التأثيرات المرضية النسيجية لسبورات فطر الـ *Tilletia* المسبب لتفحم الحنطة على معدة وامعاء وقلب الفئران المختبرية

Histopathological Effects of *Tilletia* fungus Spores Causing Wheat Smut on the Stomach, Intestines and Heart of Experimental Mice

ايمان جواد كاظم عادل عبيد حسوني نعمت جميل عبد الباقي*

الكلية التقنية / المسيب

* كلية العلوم / جامعة بغداد

المستخلص

أظهرت نتائج التجريع الفموي والحقن داخل تجويف الخلب لعالق سبورات فطر *Tilletia* في ثلاثين فأراً مختبرياً أعراضا مرضية واضحة . حيث لوحظ انخفاض في معدلات ألاوزان بالاضافة الى النحول والضعف العام وصعوبة التنفس وعدم القدرة على الحركة . أن شدة هذه التغيرات اعتمدت على زيادة تركيز العالق السبوري. بينما أظهرت نتائج التأثيرات النسجية المرضية على المعدة والأمعاء والقلب للفئران المختبرية إضرار نسجية مرضية واضحة عند التركيز 0.1 مليغرام / 0.5 مليليتر PBS للعالق السبوري . اظهر التجريع الفموي إضرار نسجية مرضية أكثر على المعدة والأمعاء من الأضرار الناتجة عن طريق الحقن داخل تجويف الخلب . حيث سبب التركيز 0.1 ملغرام / 0.5 مليليتر PBS المعطى عن طريق التجريع الفموي في نسيج المعدة انسلاخ الظهاره المخاطية مصحوباً بتكون القرح الناتجة عن سبورات الفطر فضلاً عن تلف ونخر النسيج مع خزب أما التركيز المعطى عن طريق الحقن داخل البريتون فقد اظهر انفصال الظهارة المخاطية مع تكون القرح .

Abstract:

Oral dose and intraperitonial injection of 30 experimental mice with spore suspension of *Tilletia* fungus revealed different clinical signs, included decrease in body weight, emaciation, general weakness, dyspenia, and ataxia. Severity of these changes depend upon concentration of spore suspension. While histopathological effects on heart, stomach and intestine of these experimental mice, were seen at concentration of 0.1 milligram / 0.5 milliliter PBS of spore suspension. Oral dose revealed more histopathologic damage in stomach, and intestine tissue than intraperitonial injection. Oral dose of 0.1 milligram /0.5 milliliter PBS caused mucous epithelium sloughing or detachment squamation accompanied with formation of ulcers oedema damage and necrosis, on the other hand, intraperitonial injection caused epithelium detachment with ulceration.

المقدمة :

يعتبر مرض التفحم المغطى أو النتن في القمح Cover smut or bunt of wheat من اخطر الامراض التي تصيب الحنطة والمسؤول عن تلف كميات كبيرة من المحصول ويسبب هذا المرض فطر من النوعين *Tilletia caries* و *T. foetida* . وهذا المرض شائع جداً في القطر وخصوصاً في المنطقة الشمالية [1،2] . تعتبر فطريات التفحم Smut fungi من الفطريات المهمة اقتصادياً لانها السبب في تلف المحصول وتصبح الحبوب المصابة غير صالحة للاستهلاك البشري [2] . أن تسمية هذا المرض بالتفحم ناتجة عن الكتل السوداء

Keywords: Histopathological effect; *Tilletia* spores; Wheat smut.

لسبورات مسبباتها على العائل ويطلق عليه ايضاً التفحم النتن Bunt Smut نظراً للرائحة المميزة والتي تشبه رائحة السمك الفاسد وتعزى هذه الرائحة إلى وجود مادة ثالث أمينات المثيل في السبورات [1،2] .

قد يسبب مرض التفحم خسائر في محصول الحبوب يتناسب مع عدد النباتات المصابة وعندما لايكافح فانه قد يسبب خسائر مدمرة . ولكن حتى بفضل وسائل المكافحة الفعالة المعمول بها في الولايات المتحدة في الوقت الحاضر فان المرض مستمر في أحداث خسائر شديدة وبالاضافة الى ذلك فان المرض يسبب خسائر تسويقية بتخفيضة لنوعية وسعر القمح الملوث بسبورات التفحم بسبب التلوث والرائحة الكريهة التي يضيفها على محصول القمح [2 ، 3] . ويمكن إن تزرع فطريات التفحم على أوساط غذائية اصطناعية ولكنها توجد في الطبيعة فقط كطفيليات على عوائله [4،5،6] . ان معظم دول العالم تحاول الحد من انتشار هذا المرض في حين نلاحظ تفش هذا المرض كوباء في القطر وأصبح يهدد ثروانتا الاقتصادية. ولعدم وجود دراسة محلية في قطرنا عن التأثيرات النسيجية المرضية لسبورات الفطر على المستهلك ، لذا كان الهدف الرئيسي من هذه الدراسة ملاحظة التأثيرات النسيجية لسبورات فطر *Tilletia* على معدة وامعاء وقلب الفئران المختبرية.

المواد وطرق العمل :

1. الفئران المختبرية :

استخدمت فئران بيض سويسرية إناث تبلغ من العمر ثمانية أسابيع تتراوح أوزانها ما بين(20 – 25) غرام وضعت في اقفاص بلاستيكية نظيفة ومفروشة بنشارة الخشب ووضعت الأقفاص في غرفة داخل البيت الحيواني في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بغداد مع مراعاة توفير الظروف المثلى من درجة حرارة 25م ونظافة ماء الشرب والعلف . وتم اخذ عينات من الادرار والخروج وتمت زراعتها على الأوساط الزرعية (وسط اغارماكونكي واغار الدم) للتأكد من خلو الفئران من الجراثيم المرضية . حيث تم استخدام 30 فأراً للتجريع الفموي ونفس العدد للحقن داخل تجويف الخلب.

2. تعيين العالق السبوري :

حضرت تراكيز مختلفة من سبورات الفطر (0.05 ، 0.1 ، 0.15 ، 0.2 ، 0.25) وقد تم الحصول على السبورات من حبوب الحنطة المصابة بفطر الـ *Tilletia* . حضرت هذه التراكيز باستخدام محلول دارئ الفوسفات الملحي المعقم Phosphate Buffer Saline (PBS) والذي حضر حسب [7] . وتم تحضير خزين من سبورات الفطر بتركيز 10 مليغرام / 6 مليليتر PBS وحضرت منه التراكيز المراد حقنها .

تم تقسيم الفئران المختبرية الى ستة مجاميع بواقع 5 فئران لكل مجموعة واصيبت المجاميع بالتراكيز المختلفة لسبورات الفطر [0.05 ، 0.1 ، 0.15 ، 0.2 ، 0.25] ملغرام / 0.5 مليليتر PBS على التوالي وذلك بحقن 0.5 مليليتر من كل تركيز وبطريقتين مرة عن طريق التجريع الفموي ومرة عن طريق الحقن داخل تجويف الخلب للفأر ولكل تركيز(حيث تم الحقن داخل تجويف الخلب والتجريع الفموي في الساعة 10 صباحاً) . بينما حقنت مجموعة السيطرة بـ 0.5 مليليتر من PBS . خلال فترة 20 يوم تم ملاحظة الأعراض السريرية التي ظهرت على الفئران المختبرية وكذلك قياس أوزان الفئران المختبرية خلال الفترة المذكورة . ثم شرحت الفئران لغرض فحص الاحشاء الداخلية بالعين المجردة ولتحضير المقاطع النسيجية . حللت البيانات احصائياً وبطريقة تحليل التباين لتشخيص الفروقات الاحصائية بين المتوسطات الحسابية للمعاملات عند مستوى احتمال 5% .

3. الدراسة النسجية للاعضاء المتضررة :

3 -1 الفحص المرضي

فحصت الفئران المحقونة بالعالق السبوري بتركيز 0.1 مليغرام/ 0.5 مليليتر PBS ولكلا التجريع الفموي والحقن داخل تجويف الخلب . وبعد فترة 20 يوم عرضت الاحشاء الداخلية الى الفحص بالعين المجردة لتعيين وجود علامات مرضية مقارنة بفئران مجموعة السيطرة غير المصابة ثم أخذت كل من المعدة والأمعاء والقلب كاملة لعمل المقاطع النسيجية لها . ثبتت اعضاء الفئران المختبرية بالكامل في دارئ الفورمالين 10% المتعادل PH_7 ثم عوملت بالطريقة الروتينية وصبت في قوالب شمعية حسب ماورد في Humason [8] . وصبغت المقاطع النسيجية بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين الاعتيادية .

النتائج :

1. الاعراض السريرية

اظهرت النتائج إن التجريع الفموي والحقن داخل تجويف الخلب ادى الى ظهور اعراض مرضية عليها حيث لوحظ انخفاض في معدلات أوزان الفئران المختبرية الجدول (1 و 2) وقد لوحظ ايضاً على الفئران المختبرية النحول والضعف العام وصعوبة التنفس وعدم القدرة على الحركة ، كما لوحظ بالفحص العياني بعد تشريح الفئران المعاملة تورم الرئتين والكبد والكلية والطحال وظهور هذه الأعضاء بحجم اكبر مما تظهر علية في مجموع السيطرة . ان شدة هذه التغيرات اعتمدت على زيادة تركيز العالق السبوري للفطر. أي ان الاعراض السريرية كانت متماثلة في كلا المجموعتين (التجريع الفموي والحقن داخل تجويف الخلب) . وتدل نتائج التحليل الاحصائي بأن الجدول (1 و 2) اعطت فروقات معنوية لجميع التراكيز ولكلا الحقنين . وقد لوحظ زيادة الفارق المعنوي مع زيادة تركيز العالق السبوري فقد سجل اكبر فرق معنوي عن التركيز 0.25 مليغرام / 0.5 مليليتر PBS المعطى عن طريق الفم حيث يساوي 0.21 ± 16.1 (يدل الرقمين على اختبار t للمعنوية ± الخطأ القياسي) .

2 . الفحص النسيجي

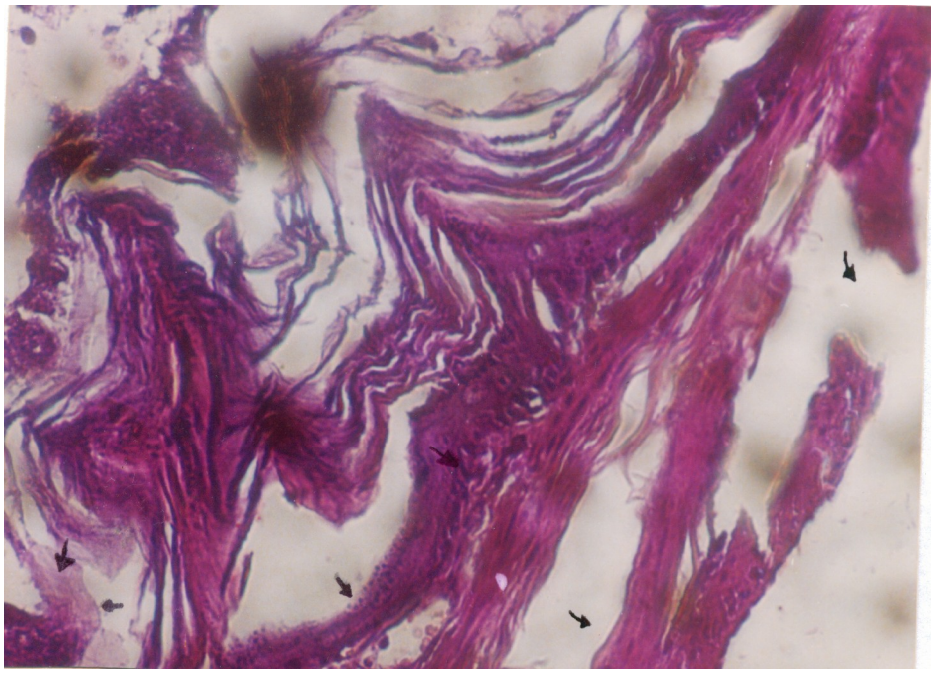
أظهرت نتائج الفحص النسجي للمعدة بان التركيز 0.1 مليغرام / 0.5 مليليتر PBS للعالق السبوري للفطر والمعطى عن طريق التجريع الفموي تأثير اكبر على المعدة من التركيز نفسه المعطى عن طريق الحقن داخل تجويف الخلب حيث سبب التركيز 0.1 ملغرام / 0.5 مليليتر PBS المعطى عن طريق التجريع الفموي انسلاخ الظهاره المخاطية مصحوباً بـ تكون القرح الناتجة من سبورات الفطر فضلا تلف ونخر النسيج المعدي شكل (1) أما التركيز المعطى عن طريق الحقن داخل تجويف الخلب سبب انفصال وتمزق الظهارة المخاطية epithelial mucosa مصحوباً بتكون القرح الناتجة عن سبورات الفطر. شكل (3،2) . كما اظهر الفحص النسجي للأمعاء بان التركيز المعطى عن طريق التجريع الفموي كان تأثيره اشد بقليل على الأمعاء من التركيز المعطى عن طريق الحقن داخل تجويف الخلب فقد سبب التركيز المعطى عن طريق التجريع الفموي نخر وانسلاخ الطبقة المخاطية مع وجود تقرحات عليها والتحطم الشديد للزغابات المعوية شكل (4) إما التركيز المعطى عن طريق الحقن داخل تجويف الخلب فقد اظهر تقرح في الطبقة المخاطية مع تنسج الخلايا الكأسية شكل (6،5) . واظهر الفحص النسجي للقلب بان التركيز المعطى عن طريق الحقن داخل تجويف الخلب ذات تأثير اكبر على القلب من التركيز المعطى عن طريق التجريع الفموي حيث سبب التركيز المعطى عن طريق الحقن داخل تجويف الخلب وذمة وتنكس استسقائي مع تلف ونخر العضلة القلبية شكل (7) بينما سبب التركيز المعطى عن طريق التجريع الفموي احتقان دموي مع نخر في العضلة القلبية شكل (8،9) .

جدول (1) :التغيرات في معدلات اوزان الفئران المختبرية المجرعة عن طريق الفم تراكيز مختلفة من العالق السبوري

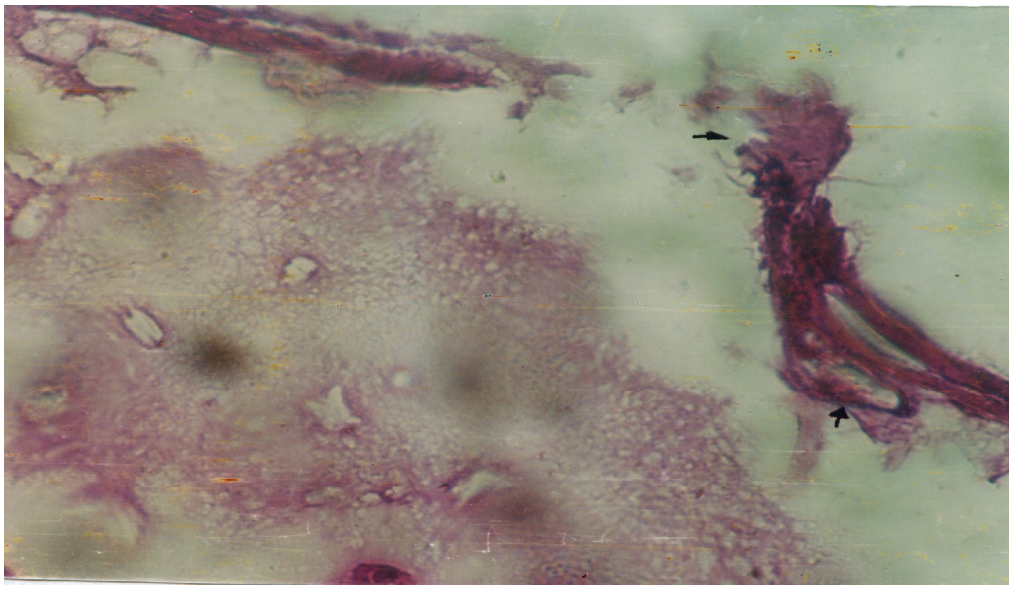
المجاميع	التراكيز	عدد الفئران المجرعة	معدلات الاوزان (غرام)					
			في لحظة التجريع	(1) يوم	(5) يوم	(10) يوم	(15) يوم	(20) يوم
أ	0.05	5	25	24.95	24.47	23.85	23.22	22.6
ب	0.1	5	24.51	24.34	23.69	23.30	22.50	22.01
ج	0.15	5	22.98	22.85	21.38	20.12	19.75	18.22
د	0.2	5	23.73	23.64	23.12	22.75	22.25	21.58
هـ	0.25	5	21.34	21.34	21.05	20.88	20.65	20.32
و	السيطرة	5	24.85	24.85	25.1	25.48	25.82	26.11

جدول (2): التغيرات في معدلات اوزان الفئران المختبرية المحقونة تراكيز مختلفة من العالق السبوري داخل تجويف الخلب

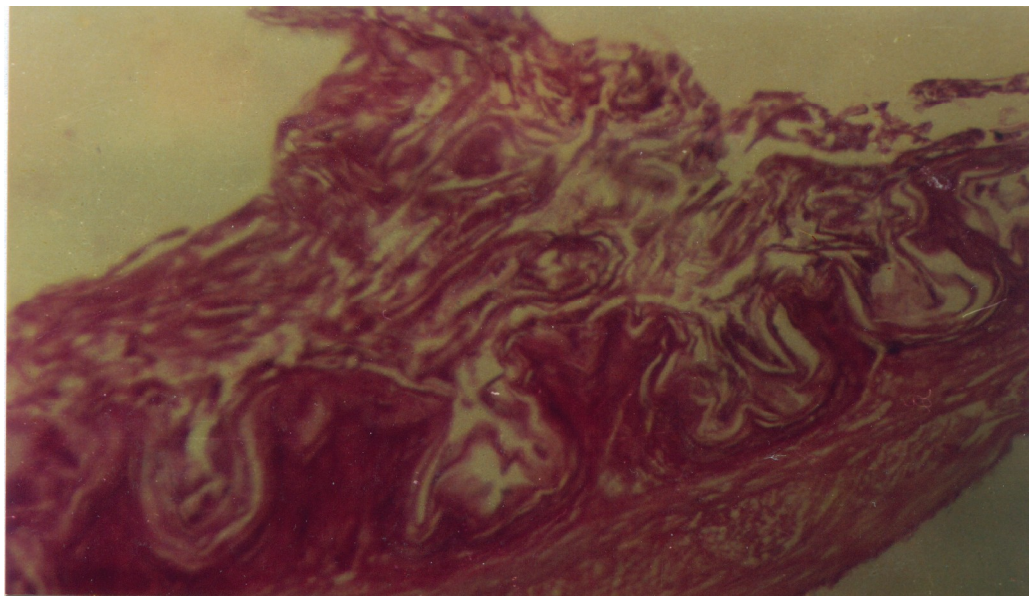
المجاميع	التراكيز	عدد الفئران المحقونة	معدلات الاوزان (غرام)					
			في لحظة الحقن	(1) يوم	(5) يوم	(10) يوم	(15) يوم	(20) يوم
أ	0.05	5	25	24.96	24.41	23.85	23.14	22.9
ب	0.1	5	23.55	23.48	22.93	21.82	21.25	20.05
ج	0.15	5	22.86	22.78	22.25	21.84	20.55	19.96
د	0.2	5	23.75	23.73	23.38	23.09	22.86	22.75
هـ	0.25	5	21.99	21.95	21.64	21.14	20.87	20.49
و	السيطرة	5	24.25	24.26	24.47	24.98	25.07	25.34



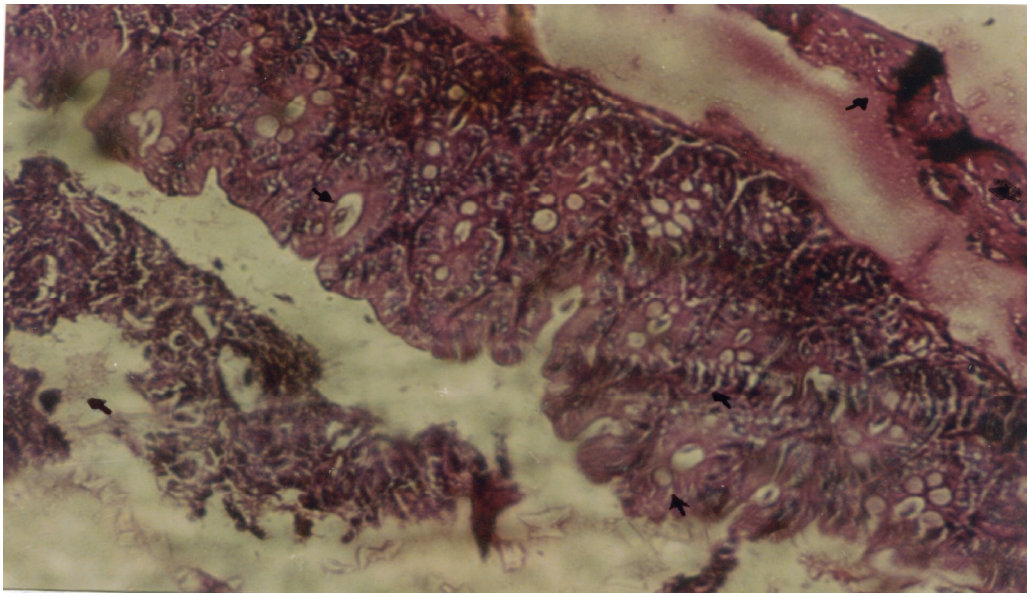
شكل (1) : مقطع عرضي لمعدة فأر جرع عن طريق الفم بالعالق السبوري لفطر Tilletia بتركيز 0.1 مليغرام / 0.5 مليليتر PBS . انسلاخ الظهارة المخاطية مصحوبا بتكوين القرح الناتجة عن سبورات الفطر فضلاً عن تلف ونخر النسيج المعدي . (صبغة الهماتوكسلين والايوسين التكبير للقوة X 200)
تشير الاسهم الى مواقع الضرر داخل النسيج



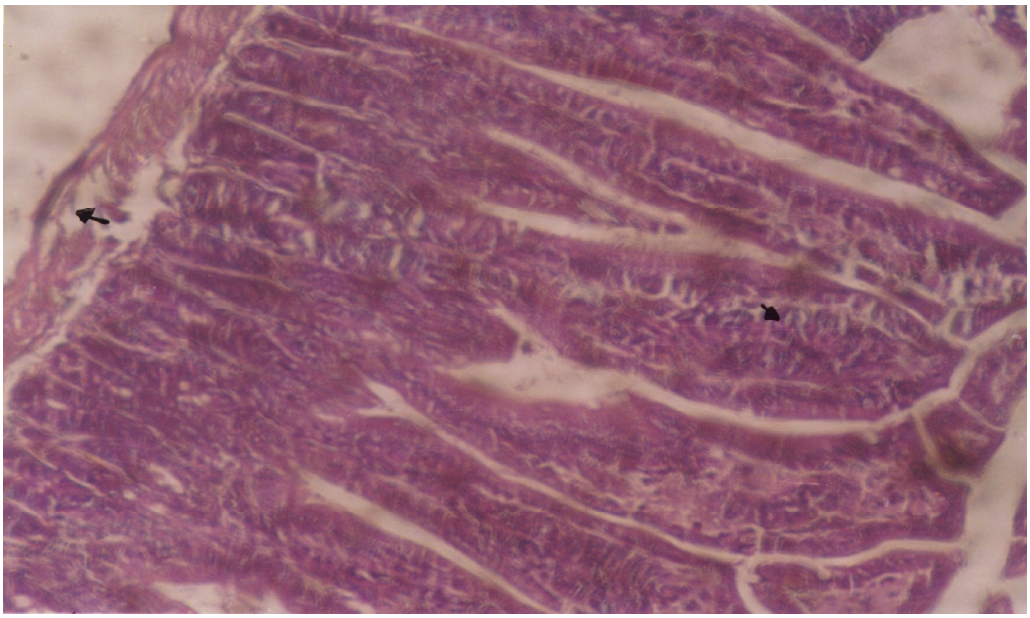
شكل (2): مقطع عرضي لمعدة فأر حقن بداخل التجويف الخلبي بالعالق السبوري لفطر Tilletia بتركيز 0.1 مليغرام / 0.5 مليليتر PBS . انفصال الظهارة المخاطية مع تكون القرح في النسيج المعدي.
(صبغة الهيماتوكسلين والايوسين التكبير للقوة X 200) تشير الاسهم الى مواقع الضرر داخل النسيج



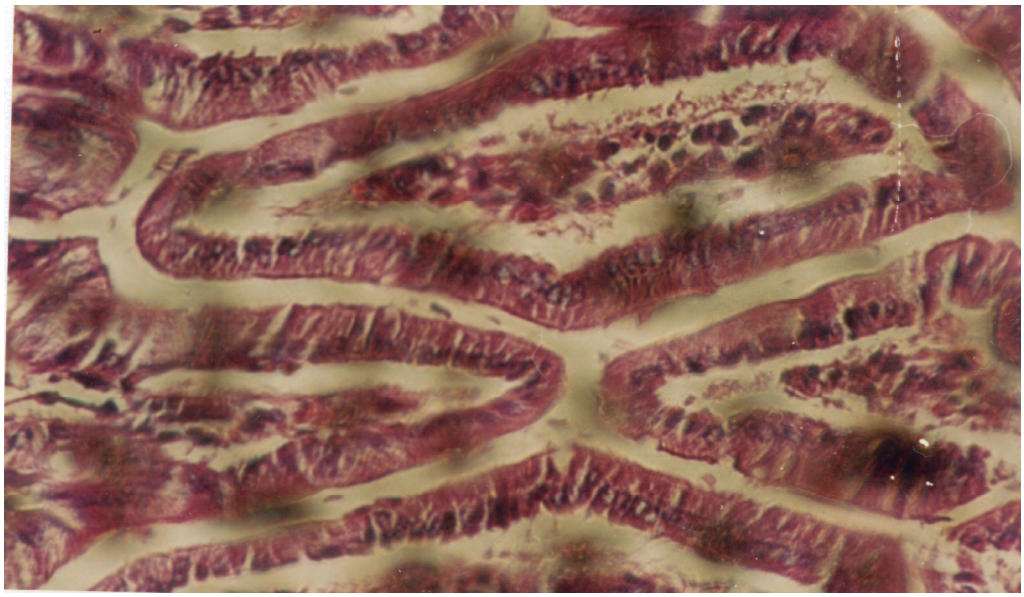
شكل (3) : مقطع عرضي لمعدة فار غير مصاب(سيطرة) (صبغة الهيماتوكسلين والايوسين التكبير للقوة X 200)



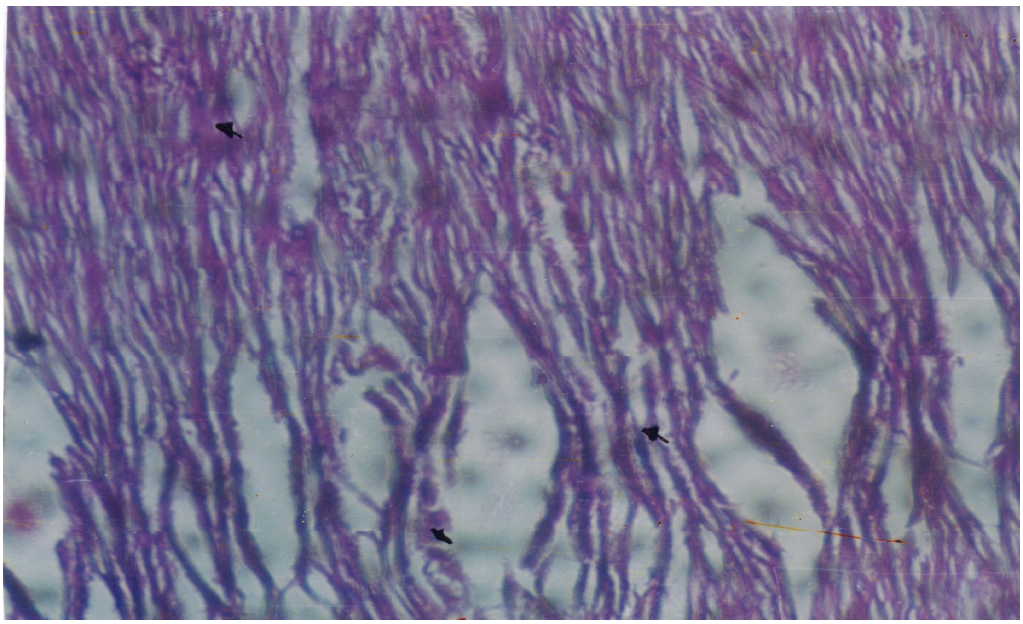
شكل (4): مقطع عرضي لامعاء فأر جرع عن طريق الفم بالعالق السبوري لفطر *Tilletia* بتركيز 0.1 مليغرام / 0.5 مليليتر PBS . نخر وانسلاخ الطبقة المخاطية مع وجود تقرحات عليها فضلاً عن التحطم الشديد للزغابات المعوية . (صبغة الهيماتوكسلين والايوسين التكبير للقوة 100 X). تشير الاسهم الى مواقع الضرر داخل النسيج



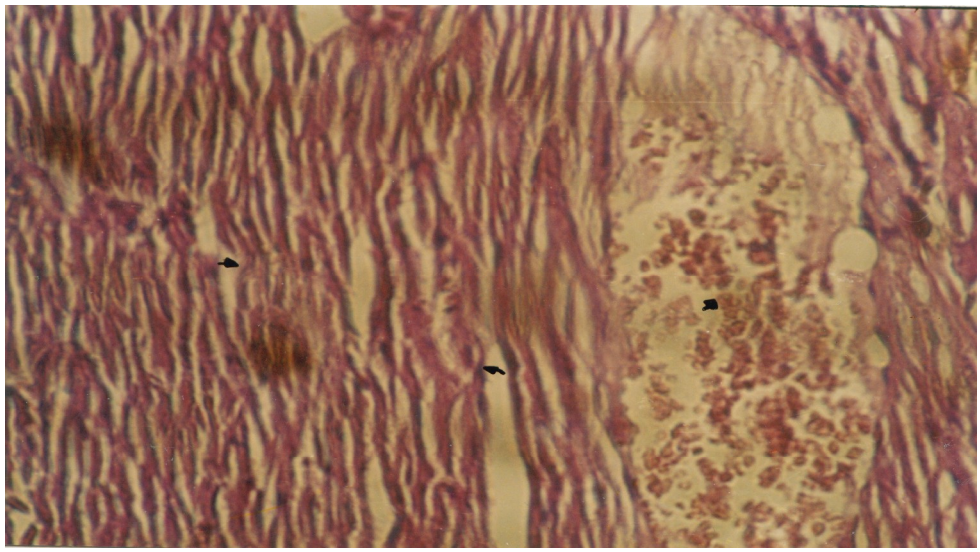
شكل (5) : صورة مجهرية لمقطع عرضي لامعاء فأر حقن بداخل التجويف الخلبي بالعالق السبوري لفطر Tilletia بتركيز 0.1 مليغرام / 0.5 مليليتر PBS . تقرح في الطبقة المخاطية مع تنسج في الخلايا كأسية . (صبغة الهياتوكسلين والايوسين التكبير للقوة 100 X). تشير الاسهم الى مواقع الضرر داخل النسيج



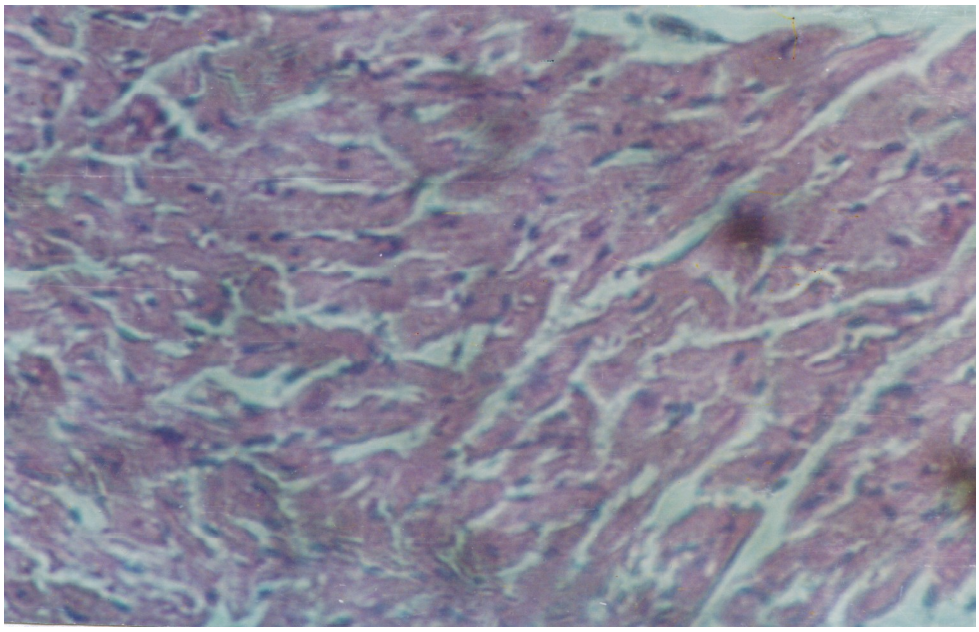
شكل (6): مقطع عرضي لامعاء فأر غير مصاب (سيطرة) (صبغة الهيماتوكسلين والايوسين التكبير للقوة 100 X)



شكل (7) : مقطع عرضي لقلب فأر حقن بداخل التجويف الخلبي بالعالق السبوري لفطر Tilletia بتركيز 0.1 ملغرام / 0.5 مليلتير PBS . وذمة ونخر للعضلة القلبية فضلاً عن ارتشاح خلوي التهابي وتنكس استسقائي . (صبغة الهيماتوكسلين والايوسين التكبير للقوة 100 X).
تشير الاسهم الى مواقع الضرر داخل النسيج



شكل (8): مقطع عرضي لقلب حقن عن طريق الدم بالعالق السبوري لفطر Tilletia بتركيز 0.1 مليغرام / 0.5 مليليتر PBS . احتقان دموي مع نخر في العضلة القلبية . (صبغة الهيماتوكسلين والايوسين التكبير للقوة X 200). تشير الاسهم الى مواقع الضرر داخل النسيج



شكل (9): مقطع عرضي لقلب فأر غير مصاب (سيطرة) . (صبغة الهيماتوكسلين والايوسين التكبير للقوة X 200)

المناقشة :

تشير نتائج التحليل الاحصائي بان اكبر فرق معنوي سجل عن التركيز 0.25 ملغرام / 0.5 مليليتر PBS المعطى عن طريق الفم وربما يرجع السبب الى ان هذه الطريقة من الحقن توصل العالق السبوري الى الاحشاء مثل المعدة والامعاء بطريقة اسرع واكثر فعالية من الحقن داخل تجويف الخلب .

تشير المصادر الى عدم صلاحية الحبوب المصابة بسبورات فطر الـ *Tilletia* للاستهلاك البشري والحيواني لأن وجود الفطريات مع الحنطة المطحونة تعطي رائحة العفن غير المقبولة وتؤثر على انزيم الاميليز في العجينة ولذلك سوف تؤثر على سيوله العجينة ولزوجتها مما يؤدي الى ردائه نوعية الخبز بالاضافة الى رائحة السمك الفاسد في الخبز المنتج من الحنطة المصابة بالاضافة الى اسوداد لون الخبز [1 ، 9] .

اظهرت لنا نتائج البحث بان الاستهلاك المستمر لسبورات الفطر ادى الى ظهور اعراض مرضية مختلفة على الفئران المختبرية كما اظهرت لنا نتائج البحث مدى الاضرار النسيجية الخطرة التي تعرضت لها الفئران المختبرية وعلية يجب ان تكون حبوب الحنطة المستخدمة للاستهلاك البشري او الحيواني خالية من أي نسبة من سبورات الفطر مهما كانت صغيرة . ان التغيرات المرضية التي لوحظت على انسجة الفئران المختبرية كانت ناتجة عن السبورات لان السبورات لايمكن لها ان تتحول الى فطريات داخل جسم الحيوان (الفئران المختبرية) وذلك لان الظروف البيئة لجسم الحيوان غير ملائمة لانبات السبور مثل درجة حرارة الحيوان ومصل الحيوان[12،13] ربما يعود التأثير المرضي للسبورات الى احتوائها على المركبات العطرية متعددة الحلقات مثل Naphthalene و Acenaphthylene و Fluorene والتي تعتبر من اخطر مسببات الاورام السرطانية حيث تحتوي الحنطة المتفحمة المليئة بسبورات فطر الـ *Tilletia* على 100 ppm من المركبات العطرية متعددة الحلقات، بينما تتراوح التراكيز القصوى المقبولة لهذه المركبات في البيئة ما بين (0.1 – 2.5 ppm) [10 ، 11] اما بخصوص التغيرات المرضية فلا توجد أي دراسة مماثلة حسب علمنا لاغراض المقارنة .

ان تركيز سبورات الفطر حاوية على مادة Trimethyl amine ذات الرائحة الكريهة بالاضافة الى احتوائها على مواد قيرية تعتبر من اخطر المواد المسببة للامراض السرطانية كما يؤثر استنشاق هذه السبورات على جهاز التنفس [9] تشير المصادر الى ان تناول الخبز المحتوي على سبورات الفطر يسبب حالة تسمم تعرف بالـ Ustilaginism حيث تتمثل الاعراض بمغص وتقئ واضطرابات في الجهاز الهضمي والعصبي . كما يسبب هبوط في ضغط الدم وتثبيط عمل غدة الادرينالين في الجسم ويؤثر على الجهاز العصبي الودي بالاضافة الى ان هذه السبورات تسبب الاجهاض خصوصاً في المواشي [9، 10، 11] .

لقد نصت المواصفات القياسية العالمية على خلو الحنطة المستخدمة للغذاء البشري تماماً من أي حبة مصابة بالتفحم ومنها المواصفات الامريكية والاوربية والكندية ، بينما سمحت باستخدام الحنطة المصابة بالتفحم بنسبة 0.1 جزء بالمليون (0.1 ppm) كعلف للحيوانات [3 ، 10 ، 14] .

الاستنتاجات والتوصيات :

1. يجب الانتباه الى ان استهلاك الحنطة الملوثة بسبورات التفحم حتى ولو كانت بنسبة صغيرة جداً تشكل خطورة على المستهلك سواء كان انسان او حيوان وخاصة استمرار استهلاكها يومياً حيث ان سبورات الفطر تحتوي مواد خطرة على صحة الحيوان وعليه فان استخدام هذه الحيوانات كمصدر غذائي للإنسان فيما بعد يشكل خطورة على صحتة. وعليه يجب اعتماد مواصفة قياسية تخلو بموجبها حبوب الحنطة من اي تفحم .
2. اجراء التحاليل المستمرة للحوم الحيوانات التي تتغذى على الحنطة المصابة بالتفحم للتأكد من خلوها من المواد المسرطنة والمركبات العطرية متعددة الحلقات مثل Naphthalene و Acenaphthylene و Fluorene .
3. يجب ان تتخذ وزارة الزراعة كافة الاجراءات لمنع انتشار المرض الذي يهدد المحاصيل العراقية، وبالتالي يهدد الثروة الحيوانية والصحة العامة.
4. يجب استخدام الحبوب المعقمة تماماً واتخاذ كافة الاجراءات لتعفيرها قبل الزراعة والتزام المزارع بزراعة بذور معفرة وتوعية الفلاح بمخاطر زراعة البذور الملوثة بالتفحم .

المصادر :

1. الشريف ، د. فياض محمد 1985. علم إمراض النبات، جامعة صلاح الدين، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق. ص 156-158.

2. مهدي, شكري1991. اساسيات الفطريات والامراض النباتية، جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق . ص 88-90 .

3. ابو صالح، محمد صبحي وعوض، عدنان محمد1983 . مقدمة في الاحصاء . جامعة اليرموك ، الاردن . ص 110-115.

4. Acgih S.F., 1991. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices, (6th ed). Cincinnat : , OH : American conference of Governmental Industrial Hygienists,. pp.198-205.

5. Banziger I.; Forrer H.R.; Schachermayr, G.; Gindrat D. And Frei P. , '' Resistance of wheat varieties to common burt " Journal of Swiss Agricultural Research .2003.vol. 10, No. 8, pp. 328 – 333.

6. Kumar A.; Singh U.S.; Singh A.; Malik V.S. and Garg G.K., " Molecular signaling in pathogenicity and host recognition smut fungi taking Karnal bunt as a model system " Indian Journal Experimental Biology. 2000. Vo 1.38 , No 6 , pp. 525-539 , 2000.

7. Atlas, R.M; Brown, A.E.and Parks, L.C.. *Experimental Microbiology*,Laboratory Manual.Mosby company,London 1995.pp.505-509.

8. Humason C.L.,. Animal tissue techniques . (3^{rd} edition). W.H. Freeman & Company , 1972.pp.211-218.

9. . Chahal S S.; Aulakh K.S and Mathur, S.B. " Germination of telio spores of *Tilletia abarclayana*, the causal agent of Kernel Smut of rice in relation to some physical factors " *Journal of Phytopathology* (Berlin).1993. vol. 137 , No10, pp. 308.

10. Potter, S.O. Acompend of *Materia Medica* , Therapeutics , and *Prescription riting.w Arnica* and *Trimethylamine* .2003.http//www.Jbc.org. Internet. 30-12-2007 .

11. OSHA.. Occupational safety and health guide line for Trimethylamine.2004.OSHA@umich.edu.Internet.20-2-2008.

12. Tprescott,J.M. Ted case studies. Wheat and U.S.china Relations.2000. http://greengenes.cit.cornell.edu. Internet . 12-5-2007.

13. Wall, J.H.Washington State university. Department of Plant Pathology . Commen Bunt of Wheat.2005.http://wall johnson.edu.Internet. 20-2-2008 .

14. Zheng, Z,: Dakai, Z,: Hong , T.; Jinhuo. P. And zhinong, M. Study on heat tolerance of *Tilletia foetida*.1999. http://zhinong.com.Internet.20-2-2008.