة حجمين من الايثانول أو الاسيتون (6 ، 7، 8) وتم إجراء عملية النبذ المركزي Centerfugation (9000 دورة / دقيقة) لمدة (15 دقيقة) لفصل السكر المتعدد . ترك الراشح جانبا لتقدير السكر المتبقي وجمع السكر المتعدد في أطباق زجاجية جافة معلومة الوزن وتم تجفيفها في الفرن عند درجة (60 م) لمدة (24) ساعة وبعد ذلك تم تقدير السكر المتعدد بفارق الكتلتين باستعمال ميزان حساس (Metler طراز PC 180). وحسبت النسب المئوية للتحول والانتاج والانتاج النوعي باستخدام المعادلات الآتية :

% للتحول = (السكر المتعدد / السكر المستهلك) x 100

% للانتاج = (السكر المتعدد / تركيز السكر المستخدم) x 100

% للانتاج النوعي = (السكر المتعدد المنتج / الكتلة الحيوية الناتجة) x **100**

تقدير السكر المتبقي

تم تقدير السكر المتبقي في الرائق بعد ترسيب السكر المتعدد باستخدام محلول الفينول وحامض الكبريتيك المركز (9) تم حساب السكر في العينات بالاعتماد على المنحنى القياسي للكلوكوز بوصفه سكر قياسي.

تأثير الظروف المثلى مجتمعة فى نمو الفطر *A.alternata* وانتاج السكر المتعدد والسم

تم تحديد مكونات الوسط الامثل الذي تم تركيبه اعتمادا على نتائج تجارب اخرى عديدة سابقة منتقاة من الظروف المثلى التي اعطت افضل انتاج للسكر المتعدد وهي (غم / لتر) : السكروز (50)، كبريتات الامونيوم (1.5)، مستخلص الخميرة (3.5) كبريتات المغنيسيوم المائية (0.5) وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (2.0) وتم تثبيت الاس الهيدروجيني الاولي عند (6.0) . لقح الوسط الغذائي لكل دورق بقرص قطره (4 ملم) من السلالة المطفرة للفطر نامية على وسط PSA بعمر (7) ايام . ثم وضعت الدوارق في الحاضن الهزاز عند درجة حرارة (27 ± 1 م°) لمدة (6) ايام.

استخلاص السم الفطري وتنقيته

تم استخلاص السم الفطري في راشح الوسط الغذائي للفطر *A. alternata* بحسب طريقة [10] Sheir et al. تمت ازالة الدهون من الراشح باضافة البترول ايثر الى الراشح وباستخدام قمع الفصل (Separating funnel) والرج. اخذ الجزء المائي واضيف اليه (0.3) حجم من الكلورفورم وباستخدام قمع الفصل والرج ايضا للتخلص من اية اثار للدهون . كررت هذه العملية مرتين ثم اخذ الجزء المائي وتم تبخيره تحت الضغط المنخفض

باستخدام جهاز التبخير الدوار وتحت الضغط الواطيء(Rotary evaporator) بعد ذلك اضيف(5 مل) من الميثانول لغرض اذابة السم وتم التخلص من الدقائق العالقة باستخدام النبذ المركزي للمحلول، اخذ الرائق وتم تركيز حجم المحلول بحدود (0.5 مل) بالتبخير ثم فصل السم باستخدام تقنية الواح الطبقة الرقيقة بواسطة رقائق السليكا جيل بسمك (0.25 ملم) (20 x 20) (المنشطة بتسخينها لمدة ساعة في الفرن عند 80 مْ) ، وباستخدام الماصة المايكروليترية تم تنقيط السم الفطري بمعدل (50 مايكرو ليتر) على الالواح. ولاظهار بقع السم استخدم محلول التشرب الذي يتكون من:خلات الاثيل : حامض الخليك : الماء 30 : 10 (60 : حجم / حجم) بعد انتهاء فترة التشرب جففت الالواح في الفرن وتم كشف السم برش الواح الكروماتوغرافيا الجافة بمحلول P- anisaldyehyde تم تسخين الالواح في الفرن عند درجة (80 م) لحين ظهور بقع السم بصورة مرضية ثم حددت البقع بقلم الرصاص وتم حساب معامل الجريان (R.f.) :

R.f. = المسافة التي يقطعها المذاب / المسافة التي يقطعها المذيب

وقد تم التعبير عن انتاج السم الفطر كما يأتي :

- لايوجد انتاج للسم + انتاج جيد

التحليل الطيفي للسم الفطري بالاشعة الفوق البنفسجية

تم كشط بقع السم الفطري على الواح الكروماتوغرافيا بواسطة الة حادة وجرى اذابة السم بالميثانول (99 %) ثم رشح المزيج باستخدام ورق الترشيح(واتمان رقم 1) وعمل له نبذ مركزي عند (9000 دورة / دقيقة) ثم جفف المحلول للحصول على السم بصورة نقية ووضع في قناني صغيرة لاجراء الاختبارات الحيوية. اجري التحليل الطيفي للسم المذاب في الميثانول باستخدام جهاز Spectro photo meter U.V. Recording المصنع من شركة Shimadzu UV-160 A .

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات وفق التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (C.R.D.) باستخدام نظام (SAS) واختبرت النتائج باتباع اختبار دنكن متعدد المدى وتم التمييز بين المتوسطات المختلفة معنوياً باحرف مختلفة (11).

النتائج والمناقشة

تأثير تعريض الفطر *A.alternata* للأشعة فوق البنفسجية

تم تعريض الابواغ الكونيدية Conidia للفطر *A. alternata* لفترات مختلفة من الأشعة فوق البنفسجية امتدت إلى (120) دقيقة وذلك لغرض معرفة إمكانية تحفيز إنتاجية

السكريات المتعددة للفطر وليس بهدف الحصول على طفرات من السلالة الأبوية. بينت النتائج (جدول1) إن عدد الخلايا المقاومة للأشعة يتناسب عكسيا مع زيادة فترة التعريض للأشعة حيث إن عدد المستعمرات النامية بعد تعريض الفطر للفترات المختلفة من الأشعة والتي تراوحت (5-120) دقيقة بلغ من (73- 179) مستعمرة وبحسب فترة التشعيع. وأفادت نتائج هذه التجربة إن النسبة المئوية للقتل تزداد مع زيادة فترة التعريض للأشعة فوق البنفسجية إذ بلغت(2.19%) عند تعريض ابواغ الفطر للأشعة لمدة (5) دقائق بينما بلغت (60.11 %) عند التعريض لمدة ساعتين .

وقد جرى انتقاء العزلات التي أبدت اختلافا في الشكل الظاهري ولون المستعمرات الشاحب نتيجة لاختزال صبغة الميلانين السوداء وذلك بزراعتها في أنابيب اختبار تحتوي على وسط اكارسكروز البطاطا (PSA) مائل ومن خلال فحصها مهجريا ثم التأكد من نقاوتها وعدم تلوثها بكائنات أخرى بعد ذلك تم قياس إنتاجية هذه العزلات ومقارنتها مع السلالة الأبوية .

استخلاص السم الفطري وتنقيته

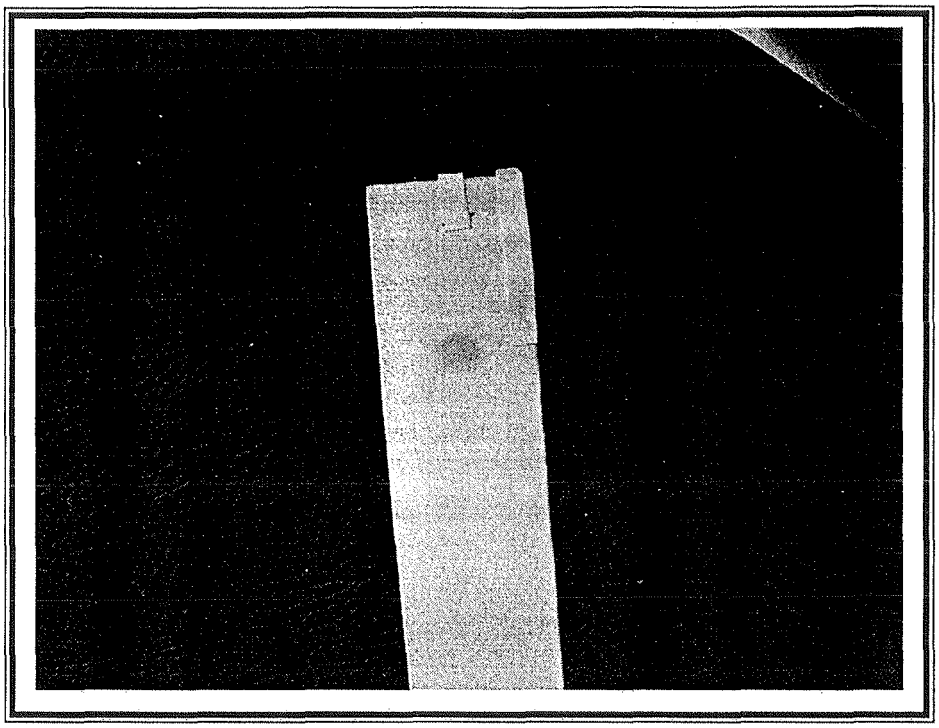
تم استخلاص السم الفطري _من راشح مزرعة الفطر_ *A. alternata* بحسب الطريقة المذكورة انفا وبعد اظهار بقع السم الفطري تم حساب قيمة معامل الجريان (R.F.) فبلغت (0.81) (شكل 1) وهذه القيمة قريبا جدا من قيمة معامل الجريان (R.F.) الذي حدده Sheir et al [10] لسم الفطر *A. alternata* والبالغة(0.8).

جدول (1) تأثير الأشعة فوق البنفسجية في نمو الفطر *Alternaria alternate* على وسط PSA

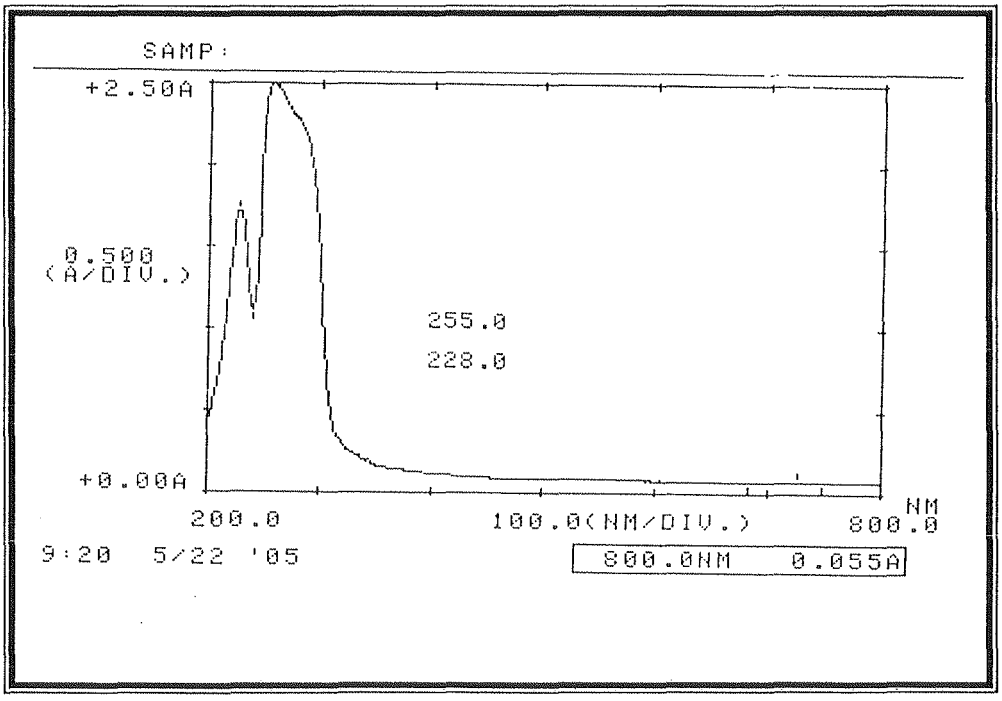
فترة التشعيع (دقيقة)	المستعمرات النامية (%)	القتل (%)
0.0	100 أ *	—
5	97.81 أ ب	2.19
10	96.72 أ ب ج	3.28
15	95.08 أ ب ج	4.92
20	94.54 أب ج د	5.46
25	91.80 ب ج د هـ	8.20
30	90.16 ج د هـ	9.84
40	87.98 د هـ	12.02
50	86.34 هـ	13.66
60	74.32 و	25.68
75	67.22 ز	32.79
90	59.02ج	40.98
105	49.18ط	50.82
120	39.89ي	60.11

* متوسط المعاملات ذات الاحرف المتشابهة لاتختلف فيما بينها معنويا عند مستوى احتمال حسب اختبار وتكن متعدد المدى 0.01 .

كما ان اجراء التحليل الطيفي للسم الفطري المذاب بالميثانول بواسطة الاشعة فوق البنفسجية U.V. Spectrophotometry امكن ظهور ذروتين للامتصاص فقط كانت الاولى عند الطول الموجي (255 nm) حيث بلغت قيمة الامتصاص(2.50) اما موقع الذروة الثانية فكانت عند الطول الموجي (228 nm) اذ بلغت قيمة طيف الامتصاص(1.70)(شكل 2). ان وجود ذروتين للامتصاص فقط يؤكد نقاوة السم الفطري المتحصل عليه.



شكل(1): فصل المركب السام المنتج من عزلة الفطر *Alternaria alternata* باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة T L C



شكل (2) :التحليل الطيفي للسم الفطري بالاشعة فوق البنفسجية

أظهرت النتائج(جدول2) إن العزلات الثلاث المنتخبة (AUV3، AUV2 ، AUV1) أبدت زيادة معنوية في إنتاجية السكر المتعدد بلغت(3.25 و3.49 و3.78 غم /

لتر) مقارنة مع السلالة الابوية(AA)(2.81 غم / لتر) وان زيادة فترة التعريض للاشعاع ادت الى تحفيز في انتاج السكر المتعدد وتثبيط قليل في انتاج الكتلة الحيوية للفطر، وربما يعزى ذلك الى العرقلة التي حدثت في مسارات التخليق الحيوي للسكر المتعدد.

ان هذه النتائج جاءت متوافقة مع ماتوصل اليه [12] Miller و Liberta ان تعريض الفطر *Sclerotium rolfsi* للاشعة فوق البنفسجية ادت الى تحفيز انتاج السكر المتعدد السكليروكلوكان . وقد بين [13] West و Reed-Hamer ان زيادة انتاج السكر المتعدد البوليولان من سلالة الفطر *Aureobasidium pullulans* المعرضة للاشعة فوق البنفسجية كانت محدودة حيث وصل الانتاج الى(14.88 غم / لتر) مقارنة مع السلالة الابوية (12.25 غم / لتر) .

جدول (2) انتاج السكر المتعدد والكتلة الحيوية والسم للسلالات المطفرة ومقارنتها مع السلالة الابوية للفطر *A. alternata* بعد ثمانية ايام من التحضين .

سلالات الفطر	الكتلة الحيوية (غم/ لتر)	السكر المتعدد (غم/ لتر)	التحول (%)	الانتاج (%)	الانتاج النوعي (%)	السكر المتبقي (غم/ لتر)	الاس الهيدروجيني النهائي	انتاج السم **
AA	14.2	2.81 د *	11.38	9.37	19.79	5.31	4.41	+
AUV1	13.93	3.25 ج	12.97	10.83	23.33	4.95	4.91	—
AUV2	13.28	3.49 ب	13.89	11.40	26.28	4.87	4.93	—
AUV3	12.95	3.78 أ	14.60	12.60	29.19	4.11	4.87	—

* متوسط المعاملات ذات الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية فيما بينها معنويا عند مستوى احتمال 0.01 حسب اختبار دنكن متعدد المدى.

** – لايوجد انتاج للسم ، + انتاج جيد ،

AA لسلالة الابوية AUV2 سلالة مشعة لمدة 90 دقيقة

AUV1 سلالة مشعة لمدة 60 دقيقة AUV3 سلالة مشعة لمدة 120 دقيقة

وقد اظهر [14] Syzmanska و Galas نتيجة مغايرة لما تم الحصول عليه حيث اوضح ان تعريض الفطر *A. pullulans* للاشعة فوق البنفسجية ادى الى نمو مستعمرات ذات انتاج منخفض من البوليولان الا ان اعادة تشعيع هذه المستعمرات مرة ثانية ادى الى ارتفاع

انتاجيتها من السكر المتعدد. كما ان النتائج التي حصلنا عليها تؤيد ماذكره الشاهري (4) من زيادة انتاج البوليولان من احدى السلالات المعزولة محلياً من الفطر *A. pullulans* عند تعريضها للاشعة فوق البنفسجية ، كما اشار Syzmanska [14] و Galas الى ان تعريض لقاح الفطر *S. rolfsii* للاشعة فوق البنفسجية ادى الى زيادة غير معنوية في انتاج السكليروكلوكان وتثبيط طفيف في نمو الفطر.

ازداد استهلاك السكر في الوسط الغذائي وتناسب طرديا مع نمو الفطر وانتاج السكر المتعدد حيث ظهر ان السلالة (AUV3) اكثر استهلاكا للسكر اذ بلغت كمية السكر المتبقي(4.11 غم / لتر) وهذا يفسر الانتاج العالي من السكر المتعدد مقارنة مع السلالة الابوية (AA) (5.3 غم / لتر). وكان الاس الهيدروجيني النهائي منخفضاً عن الاس الهيدروجيني الاولي ولجميع السلالات وربما يعزى ذلك الى تراكم بعض الحوامض العضوية . ان الانخفاض في الاس الهيدروجيني ظاهرة اعتيادية وخاصة عند استخدام سكر الكلوكوز او بعض السكريات البسيطة الاخرى بوصفها مصادر كربونية (4 ، 14).

ويبدو واضحاً من النتائج ان السلالات الطافرة الثلاثة (AUV1 وAUV2 و AUV3) قد فقدت قدرتها على انتاج السم مقارنة بالسلالة الابوية (AA) التي كان انتاجها من السم جيداً. وتتفق هذه النتائج مع ماذكره Akamatsu et al [16] الذين ذكروا إن طفرات الفطر *A.alternata* تؤثر في انتاج السم وكذلك تؤدي الى فقدان قدرتها الامراضية مما يوضح الدور الكبير للسم في احداث المرض .

تأثير الظروف المثلى مجتمعة في نمو السلالة المطفرة من الفطر *A . alternata* وانتاج السكر المتعدد والسم بعد (6) ايام من التحضين

بعد ان أفادت نتائج التجربة السابقة بحدوث زيادة معنوية في إنتاج السكر المتعدد للفطر *A alternata* . بعد تعريضه لفترات مختلفة للأشعة فوق البنفسجية امتدت لمدة 120 دقيقة ، لذا فقد صممت هذه النتيجة بهدف التعرف على تأثير استخدام الوسط المنتخب من الظروف المثلى مجتمعة على إنتاج السكر المتعدد لعزلة الفطر *A . alternata* التي أعطت أعلى إنتاج للسكر المتعدد (3.78 غم / لتر) وهي العزلة AUV3.

اشارت النتائج (جدول 3) الى حدوث تحفيز كبير في انتاج السكر المتعدد (5.69 غم / لتر) فيما كان هناك انخفاض واضح في الكتلة الحيوية (7.81 غم / لتر) بعد (6) ايام من التحضين. وازدادت النسبة المئوية للتحول وللانتاج كما ازدادت بشكل كبير النسبة المئوية للانتاج النوعي اذ بلغت (72.86 %) وانعكس ذلك في الاستهلاك الزائد للسكر من الوسط المنتخب حيث قلت كمية السكر المتبقي وبلغت (9.7 غم / لتر) من كمية السكر

المستخدمة(40 غم / لتر) وانخفض كذلك الاس الهيدروجيني النهائي عن الاولي (6.0) . كما لوحظ انعدام قدرة العزلة المطفرة على انتاج السم في الوسط الغذائي .

جدول (3) تأثير الظروف المثلى مجتمعة في نمو السلالة المطفرة من الفطر *A. alternata* وإنتاجه للسكر المتعدد بعد (6) أيام من التحضين

الكتلة الحيوية (غم / لتر)	السكر المتعدد (غم / لتر)	التحول (%)	الإنتاج (%)	الإنتاج النوعي (%)	السكر المتبقي (غم / لتر)	الاس الهيدروجيني النهائي	إنتاج السم *
7.81	5.69	18.78	14.23	72.86	9.7	3.91	—

* ـــ لايوجد إنتاج للسم

المصـــــــادر

1.Calvo A. M., Welson R.A., Bok J.W. and Keller N.P., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 447-459 (2002). .

2.Drake J.W.," Molecular Basis of Mutation" . Holden –Day ,San Francisco ، U.S.A (1970) .

3. Auerbach C.H., "Mutation Research" . Chapman and Hall , London ، U.K. (1976).

4. ألشاهري ، يوسف جبار إسماعيل. رسالة ماجستير/ كلية التربيــة / جامعــة الموصــل (1999).

5. الراوجي ، عصام داود سليمان.أطروحة دكتوراه/كلية التربية /جامعة الموصل. (2005).

6. Leathers T. D., Nofsinger G. W. and Kutezman C.P. J.,Ind. Microbiol., 3 : 231-234 (1988) .

7. Cerning J . , Renard C. M .G., Thibault J . F., Bouillanne C. , London.,M . Desman Zeaud and Topisirovic L .,. Appl. Environ. Microbiol., 60 : 3914 – 3919 (1994) .
8. Kassim M. B. I. and Sultan R. H., Qatar Univ.Sci. J., 17: 313-320 (1997).
9. Dubois M. ,Gilles. K. A., Hamilton J. K., Robers P. A., and Smith F. , "Colorimetric Method for Determination of Sugars" .Anal .Chem., 28 : 350-356 (1956) .
10. Shier W. T. , H.K.Abbas and C. J., Mycopathologia , 116 : 97-104 (1991). .
11. الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله. تصميم وتحليل التجارب الحقلية. مطبعة دار الكتب للطباعة والنشر في جامعة الموصل / العراق (1980).
12. Miller R. M. , and A. E. Liberta . I., Can . J. Microbiol ., 22 : 967-1970 (1976). .
13. West T. P. and Reed-Hamer B. ., FEMS Microbiol. Lett., 113 : 345-348 (1993) .
14. Syzmanska T. and Galas E. , Enz. Microbiol. Technol., 15 : 317-321 (1993). .
15. ألنعيمي ، عبد الكريم سليمان حسن سيدان. اطروحة دكتوراه/كلية التربية/ جامعة الموصل.
16. Akamatsu H.,Itoh Y. , Kodam M. ,Otani M. and Kohmoto K., Phytopathology , 87: 967-972 (1997).