

# IJST

## INTERNATIONAL

Journal for Sciences and Technology

VOL. (12)- NO. (2)- JUNE 2017

ISSN:2305-9346

ICV: 63.75 / SJIF: 4.487 / GIF: 0.81 / DOI: 10000 / SAIF: 4.32

[www.ijst-jo.com](http://www.ijst-jo.com)

# IJST International Journal for Sciences & Technology

International Journal for Sciences and Technology

المجلة الدولية للعلوم والتكنولوجيا

---

Volume 12. No. 2/ June 2017 / ISSN: 2305-9346

---

***A Refereed Scientific Journal Since 2006***

مجلة علمية محكمة منذ عام 2006

***Issued By:***

***The International Centre for Advancement of Sciences and Technology***

***In a cooperation with TSTC - Jordan***

IJST Contact Information:

P.O. Box 2793 Amman 11953 Jordan

Tel. +962796543469

E-mails: [info@ijst-jo.com](mailto:info@ijst-jo.com) / [ijst.jordan@yahoo.com](mailto:ijst.jordan@yahoo.com)

URL: [www.ijst-jo.com](http://www.ijst-jo.com)



**Al- Shammari , Abdul- Jabbar N.**

*(Editor-in- Chief)*

Professor of Microbiology / Dept. of Medical Laboratory Sciences / Faculty of Sciences / Al-Balqa' Applied University / Al- Salt / Jordan  
*shammari@ijst-jo.com*

**Abbas, Jamal A.**

Professor of Plant Ecophysiology / Faculty of Agriculture / Kufa University / Iraq  
*phdjamal@yahoo.com*

**Abood, Ziad M.**

Professor of Physics / College of Education / University of Al-Mustansiriyah / Baghdad / Iraq  
*dr.ziadmabood@uomustansiriyah.edu.iq*

**Abdul- Ghani, Zaki G.**

Professor of Microbiology/ Faculty of Pharmaceutical Sciences / Amman Private University / Jordan  
*zaki\_abdulghani@yahoo.com*

**Abdul- Hameed, Hayder M.**

PhD in Environmental Engineering / Environmental Engineering Dept./ Faculty of Engineering/ University of Baghdad/ Iraq  
*hayderalmunshi@yahoo.com*

**Abdullah, Ahmed R.**

PhD in Cancer Immunology and Genetics /Biotechnology Research Centre / Al- Nahrain University / Baghdad / Iraq  
*ahmedrushdi1970@yahoo.com*

**Al- Daraji, Hazim J.**

Professor of Avian Reproduction and Physiology / Animal Resources Dept./ College of Agriculture / University of Baghdad / Iraq  
*prof.hazimaldaraji@yahoo.com*

**Al- Douri, Atheer A. R**

PhD in Microbiology/Faculty of Veterinary Medicine/ University of Baghdad / Iraq  
*aaldouri96@yahoo.com*

**Al-Dulaimy, Ahmed F.**

Professor of Plant Nutrition and Horticulture/ Dept. of Horticulture and Landscape Gardening / Faculty of Agriculture / University of Anbar / Iraq  
*ahmedzubar@yahoo.com*

**Al- Faris, Abdulbari A.**

Professor of Surgery / Dept. of Surgery and Obstetrics / College of Veterinary Medicine / University of Basrah / Iraq  
*Vetedu2000@yahoo.com*

**Al- Jashami, Najim A.**

Professor of Nuclear Material Sciences / Dept. of Physics / College of Sciences / Kufa University / Iraq  
*na\_phys@yahoo.com*

**Al- Mashaykhi, Akram Othman**

PhD in IT / Amman Arab University for Graduate Studies / Jordan  
*akram.othman@gmail.com*

**Al- Mathkhoury, Harith J F.**

Professor of Medical Microbiology / Dept. of Biology / College of Sciences / University of Baghdad/ Iraq  
*harith\_fahad@yahoo.com*

**Al- Murrani, Waleed K.**

Professor of Genetics and Biostatistics / University of Plymouth/ UK  
*profmurrani@yahoo.com*

**Al- Noor, Taghreed H.**

Professor of Chemistry / Dept. of Chemistry / College of Education – Ibn Al- Haitham / University of Baghdad / Iraq  
*drtaghreed2@gmail.com*

**Al- Samarrai, Taha H.**

PhD. in Microbiology / Dept. of Medical Laboratory Sciences / College of Applied Sciences / University of Samarra / Iraq  
*tahaalsamarrai@gmail.com*

**Al- Saqur, Ihsan M.**

Professor of Parasitology/ Faculty of Sciences / University of Baghdad / Iraq  
*drihsanalsagur@yahoo.com*

**Al- Shamaony, Loai**

Professor of Biochemistry / Faculty of Pharmacy / Misr University for Sciences and Technology / Egypt  
*loaialshamaony@yahoo.com*

**Al- Shebani, Abdullah S.**

PhD in Dairy Sciences and Technology / Food Sciences Dept./ Faculty of Agriculture / Kufa University / Iraq  
*Agrifood43@yahoo.com*

**Alwachi, Sabah N.**

Professor of Physiology / Biology Dept./ College of Sciences/ University of Baghdad / Iraq  
*sabahalwachi@yahoo.com*

**Khamas, Wael**

Professor of Anatomy and Histology / College of Veterinary Medicine / Western University of Health Sciences / Poma -California/ USA  
*wael\_khamas@yahoo.com*

**Lafi, Shehab A.**

Professor of Medical Microbiology / College of Medicine / Al- Anbar University / Iraq  
*shehab\_6555@ymail.com*

**Editorial Executive Director**

**Pharmacist. Nansi Elian**

Amman- Jordan  
*ijst.jordan@yahoo.com*

---

## FORWARD

---

*Dear Colleagues,*

*IJST was a fruitful effort issued by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology – ICAST, which tries to take part in both globalization and revolution in information and communication technologies, because S&T development becoming not only the key elements of economic growth and industrial competitiveness, but also essential for improving the social development, the quality of life and global environment. ICAST took then a decision to establish a scientific alliance with TSTC (Tharwa for scientific Training & Consultations) and this alliance comes to support the efforts towards publishing IJST.*

*Today, we announce a new issue of our journal, that is the second issue from the twelve volume of IJST, June , 2017. As the Arab An Islamic worlds are moving to celebrate Eid Al-Fitr, I wish you all a happy Eid.*

*Finally, I hope that all significant figures of sciences whom joined the editorial board, the researchers, and the readers of our journal will keep IJST between their eyes and contribute in continuing its journey, with their remarks, valuable recommendations and their researching outcomes.*

*Thanks a lot for all who support IJST.*

***Editor-in-Chief***

***IJST***

***Abdul Jabbar Al- Shammari***

---

### The Referees for this Issue

---

*\* The referees and advisory group below are listed according to alphabetical order, with deep appreciation for all.*

**Prof. Abdul- Jabbar N. Al- Shammari**

*Dept. of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan*

**Prof. Abdulbari A. Al- Faris**

*College of Veterinary Medicine ,University of Basra. Iraq*

**Dr. Abdullah Sh. M. Al- Shebani**

*Dept. of food sciences, Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq*

**Dr. Abdul-Wahab R. Hamad**

*Al-Zarqa University College. Jordan*

**Dr. Ahmed A. Al- Darraji**

*Colege of Dentistry, University of Wassit. Iraq*

**Dr. Atheer A.R. Al- Douri**

*College of Veterinary Medicine, University of Baghdad. Iraq*

**Dr. Hala Al Daghistani**

*Dept. of Medical Laboratory Sciences , College of Sciences , Al- Balqa' Applied University. Jordan*

**Prof. Harith F. Al- Mathkhouri**

*College of Sciences, University of Baghdad. Iraq*

**Prof. Hazim J. Al- Darraji**

*Animal Resources Dept., College of Agriculture , University of Baghdad . Iraq*

**Dr. Ibraheem N. Al- Tarawneh**

*Dept. of Chemistry, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan*

**Prof. Jamal A. Abbas**

*Faculty of Agriculture, Kufa University. Iraq*

**Prof. Riadh Al- Ramadani**

*Faculty of Medicine, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan*

**Prof. Mahmoud M. Othman Matar**

*College of Medicine, Al- Najah National University. Palestine*

**Prof. Mjid A. Al- Attar**

*Turunto / Canda.*

**Dr. Moayyad Al- Khataybeh**

*Dept. of Chemistry and Laboratory Medicine, Faculty of Sciences, Al- Balqa' Applied University , Al- Salt . Jordan*

**Prof. Najim A. Al- Jashami**

*Dept. of Physics, College of Sciences , University of Kufa. Iraq*

**Prof. Taha H. Al- Samarrai**

*College of Sciences, University of Samarra. Iraq*

**Prof. Ziad M. Abood**

*Dept. of Physics, College of Education , Al-Mustansiriah University. Iraq.*

## TABLE OF CONTENTS

\* Articles in this issue are listed below according to field specialties order, starting by English section and followed by Arabic section.

### (I) ENGLISH SECTION

#### COMPUTER SCIENCES

- A new technique for solving optimization problems using genetic algorithm** 6-11  
*Rihab I. Ajel*

#### DENTISTRY

- Effects of treatment modalities by antihypertensive medications on the salivary flow rate and salivary compositions** 12-15  
*Ahmed O. Mnati & Ban F. Al-Drobie*

#### MEDICINE

- Detection of the level of matrix metalloproteinase-1 in breast cancer patients** 16-20  
*Muna A. Abdullah*
- Immuno-histochemical study of breast cancer in Iraqi women measured by level of matrix metalloproteinase-7** 21-24  
*Nagham H. Ali*
- Significance of family education and diabetes mellitus morbidities in Diyala province, Iraq** 25-30  
*Kareem A. Obaid & Ammar A. Mohammed Al- Shammery*

#### VETERINARY MEDICINE

- Identification of ephemerovirus species in clinically infected cattle in Basra, southern Iraq** 31-35  
*Hazim T. Al-Thwainy, Firas T. Mansour & Tamadhir A.K. Al-Hamed*

**ARABIC STUDIES AND RESEARCHES SECTION – قسم الدراسات والبحوث العربية – (II)****BIOLOGY****علوم الحياة**

- 44 -37 دور المقاومة الاحيائية في حساسية نباتات صنف الشليك قيصر Kaiser's المصابة بالفطر  
*Fusarium oxysporum*  
هديل أحمد العامري
- 52 -45 دور المقاومة الحيوية في التقدير الكمي لمنظم النمو ABA لنباتات صنف الشليك قيصر Kaiser's المصاب  
بالفطر *Fusarium oxysporum*  
نديم أحمد رمضان، هديل أحمد العامري
- 58 -53 دور السيلينيوم في تحمل نبات الباقلاء *L.Viciafaba* للإجهاد الملحي  
أمل غانم محمود القزاز، رفيف وائل محمود عطار باشي، إيمان حسين هادي الحياني، سهاد سعد يحيى

**AGRICULTURAL SCIENCES****العلوم الزراعية**

- 64 -59 التأثير المضاد لبعض المركبات السمادية الحاوية على العناصر الصغرى ومستخلص الثوم على المسبب المرضي  
*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.  
سعد الدين شمس الدين سعد الدين، ألحان هاشم شيت، أحمد رحيم ناصر، سيف أحمد عبد الرزاق، نجاد عدنان سعد

**CHEMISTRY****الكيمياء**

- 72 -65 التقدير الآتي للكميات دقيقة الصغر للباراسيتامول والكلورفينارامين مالييت والكوافينيسين وهيدروكلوريد  
البروميكسين في مستحضرها الصيدلاني رباعي المكونات  
خلف فارس السامرائي

## ***ENGLISH SECTION***

## A new technique for solving optimization problems using genetic algorithm

Rihab I. Ajel

Dept. of Computer Sciences / College of Sciences / University of Mustansiriyah / Republic of Iraq

E- mail: dr.ziadmabood@uomustansiriyah.edu.iq

### ABSTRACT

The present study suggested a new modified genetic algorithm technique that is used to solve a sequencing and optimization problems. The presented model is tested using a mathematical problem of first order multi variable equation. The results show that the presented technique can exceed the traditional genetic algorithm system in term of both less calculation time and more accurate outcome. In many cases, the worst scenario of genetic algorithm systems is reaching the solution to local minima/ maxima. The main objective of the paper is to employ two strategies to avoid this problem. First, is to use the Eltisisim process, in which, a part of the current population to contribute its values in the next generation of the process. Second, is to use crossover mask, which confine the mate between any two chromosomes in the current population to those that produce the best children of the best fitness in the next generation. Also, Eltisisim and crossover procedures will work simultaneously to speed up the processing time and reduce the number of iteration to reach to the optimal solution.

**Keywords:** genetic algorithms, Eltisisim, local minima/ maxima

### الملخص باللغة العربية

في هذه الدراسة، تم اقتراح تقنية الخوارزمية الجينية المعدلة التي يتم استخدامها من أجل حل التسلسل والتحسين المشاكل. تم اختبار النموذج المقدم باستخدام مشكلة رياضية من الدرجة الأولى ذات المعادلة متعددة المتغيرات. وأظهرت النتائج أن بهذه التقنية يمكن أن يتجاوز عرض النظام الخوارزمية الجينية التقليدية ليكون أقل وقت حساب ونتائج أكثر دقة. في كثير من الحالات، وأسوأ سيناريو أنظمة الخوارزمية الجينية هو الوصول إلى أقل وأكبر قيمة موضوعية. الهدف الرئيس من هذه الدراسة هو استخدام استراتيجيتين لتجنب هذه المشكلة. فأما الأولى، فتمثلت باستخدام طريقة Eltisisim، وهي جزء من السكان الحاليين للمساهمة في الجيل القادم من هذه العملية. في حين تمثلت الاستراتيجية الثانية باستخدام قناع crossover، الذي يحصر الفرد بين أي اثنين من الكروموسومات في عدد السكان الحالي لتلك التي تنتج أفضل الأطفال بأفضل لياقة بدنية في الجيل القادم. كما ستعمل طريقة Eltisisim وإجراء التقاطع العمل في نفس وقت المعالجة على تقليل عدد التكرارات للوصول إلى الحل الأمثل.

## INTRODUCTION

The science that deals with the mechanisms responsible for similarities and differences in a species is called Genetics. Basically, genetic algorithms that are directly derived from natural evolution are normally used for the resemblances and differences due to the natural heredity (1).

The optimization problems, on the other hand, are the techniques used for finding the best solutions for many complicated problems. A variability of techniques and algorithms are presented in order to solve the problem in hand. In the last years, different structures of genetic algorithms (GAs) have been introduced for solving optimization problems. However, the success of any GA depends on the design of its search operators, as well as their appropriate integration (2,3).

Genetic algorithm developed by Goldberg was inspired by Darwin's theory of evolution, which stated that the survival of an organism is affected by rule "the strongest species that survives". Basically, the algorithm relies on the idea that any organism (one part of the problem solution) can be maintained through the process of reproduction, crossover and mutation (4).

The evaluation (or searching for the best solution) is used in the computational algorithm to generate the objective function. A solution generated by genetic algorithm is called a chromosome, while collection of chromosome is referred as a population (5). A chromosome is composed from genes and its value can be either numerical, binary, symbols or characters depending on the problem needed to be solved. These chromosomes will undergo a process called fitness function to measure the suitability of solution generated by GA with problem. Some chromosomes in population will mate through process called crossover, thus producing new chromosomes named offspring, which genes composition are the combination of their parents. In a generation, a few chromosomes will also have mutation in their gene (4).

The number of chromosomes which will undergo crossover and mutation are controlled by crossover rate and mutation rate values (6). Chromosomes in the population that will maintain for the next generation will be selected based on Darwinian evolution rule, the chromosome which has higher fitness value will have greater probability of being selected again in the next generation. After several generations, the chromosome value will converge to a certain value which is the best solution for the problem (7).

In the present study, a proposed algorithm was suggested for a new way to deal with selection and crossover that working with evaluation all together simultaneously to generate the best offspring. The experimental analysis showed that the algorithm converges quickly to the optimal solution and thus exhibits a superior performance in comparison with other algorithms that also solved those problems.

## Conventional optimization problem and genetic algorithm search techniques

Optimization is the process to find the best optimal solution for the problem under some considerations (8). Optimization can be applied to any scientific or engineering problems. However, with all proposed techniques, still there is no specific method can solve all optimization problems.

One of the more accepted techniques for the optimization problems is the genetic algorithm. GAs reach the optimal minimum or maximum solution with substantially fewer iteration steps than the more intricate algorithms. The key power of such algorithm, however, is its ability to work in the environments where there is little or no information available about the gradients of the function at the evaluated points. The function itself does not need to be continuous or differentiable (9). Genetic algorithms can still achieve good results even in cases in which the function has several local minima or maxima (10).

These properties of genetic algorithms have their price: unlike traditional random search, the function is not examined at a single place, constructing a possible path to the local maximum or minimum, but many different places are considered simultaneously. The function must be calculated for all elements of the population. The creation of new populations also requires additional calculations (11).

In this way, the optimum of the function is sought in several directions simultaneously and many paths to the optimum are processed. However, when comparing with other stochastic methods, genetic algorithms have the advantage that they can be parallelized with little effort. Since the calculations of the function on all points of a population are independent from each other, they can be carried out in several processors (12).

Genetic algorithms are thus inherently parallel. A clear improvement in genetic algorithm performance can be achieved in comparison with other non-parallelizable optimization methods.

Generally, the main step for the general genetic algorithm can be summarized as follows:

- 1- Initial population:** Determine the number of chromosomes, generation, mutation rate, crossover rate, elitism rate, and the initialization value of the genes chromosome-chromosome with a random value.
- 2- Evaluate fitness:** Evaluation of fitness value of chromosomes by calculating objective function.
- 3- Reproduction:** which includes three major steps;
  - (a) Elitism
  - (b) Selection and Crossover
  - (c) Mutation
- 4- Solution:** To get the best chromosome in the population; the best solution for the problem.

## EXPERIMENT AND METHODS

### The proposed modification algorithm

The model presented in this study includes some important modifications on the general genetic algorithm steps. In this section the basic steps of the model will be shown to reflect the importance of each step in the algorithm. As normal, for any genetic algorithm technique, generation of a random population for and problem are needed, which represent a trivial solution for and problem in hand. In order to make work clear and show the effect for each step in the process, a numerical example for optimization and run the genetic algorithm step will be taken to describe how the modification steps can speed up the optimization problem solution comparing to the normal genetic algorithm steps.

Suppose there is an equality

$$x_1 + 2x_2 + 3x_3 + 4x_4 = N$$

where,  $x_1, x_2, x_3, x_4$  are the variables that needed to be found to match the function with any value for the variable  $N$ . the genetic algorithm will be used to find these values that satisfy the above equation. First the objective function should be formulated for this problem.

The objective is minimizing the value of function

$$f(x) :$$

$$f(x) = (x_1 + 2x_2 + 3x_3 + 4x_4) - N \quad (1)$$

So, our chromosome can be as follows;

**X1 X2 X3 X4**

The main steps pf our proposed system can be as follows:

#### Step1: Initialization:

For any problem in genetic algorithms, we should start with suggest some solutions for the problem in hand. For this example we generated random value

of gene  $x_1, x_2, x_3, x_4$  for 6 chromosomes ( we can take more or less chromosomes).

Chromosome [1] = [x1, x2, x3, x4] = [12; 05; 23; 08]  
 Chromosome [2] = [x1, x2, x3, x4] = [02; 21; 18; 03]  
 Chromosome [3] = [x1, x2, x3, x4] = [10; 04; 13; 14]  
 Chromosome [4] = [x1, x2, x3, x4] = [20; 01; 10; 06]  
 Chromosome [5] = [x1, x2, x3, x4] = [01; 04; 13; 19]  
 Chromosome [6] = [x1, x2, x3, x4] = [20; 05; 17; 01]

#### Step2 : Evaluation:

The objective function for each chromosome can be computed using

$$F_{obj} = Abs(f(x)) \quad (2)$$

where, the  $f(x)$  is the function that we need to minimize. Now, in order to compute fitness

probability we must compute the fitness of each chromosome. The fitness function is:

$$Fitness = \frac{1}{(1 + F_{obj})} \quad (3)$$

After running the fitness function on all the chromosome values, we got such these results that represented the first round of fitness estimation process:

$$Fitness = [0.0106, 0.0123, 0.0119, 0.0213, 0.0105, 0.0179]$$

As we can notice that chromosome 4 has the maximum fitness value (0.213), which means that this chromosome can give the best estimations comparing with other chromosomes. We need to update the suggesting solutions for this chromosome and others to get more and more high fitness values.

#### Step 3 : Reproduction:

In this step, we try to generate new set of chromosomes in the population that represent new solutions in the program. To do so, the reproduction step will include two major stages; namely, the Elitism, selection and crossover:

**1- Elitism:** In this stage the aim is to generate new chromosome for the next generation. However, the probability of loosing the best solution that already exist in the current population is high. So, in this step, Elitism can be adopted. The idea is to limit best solution losing of the current population to lower level. Elitism ( in our system ) will let only 65% of the current population to reproduct (contributes in the Selection and crossover for next generation production). This means that the process will keep 35% of the the current population chromosomes (the best ones) unchanged. This will let a part of the current population to be one important section of the next generation. based on the Elitism process, chromosomes 4, and 6 of the current population will keep their values for the next generation;

New chromosome[1]= chromosome[4]= [20; 01; 10; 06]  
 New chromosome[2]= chromosome[6]= [20; 05; 17; 01]

**2- Selection and crossover:** Only the leftover of the Elitism process of the previous stage (about 65% of the population) will contribute in the selection and crossover stage. In this stage, the selection and cossover process will follow these steps:

- \*Select one chromosome and let it crossover will all other chromosomes in the population.
- \* The crossover process will adopt unified crossover by generate mask randomly.
- \* After each crossover, the process will examen the fitness for each new child in the next population.

When we do all above steps for all chromosomes for current population, only children with highest fitness will be part of the next generation chromosomes. Two crucial points can be noted in step 3; First, is the Elitism process which will contribute in the limitation of losing fine chromosomes with best fitness in the current population and let them to take part in the next generation. Second, is to use crossover mask that allow us to choose the best mated chromosomes that generated the best child with highest fitness for the next generation.

#### Step 4 : Mutation:

Number of chromosomes that could have mutations in a population is determined by the mutation rate parameter. Mutation process is done by replacing the gen at random position with a new value. The process can be summarized as follows; for each population calculate the total length of gens in all chromosomes of the current population:

$$K = G * C \quad (4)$$

where,  $K$  represents the total number of gens in all population,  $G$  is the number of gens of each chromosome, and  $C$  is the number of chromosomes in the population. Mutation process is done by generating a random integer between 1 and  $K$ . If generated random number is smaller than mutation rate ( $pm$ ) variable then marked the position of gen in the chromosomes. Suppose, for example, we define  $pm$  10%, it is expected that 10% (0.1) of  $K$  in the population that will be mutated. In other words, the number of the mutation in the current population will be;

$$M = pm * K \quad (5)$$

where,  $M$  is the number of mutation, and  $pm$  is the mutation rate.

Suppose the algorithm generate random numbers (7 and 21) then the chromosomes which have mutation are Chromosome #2 for gen #3 and Chromosome #6 and gen #1. The value of mutated gens at mutation point is replaced by random number between 0- $N$  ( $N$  is the variable in equation [?]). Suppose generated random number are 2 and 5 then Chromosomes #2 and #6 will get these values replaced with the new ones.

After all those steps of our proposed system, the algorithm will generate new population that represent a new set of chromosomes which represent new set of our problem solutions. So, after one iteration or one generation of the genetic algorithm, we can now evaluate the objective function and we have got those values:

Chromosome [1] = [x1, x2, x3, x4] = [20; 01; 10; 06]  
 Chromosome [2] = [x1, x2, x3, x4] = [20; 05; 20; 01]  
 Chromosome [3] = [x1, x2, x3, x4] = [10; 06; 02; 11]  
 Chromosome [4] = [x1, x2, x3, x4] = [10; 01; 09; 13]  
 Chromosome [5] = [x1, x2, x3, x4] = [12; 01; 07; 20]  
 Chromosome [6] = [x1, x2, x3, x4] = [05; 10; 03; 06]

And the fitness values for all the chromosome in this new population are:

$$Fitness = [0.0213, 0.0179, 0.023, 0.01612, 0.0116, 0.034]$$

From the evaluation of new Chromosome we can see that the fitness function is increasing (comparing with the previous one of the old generation), this means that we have better chromosome or solution compared with previous chromosome generation. Basically, these new chromosomes (in the next population) will undergo the same process as the previous generation; namely, evaluation, selection, crossover and mutation. The process will repeat until a predetermined number of generations is reached or the algorithm obtains the optimal solution. For this example, after 10 generations, best chromosome is obtained:

$$Chromosome = [07; 05; 03; 01];$$

This means that, if we suppose that  $N = 30$ , the optimal solution for equation  $(x_1 + 2x_2 + 3x_3 + 4x_4 = N)$  will be;

$$x_1 = 7; \quad (6)$$

$$x_2 = 5; \quad (7)$$

$$x_3 = 3; \quad (8)$$

$$x_4 = 1; \quad (9)$$

We can see that the value of variable  $x_1, x_2, x_3$

and  $x_4$  generated by genetic algorithm will satisfy that equality. In this procedure, we can declare that our proposed algorithm has speed up the processing that reach to the optimal solution with only few number of algorithm iteration (10 iteration in our example). Other techniques of genetic algorithm could take much more iterations to get the same results.

This clear improvement in the genetic algorithm strategy to get optimal solution within few iteration stems from two crucial modification in the GA algorithm. First, the proposed system suggested to let only chromosomes with less fitness value to contribute in the next generation processing. This means that part of the current population that we working with is to keep their values fixed for the next generation. Elitism will allow us to adopt such strategic of letting part of the current population to share its values in the next generation. Second, is to

use crossover mask, which in some way show us which chromosome of the current population can mate with one specific chromosome to produce one fine child of the best fitness for the next generation. Moreover, Elitism and crossover procedure will work simultaneously to speed up the processing time and reduce the number of iteration to reach to the optimal solution. Here, someone could ask that this strategy could reach the algorithm to the local

minima. However, the mutation operator will help us to avoid reaching such case of local optimal value by generating a new values for one or more gens in each iteration.

Figures (1) and (2) show the comparison of our proposed GA technique with traditional GA in terms of error reduction and fitness parameter respectively.

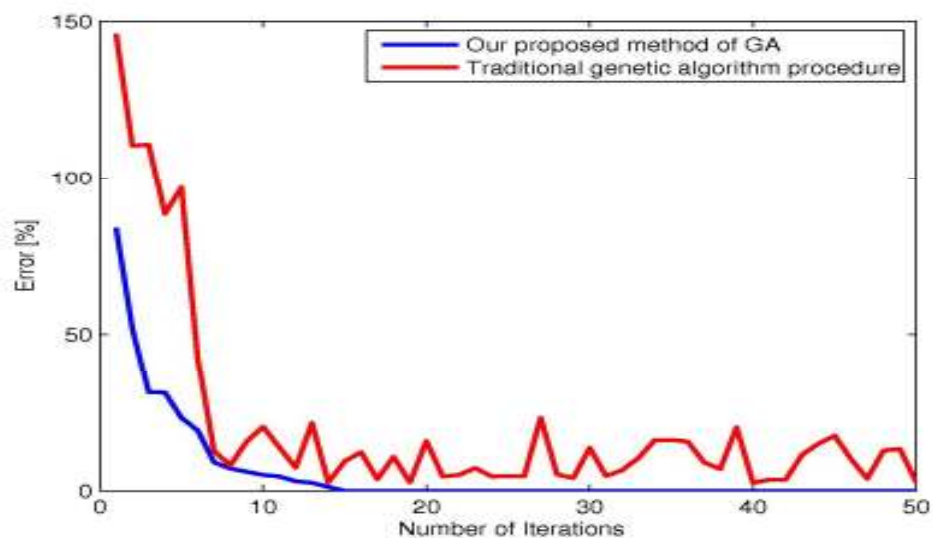


Figure (1): Error reduction in both our proposed GA and normal GA techniques

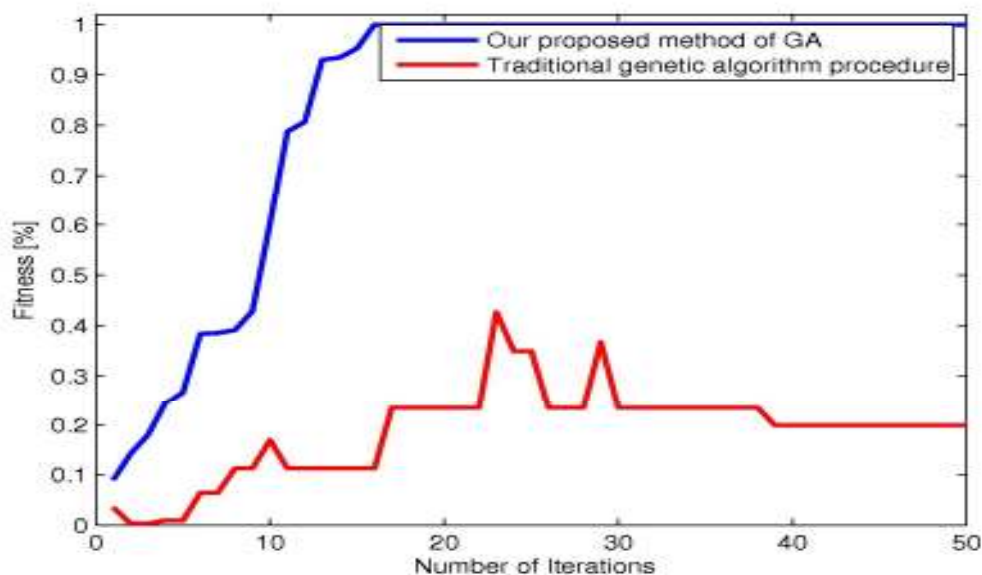


Figure (2): Fitness parameter evaluation in normal and our GA techniques

From those figures, we can see how our proposed system improves the genetic algorithm technique in finding the optimal mathematical solution in just few iteration (10 to 15) in our application in comparing normal GA. This improvment, as we see, can be justified in two reasons. First, is because the adoption of Elitism technique that, as we mentioned earlier, gave us a chance to use part of current population (best chromosomes with high fitness) to contribute in the next generation. This means that only less fitness chromosomes in the current population will undergo GA processing (selection, crossover, mutation). Also, to keep best results on the chromosomes not to change as with normal GA processing. Second, using crossover mask in any generation will allow us (the algorithm) to select which ones of the chromosomes that give us the best child to mate in the current population. So, we will never let any chromosomes (as in normal GA which select mated chromosome randomly) to exchange their values in a random way. Choosing the shape of the mask and which part to the chromosome to exchange their values is the key point in improving the population fitness for the next generation.

## CONCLUSION

Form the results of our genetic algorithm technique for finding the optimal solution in little iteration, we can conclude the followings:

- These properties of genetic algorithms have their price: unlike traditional random search, the function is not examined at a single place, constructing a possible path to the local maximum or minimum, but many different places are considered simultaneously. The function must be calculated for all elements of the population. The generation of new generation require to investigate which of the two chromosomes in the current population can nominated to generate one good child with an improvement regarding the previous population. The virtue of using crossover mask give us a option to control the crossover processing and not to let it happens randomly as normal GA does.
- An important aspect of this study is that it clearly shows the importance of introducing elitism in evolutionary optimization. Basically, elitism allows genetic algorithm techniques to keep some of their good chromosome for the next generation. This will ensure that the processing stay on the correct direction to reach the optimal solution.
- Falling in the local minima, which is the worst scenario for the GA processing, can be avoided by using the mutation processing. Mutation could play two

important role in this system. First, it will defiantly prevent the processing from plunge in local minima. Second, it will always generate new chromosome values that give a change for new solution in the processing.

## REFERENCES

1. Sivanandam SN. and Deepa SN. (2008). Introduction to genetic algorithms. Springer Publishing Company, Incorporated. 1<sup>st</sup> ed.
2. Reeves CR. and Rowe JE. (2002). Genetic algorithms: principles and perspectives: a guide to GA theory. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, USA.
3. Werner F. (2013). A survey of genetic algorithms for shop scheduling problems. in: P. Siarry: Heuristics: theory and applications, Nova Science Publishers. Pp.: 161–222.
4. Hermawanto D. (2013). Genetic algorithm for solving simple mathematical equality problem. CoRR. Vol. 1308: 4675.
5. Mitchell M. (1998). An introduction to genetic algorithms, MIT Press, Cambridge, MA. USA.
6. Alajmi A. and Wright J. (2014). Selecting the most efficient genetic algorithm sets in solving unconstrained building optimization problem. Int. J. Sust. Built Environ. 3(1): 18-26.
7. Abid Haleemb PKA. and Singhc MK. (2014). Design of a production system using genetic algorithm. The second international conference on innovations in automation and mechatronics engineering. ICIAME. Vol. (14): 390-396.
8. Koziel S. and Michalewicz Z. (1999). Evolutionary algorithms, homomorphous mappings, and constrained parameter optimization. Evolution. Comput. 7(1): 19-44.
9. Herrera F.; Lozano M. and Jose LV. (1998). Tackling real-coded genetic algorithms: Operators and tools for behavioural analysis. Artif. Intellig. Rev. 12(4):265-319.
10. Li W. (2004). Using genetic algorithm for network intrusion detection. Proceedings of the United States Department of Energy Cyber Security Group. Vol. (1): 1-8.
11. Rylander SGB. (2002). Optimal population size and the genetic algorithm. Population. 100(400): 900.
12. Rojas R. (1996). Neural networks: a systematic introduction. Springer-Verlag New York, Inc., New York, NY, USA.

## Effects of treatment modalities by antihypertensive medications on the salivary flow rate and salivary compositions

Ahmed O. Mnati and Ban F. Al-Drobie

Dept. of Oral Diagnosis / College of Dentistry / University of Baghdad / Republic of Iraq

E-mail: ahmed.oudah@yahoo.com

### ABSTRACT

Hypertension is a common chronic medical condition treated by several classes of medications that causes many oral side effects reflecting their manifestations on the quantity and quality of saliva. The aim of this study was to investigate the effect of three different types of antihypertensive medications (amlodipine, Lisinopril and valsartan) on the salivary flow rate (SFR) and salivary composition.

Eighty subjects of both genders with an age range (41-68) years were enrolled in this study; twenty healthy subjects as a control group and sixty already diagnosed hypertensive patients divided into three groups each group consist of twenty patients taking amlodipine, Lisinopril and valsartan respectively. Results showed that the concentrations of phosphorus, magnesium, calcium, sodium, potassium and chloride were significant differences in hypertensive patients under medication compared to healthy subjects except for those taken lisinopril showed non-significant differences in salivary magnesium and chloride. The SFR was significantly lower in patients taken amlodipine and lisinopril compared to healthy control, while there was no significant reduction in patients taken valsartan.

The present study concluded more pronounced effect on salivary composition by amlodipine, lisinopril and valsartan. There is a pronounced reduction in the SFR by amlodipine and lisinopril.

**Keywords:** Hypertension, saliva, dry mouth, antihypertensive drugs

### الملخص باللغة العربية

يعتبر ارتفاع ضغط الدم من الأمراض المزمنة والتي تتطلب معالجة بأنواع من الأدوية التي تختلف حسب عملها، لكنها بالنتيجة تؤثر على صحة الفم وخاصة على تكوين وسيولة اللعاب. هدفت هذه الدراسة إلى التحري عن تأثير المعالجة بثلاثة أنواع من أدوية مخفضات ضغط الدم وهي المولوديبين وليزنوبريل وفارسنتان على تكوين سيولة اللعاب. خضع للدراسة ثمانون حالة مثلت كلا الجنسين وبأعمار تراوحت بين 41 إلى 68، منها 20 حالة لا تشكو من ارتفاع الضغط (سيطرة سلبية) بالإضافة إلى ستين حالة شخصت سريريا بأنها تعاني ارتفاعا بضغط الدم وتم تقسيمهم إلى ثلاث مجموعات، كل مجموعة تناولت أحد العلاجات المذكورة أعلاه. أظهرت النتائج أن تراكيز الفسفور والمغنيسيوم وكالسيوم والبوتاسيوم والصوديوم والكلوريدات كانت ذات فروق معنوية مع الأشخاص الأصحاء ما عدا المجموعة التي عولجت بعقار (lisinopril) حيث لم تظهر فرقا معنويا من حيث تراكيز المغنيسيوم والكلوريد في اللعاب، وبنفس الوقت لوحظ أن معدل سيولة اللعاب أقل عند الحالات التي عولجت بعقار (amlodipine and lisinopril). ولا يوجد أي فرق معنوي مع الحالات التي عولجت بعقار (Valsartan). استنتجت الدراسة أن للأدوية المستعملة في علاج ضغط الدم تأثيرات مختلفة على تكوين وسيولة اللعاب.

## INTRODUCTION

Antihypertensive drugs (AHD) are prescribed with the lifestyle measures, such as healthy diet with less salt, to lower blood pressure in hypertensive people. These medications reflect side effects on various body systems and body fluids such as serum and saliva (1).

Saliva is a mirror to the general health condition. It is to dentist what blood is to a physician (2) and its contents are analyzed and used to diagnose specific effects or to assay the presence of certain substances (3). Differences in the concentrations of the salivary electrolytes may affect the SFR and consequently the oral health condition (4, 5).

The aim of this study was to investigate the effects of different modalities treatment by antihypertensive medications with discipline mode of action on SFR and compositions.

## MATERIALS AND METHODS

**Patients:** Eighty patients (from both gender) aged 41– 68 years were investigated in this study. The population was divided into four groups, each group consist of 20 persons; the first group was normotensives (control), while resting groups took AHDs; amlodipine, Lisinopril and valsartan respectively.

All patients have normal function according to past medical history, patients and volunteers were selected and their clinical histories were obtained. Blood pressure is measured then the unstimulated saliva was collected and kept at -20 C° till the time of analysis. It seems that salivary sampling time from 9-11 AM are recommended since most of the study variables were closed to the daily mean at that time points,

moreover, subjects and patients were told not to eat and/or drink for one hour before each sampling (6).

The SFR (ml/min) was estimated by dividing the total collected saliva volume (ml) that was measured during sample collection using graduated plastic tube by the collection time of 5 min (7). Magnesium, calcium, sodium and potassium were measured by using Atomic absorption spectrophotometer; while inorganic phosphorus and chloride were measured by colorimetric method.

The AHD used included amlodipine (Amaday, Ajanta Pharma Ltd) 5-10 mg which is a calcium channel blocker (CCB), Lisinopril (Zestril, Astra Zeneca) 5-10 mg which is an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor and valsartan (Diovan, Novartis India Ltd) 80-160 mg as an angiotensin II receptor blocker (ARB).

## RESULTS

The age range of the study population was (41-68) with mean age of healthy control subjects was 47.7±4.9 years, while the mean age of hypertensive patients taking amlodipine, Lisinopril and valsartan were (54.4±6.8, 52.4±7 and 55.7±6.8 respectively). The healthy subjects and hypertensive patients showed normal levels of systolic and diastolic blood pressure during sample collection. Table (1) showed that the SFR was significantly reduced ( $P<0.001$ ) in hypertensive patients taken amlodipine (0.18 ml/min) and Lisinopril (0.18 ml/min) when compared to healthy subjects (0.51 ml/min), while non-significant decrease ( $P=0.2$ ) was seen in hypertensives taken valsartan (0.43 ml/min). Also table (1) summarizes the variations in salivary electrolytes of both the normotensives and the three hypertensive groups.

**Table (1): The difference in mean salivary measurements of selected minerals between the four study groups**

	Healthy control n (20)	Study groups			P
		Amlodipine n (20)	Lisinopril n (20)	Valsartan n (20)	
Salivary flow rate (ml/min)					<0.001
Range	(0.37 to 0.8)	(0.07 to 0.4)	(0.05 to 0.52)	(0.27 to 0.9)	
Mean	0.51	0.18	0.18	0.43	
SE	0.03	0.02	0.03	0.03	
P		<0.001	<0.001	0.2[NS]	
Salivary phosphorus (mmol/L)					<0.001
Range	(4.77 to 7.1)	(7.86 to 15.32)	(6.94 to 10.3)	(6.64 to 13.33)	
Mean	6.35	12.18	8.58	8.67	
SE	0.16	0.44	0.21	0.35	
P		<0.001	<0.001	<0.001	
Salivary magnesium (mmol/L)					<0.001
Range	(0.35 to 0.49)	(0.13 to 0.33)	(0.21 to 1)	(0.14 to 0.28)	
Mean	0.41	0.24	0.34	0.22	
SE	0.01	0.01	0.06	0.01	
P		<0.001	0.81[NS]	<0.001	
Salivary calcium (mmol/L)					<0.001
Range	(2.15 to 2.6)	(1.52 to 2.18)	(1.56 to 2.13)	(1.63 to 2.52)	
Mean	2.37	1.94	1.86	2.03	
SE	0.03	0.04	0.03	0.05	
P		<0.001	<0.001	<0.001	
Salivary sodium (mmol/L)					<0.001
Range	(15.9 to 20.57)	(12.6 to 16.71)	(8.17 to 11.7)	(7.56 to 12.45)	
Mean	18.28	14.38	10.09	9.85	

SE	0.28	0.26	0.21	0.28	
P		<0.001	<0.001	<0.001	
Salivary potassium (mmol/L)					<0.001
Range	(6.37 to 10.7)	(14.3 to 17.4)	(14.9 to 18.45)	(13.1 to 17.3)	
Mean	8.79	16.32	16.04	15.35	
SE	0.25	0.14	0.18	0.27	
P		<0.001	<0.001	<0.001	
Salivary chloride (mmol/L)					<0.001
Range	(19.88 to 35.78)	(31.26 to 51.39)	(23.25 to 53.74)	(26.91 to 51.55)	
Mean	27.48	43.14	31.62	34.71	
SE	0.89	1.37	1.74	1.56	
P		<0.001	0.26[NS]	0.004	

\* SE: standard error,  $P \leq 0.05$

## DISCUSSION

Hyposalivation results from diminished secretions of saliva which is a relatively common drug-related side-effect. In general, treatment with AHD has been considered to impair salivary secretion. In the present study, hypertensive patients taking amlodipine and Lisinopril showed the same mean of SFR (0.18 ml/min), which were lower than that showed by the healthy controls (0.51 ml/min). This result agrees with other studies (4, 8-11) that considered amlodipine and Lisinopril as AHD that lead to dry mouth. The third group of patients taking valsartan showed inconsiderable decrease in SFR (0.43 ml/min) which agreed with other studies (12-14) that found several members of ARBs (valsartan one of them) are not xerogenic. Table (1) revealed that there was noticeable increase in salivary phosphorus and potassium in all three treated groups when compared to healthy controls. This was in agreement with other studies (2,6). The mean of salivary phosphate in hypertensive patients taking amlodipine (12.18mmol/L) showed quietly double number than the control group (6.35mmol/L), while the mean of salivary phosphate for patients taking lisinopril (8.58mmol/L) and valsartan (8.67mmol/L) were almost equal. These differences may be due to the mode of action, where amlodipine is voltage-dependent on blocking of calcium channels, while the others have nearly similar modes of action on the renin-angiotensin system.

The salivary magnesium showed a highly significant decrease in two hypertensive groups taking amlodipine and valsartan, while the second group which was under Lisinopril showed a decrease but it was not significant when compared to control group. This is similar to a study conducted by Rasheed (6), who showed no change in salivary magnesium in patients taking captopril that belongs to the same family of Lisinopril.

The concentrations of salivary calcium and sodium were significantly lower in hypertensives taken AHD. These results were in agreement with what were found by other studies (6, 15, 16).

The concentration of salivary chloride showed an increase in the three study groups. It was significantly higher in hypertensive patients subjected to amlodipine (43.14 mmol/L) P-value (<0.001) and it was increased significantly in hypertensive patients taking valsartan (34.71 mmol/L) (P=0.004). However, this increase was

statistically non-significant in patients taking Lisinopril (31.62 mmol/L) (P=0.26) when compared to controls (27.48 mmol/L).

These findings were in agreement with (17, 18) and corresponding to a study of Rasheed (6).

## CONCLUSION

There were significant variations of salivary phosphorus, magnesium, calcium, sodium, potassium and chloride affected by three antihypertensive medications. Lisinopril has no effect on salivary concentrations of magnesium and chloride. The SFR was highly reduced in amlodipine and Lisinopril-treated hypertensive patients.

## REFERENCES

1. Chobanian AV.; Bakris GL.; Black HR.; Cushman WC.; Green LA. and Izzo Jr. *et. al.* (2003). The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 289(19): 2560-2571.
2. Aldelaimi TNN. (2006). The effect of atenolol (B-blocker) on salivary composition in patients with essential hypertension. *J. Baghdad College Dentist*. 18(3): 57-59.
3. Khanna P. and Walt DR. (2015). Salivary diagnostics using a portable point-of-service platform: a review. *Clin. Therapeut*. 37(3): 498-504.
4. Kumar P.; Mastan KMK.; Chowdhary R. and Shanmugam K. (2012). Oral manifestations in hypertensive patients: A clinical study. *J. Oral. Maxillofacial. Pathol. (JOMFP)*. 16(2):215.
5. Prasanthi B.; Kannan N. and Patil RR. (2014). Effect of diuretics on salivary flow, composition and oral health status: A clinico-biochemical study. *Annal. Med. Health. Sci. Res*. 4(4):549-553.
6. Rasheed RH. (2005). A comparative study between the effects of two different antihypertensive drugs on the salivary flow rate and salivary compositions. *J. Baghdad College Dentist*. 17(1): 43-46.
7. Jensen SB.; Mouridsen HT.; Reibel J.; Brünner N. and Nauntofte B. (2008). Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction. *Oral Oncol*. 44(2):162-173.
8. Vimompun NDDS. (2012). Xerostomia, hyposalivation and oral microbiota in patients using

- antihypertensive medications. *J Med. Assoc. Thai.* 95(1): 96-104.
9. Kaushik A.; Reddy SS.; Umesh L.; Devi BKY.; Santana N. and Rakesh N. (2013). Oral and salivary changes among renal patients undergoing hemodialysis: A cross-sectional study. *Indian J. Nephrol.* 23(2): 125.
10. Oyetola EO.; Owotade FJ.; Agbelusi GA.; Fatusi OA. and Sanusi AA. (2015). Oral findings in chronic kidney disease: implications for management in developing countries. *BMC Oral. Health.* 15(1): 24.
11. Miranda-Rius J.; Brunet-Llobet L.; Lahor-Soler E. and Farré M. (2014). Salivary secretory disorders, inducing drugs, and clinical management. *Int. J. Med. Sci.* 12(10): 811-824.
12. Nguyen CT.; MacEntee MI.; Mintzes B. and Perry TL. (2014). Information for physicians and pharmacists about drugs that might cause dry mouth: a study of monographs and published literature. *Drugs. Aging.* 31(1): 55-65.
13. Mangrella M.; Motola G.; Russo F.; Mazzeo F.; Giassa T.; Falcone G.; Rossi F. and D'Alessio O. (1998). Hospital intensive monitoring of adverse reactions of ACE inhibitors. *Minerva. Med.* 89(4):91-97.
14. Balakumar P.; Kavitha M. and Nanditha S. (2015). Cardiovascular drugs-induced oral toxicities: a murky area to be revisited and illuminated. *Pharmacol. Res.* 102:81-89.
15. Nederfors T.; Nauntofte B. and Twetman S. (2004). Effects of furosemide and bendroflumethiazide on saliva flow rate and composition. *Arch. Oral Biol.* 49(7):507-513.
16. Mitra JK.; Mantu VK. and Mitra R. (2015). To evaluate alteration of salivary sodium and potassium level in hypertensive patients with and without medication. *Int. J. Med. Res. Rev.* 3(10): 1157-1161.
17. Nederfors T.; Dahlöf C. and Twetman S. (1994). Effects of the  $\beta$ -adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human unstimulated whole saliva flow rate and protein composition. *Europ. J. Oral Sci.* 102(4): 235-237.
18. Nederfors T. and Dahlöf C. (1996). Effects on salivary flow rate and composition of withdrawal of and re-exposure to the  $\beta$ 1-selective antagonist metoprolol in a hypertensive patient population. *Europ. J. Oral Sci.* 104(3):262-268.

## Detection of the level of matrix metalloproteinase-1 in breast cancer patients

Muna A. Abdullah

College of Dentistry / University of Tikrit / Republic of Iraq

E-mail: munaabdulla@tu.edu.iq

### ABSTRACT

Matrix metalloproteinase-1 (MMP1) has attracted interest in cancer research, owing to its role in tumor progression. The present study aimed to evaluate the expression of matrix metalloproteinase-1 MMP1 in human breast cancer women patients by immunohistochemical technique. Thirty-one breast cancer patients were investigated in this study, six patients were below forty years (19.37%), 23 patients (41.93%) were between (40-49) years, 4 patients (12.90%) were between (50-59) years old and 8 patients (25.8%) were above (60) years old. Immuno-histochemical parameter was performed, with specific antibodies against, MMP-1. The results indicated that expression was related to tumor size, histological grade and regarding the malignant lesions. matrix metalloproteinase-1 MMP1 is expressed in the cytoplasm of the cells. Negative expression scored (0) were observed in 25 out of 31 samples (48.3%), while score (+) found in 5 out of 31 samples (16.12%), score (++) found in 2 out of 31 samples (6.4%) and score (+++) found in 9 out of 31 samples (29%). While the benign breast lesions revealed positive expression in (5.26%) of lesions. The study concludes that the Breast carcinomas in present work indicated overexpression strong by the MMP1 marker.

**Keywords:** breast carcinoma, matrix metalloproteinase-1 MMP1, Immunohistochemical staining, Iraqi women patients

### المخلص باللغة العربية

تمثل الدراسة المناعية النسيجية الكيميائية تقنية تعتمد في إنجاز العمل على الأجسام المضادة التي تميز البروتين المستهدف ويعبر عن النتائج بواسطة التصبغ (staining). عندما يكون تحديد الأجسام المضادة قويا، فإنها سوف ترتبط فقط بالبروتين المستهدف من الأجزاء المهمة لأنسجة الخلايا. من خلال وصف TGF-B ، فهو يظهر إيجابيا في نواة الخلايا ويتم اكتشافه بسهولة بواسطة مختلف التقنيات المكانية المناعية النسيجية الكيميائية. إن الاعتماد على نظام التهديد المستخدم في TGF-B يتطلب معايير مختلفة: يتمثل المعيار الأول في كثافة التصبغ (staining) للنواة، والثاني يعتمد على نسبة الخلايا السرطانية والتي تعطي وصفا إيجابيا. كثافة الخلايا المصبغة سوف تكون سلبية إذا لم يكن هناك وصف. بينت نتائج دراسة IHC لوصف TGF-B والكشف عنه وصفا إيجابيا بلغت قيمته في 21 (67.7%) من أصل 31 حالة، بينما 10 (32.2%) حالة لم يتم وصفها أو كانت حالات سلبية. في 19 حالة Fibroadenoma، 6 (31.5%) تم التعبير عنها إيجابيا، بينما 13 (68.4%) حالة لم يتم وصفها. وبهذا ينتج وجود فرق قوي وواضح يعتمد على قيمة الاحتمالية ( $P < 0.001$ ) بين وصف TGF-B في الحالات الخبيثة والحميدة والتي كانت كحالات لمقارنة سرطان الثدي الخبيث المدروسة بشكل ثابت. بينت النتائج وجود علاقة ارتباط بين أقسام سرطان الثدي الخبيث ووصف TGF-B ( $P < 0.001$ ) وأيضا ليس هناك علاقة ترابط قوية بين وصف TGF-B وقسم fibroadenoma ( $P < 0.001$ ).

## INTRODUCTION

The most common risk factors for female malignancy in Iraq and worldwide was breast cancer disease, which recorded nearly million cases annually (1). Breast tumors arise from terminal ductal lobular units and are divided into two phenotypes, first ductal carcinoma and the second lobular neoplasia (2). Breast cancer disease is based on the history of the family, while the invasion and virulence are based on molecular base, in addition to immunohistochemical like MMP 1 maker (3,4). Iraqi Cancer Registry recorded reports that can be summarized as follows: the commonest type of malignancy in females and there is a general trend towards an increase in the frequency and the second the incidence of breast cancer in younger age group. The environment of the cell represented the site of tumor exists, which included extracellular matrix (ECM), immune cells, fibroblasts, surrounding blood vessels, signaling molecules and other cells in the tissue. There's a close relationship between microenvironment and tumor when tumors can effects in the microenvironment through extracellular signals releasing, peripheral immune tolerance inducing, and through tumor angiogenesis promoting (5). The microenvironment of tumor cell treated angiogenesis through interfering with the required for cell recruitment and vascular construction signaling pathways. matrix metalloproteinase-1 (MMP1) have a correlation with cell metastasis and also recruited for angiogenesis under hypoxic conditions (6). The present study aimed to detect matrix metalloproteinase-1 (MMP1) expression using the immunohistochemical technique (IHC).

## MATERIALS AND METHODS

The immuno-histochemical method was used as described by Al-Anbari (1). Briefly, the tissue samples collected from breast were cut and fixed with formalin. Tissues were embedded in paraffin and placed on adhesive treated slides and were allowed to dry overnight at room temperature. Deparaffinization of slides in Xylene for 15 minutes were done twice, then the slides were immersed sequentially in series of ethanol at room temperature. Enough drops of hydrogen peroxide block were added to slides and incubated in a humid chamber at 37°C for 10 mins., then soaked 2 times in buffer (5 min for each). Sufficient drops of protein block were added to slides and incubated at 37°C for 10 min. the slides then were washed twice by phosphate buffer PH:7 (5 min for each) and finally drained and blotted gently. The diluted primary antibody was applied to each slide, incubated in a humid chamber at 37°C overnight. Early in the next day, the slides were washed in buffer 4 times (5 min for each) and drained and blotted gently as before. The secondary antibody (link antibody yellow drops) reagent was added and incubated in a humid chamber for 20 minutes at 37°C. Slides were washed 4 times in phosphate buffer pH 7 (5 min for each). After washing with buffer, the sections were incubated with horseradish peroxidase (HRP)(Streptavidin- Biotin system) and

incubated for 20 min at 37°C. Slides were washed 4 times in phosphate buffer pH 7 (5 min for each). Diluted DAB was applied on tissues in dark room, and incubated in a humid chamber for 10 min at 37°C. Then slides were washed carefully in tap water for 5 min. The slides were bathed in hematoxylin counterstain for 1-2 min, then they were rinsed with tap water for 10 min. The dehydration process for slides was performed by immersing slides in ethanol and xylene. Positive results were appeared when the cytoplasmic pigmentation cells displayed a brown staining, while when cytoplasmic pigmentation absence of immunostaining the results for the cases considered negative reading. Cut off values for all the antibodies used in the study were done with the help of a pathologist. The scoring of the immunostaining was done under a light microscope to evaluate the percentage of antibodies immunostaining; positively stained cells were counted at 5 representative fields (400X).

## Immunohistochemical scoring of matrix metalloproteinase-1 MMP1 Anti –MMP1 antibody [ab3203]

Matrix metalloproteinase-1 MMP1 [ab3203] over expression (positive) was seen in the cytoplasm of the subjected cell of breast cancer and in contrl benign cells and the scoring of positive tumor cell was considered as follows (7):

The percentage value pf intensity 0 =0-10% , 1+ =10-25%, 2+ =25-50%, and 3+ =more than 50%.

## Statistical analysis

The values of positive expression of the studied marker parameters were represented by (mean  $\pm$  standard error), and Pearson's correlation using version 7.5 of computer program SAS. The values of probability were  $\geq 0.05$  and 0.001(8).

## RESULTS AND DISCUSSION

Clinicopathological features showed total of newly diagnosed, 41 Iraqi females patients with breast cancer had mean age (42  $\pm$ 7.35) years with a range of 33 to 72 years compared with 19 patients control (with benign breast lesions their mean age were (29.21  $\pm$ 3.54) years with a range of (19 to 49 years). Regarding the malignant lesions, the age incidence in six cases below forty years were (19.37%). 13 patients (41.93%) were between (40-49) years. four cases (12.90%) were between (50-59) years old and eight cases were above (60) years old about (25.8%) as shown in the table (1). In Benign Breast lesions, 16 cases (84.21%) were less than 40 years; 3 cases (15.7%) were 40-49 years and no cases aged more than 49 years, table (1).

The invasive breast carcinomas NOS type were graded according to the Nottingham histological grading (WHO and modified Bloom-Richardson grading system), 21 (67.7%) cases were grade II and 10 (32.2%) cases were grade III. Table (1) reveals the stages of BC for 41 patients according to the TNM system, 14 cases (45. 1%) were stages (I and II); 15 cases (48.3%) were stage III and 2 cases (6.45%) were stage IV.

**Table (1): Clinicopathological characteristics of the breast cancer patients**

Parameter	Malignant breast (41)	
Age (Years)	No.	%
<40	6	19.37
40-49	13	41.93
50-59	4	12.90
≥60	8	25.80
Tumor Type		
Invasive ductal carcinoma	31	100
Histological grade		
Grade II	21	67.7
Grade III	10	32.2
Staging system		
Stages I and II	14	45.1
Stage III	15	48.3
Stage IV	2	6.4

The presented results revealed that a high age frequency of cancer was occurred between (40-49) years old (41.93%). This is due to several causes such as environmental factors, the nutrition, low exercise and poor health education. The high dose exposure to depleted uranium during the war may be considering the most causative reason for breast cancer risk increasing in the Iraqi community. Also there is no attention from the national screening programs for early diagnosis of breast cancer patients in all the country. Our results agreed with many studies in Iraq performed on breast cancer and revealed that the peak of age frequency in the Iraqi breast cancer patients was 44.5 years and that 76.8% were under 50 years (9), showed that a mean age of the 48.7 years and that 32.6% of the cancer patients were in the peak age frequency of 40-49 years.

The middle-aged and elderly women have a risk of breast cancer and consider higher in this ages when compared with young women. The strong correlation between age and breast cancer disease (10). Breast cancer affects up to one in eight women in developed countries with a median age of 61 years at diagnosis. Approximately 2% of breast cancers occur in young women between 20 and 34 years of age and 11% between 35 and 44 years of age (11). In the USA, during 2002-2006, 50% of women who developed breast cancer were at the age 61 or younger at the time of diagnosis (12). Although grading system could be variable because of its subjective nature, still it is one of the important parameters regarding prognosis evaluation (13). Grading of the malignant cases was assessed according to the Nottingham Modification of the Bloom-Richardson system (14). In this study, 67.7% were moderately differentiated (grade I) and 32.2% were poorly differentiated (grade III). In addition, the present study applied immunohistochemical techniques to detect the protein expression of matrix metalloproteinase-1 MMP1 in the Iraqi breast tissues, among both breast cancer groups and benign tumor groups.

#### **IHC expression of matrix metalloproteinase-1 MMP1**

Matrix metalloproteinase-1 MMP1 is expressed in the cytoplasm of the cells, so it differs from the other studied markers which were nucleus expressed markers. Negative expression scored (0) were observed in 15 out of 41 samples (48.3%), while score (+) found in 5 out of 31 samples (16.12%), score (++) found in 2 out of 31 samples (6.4%) and score (+++) found in 9 out of 31 samples (29%). While the benign breast lesions revealed positive expression in (5.26%) of lesions as shown in table (2).

Statistical analysis of the matrix metalloproteinase-1 MMP1 expression showed the high significant difference between the malignant breast samples expression and the benign samples ( $P < 0.001$ ). Figure (1) showed the expression of matrix metalloproteinase-1 MMP1 in the membrane of ductal carcinoma stained by IHC (Brown stained membrane which indicates the positive expression matrix metalloproteinase-1 MMP1 and the negative expression showed no nucleus staining).

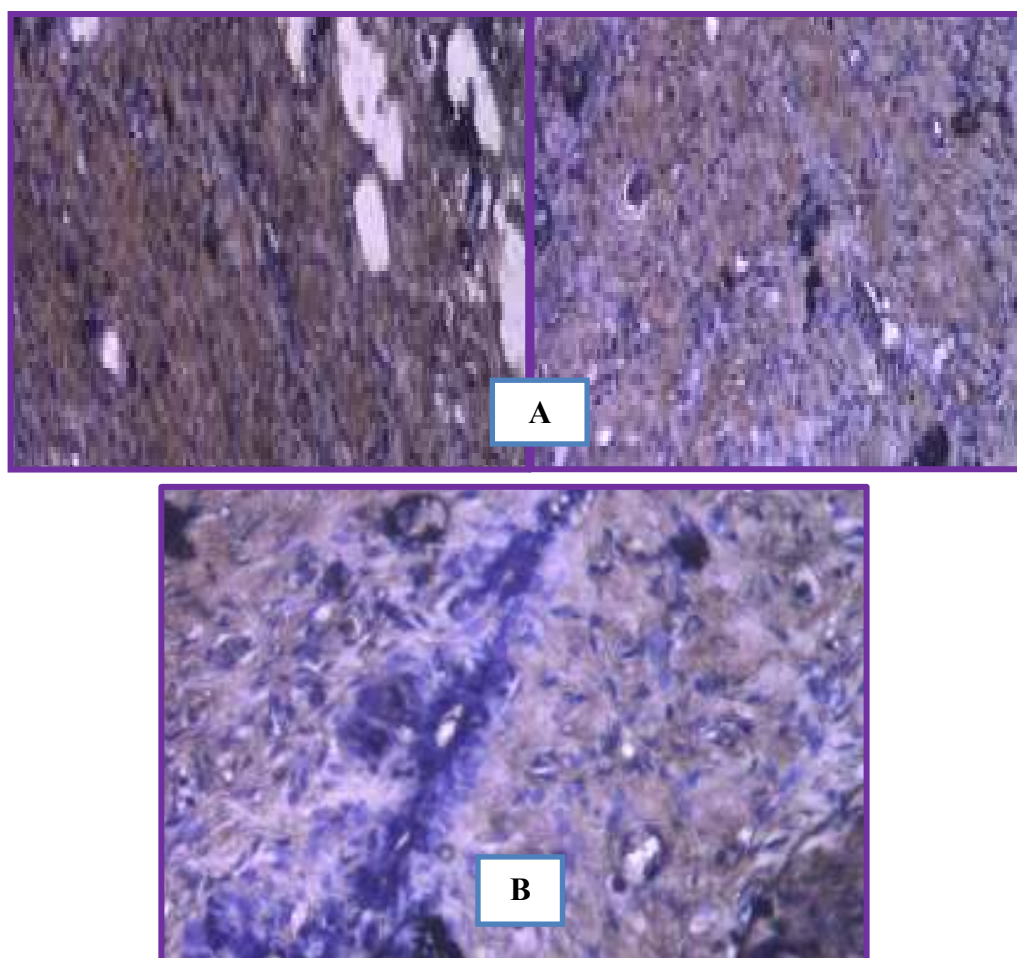
**Table (2): Immunohistochemical of matrix metalloproteinase-1 MMP1 Expression in ductal carcinoma**

Score group	0	+	++	+++	Total positive
Benign	18 (94.73%) A	0 (0%) B	0 (0%) B	1 (5.26%) C	1 (5.26%) from (19)
Malignant	15 (48.38%) AB	5 (16.12%) C	2 (6.45%) C	9 (29.03%) C	16 (51.6%) from (31)

\*\*\*  $P < 0.001$

Difference letters mean the presence of significant difference.

Same letters mean there is no significant difference



**Figure (1): Immunohistochemical staining in breast cancer sections. immunostaining by peroxidase/ DAB (brown) counterstained with haematoxylin (blue) , (A) positive matrix metalloproteinase-1 MMP1 expression(400X),(B) negative (no expression) for matrix metalloproteinase-1 MMP1 (400X)**

Matrix metalloproteinase-1 MMP1 marker represented as putative cancer stem cells marker in breast cancer, the value of MMP1 expression mean that their important roles to MMP1 marker the in the microenvironment of the tumor related to breast cancer. The results of present study can be represented by:

- 1- Evaluation of matrix metalloproteinase-1 MMP1 expression in the subjected studied cases of human breast carcinoma.
- 2- Clinicopathological correlations with the studied markers determination.

Recent evidence had suggested that breast cancer originates from CSCs, which strongly express adhesion molecule matrix metalloproteinase-1 MMP1 (15). The cell adhesion molecule matrix metalloproteinase-1 MMP1 is consider the as receptor for cell surface for glycosaminoglycan hyaluronic (HA) extracellular matrix, these activities of studied immune marker lead to different important biological events through interactions between HA and matrix metalloproteinase-1 MMP1 these interaction lead to activation, inflammatory reactions, tumor dissemination embryogenesis, hematopoiesis and lymphocyte homing (16).

Our results were relatively agreed with the results obtained from those obtained from (7) who studied the expression of matrix metalloproteinase-1 MMP1 in invasive ductal carcinoma which expressed in (43.6%), and also they completely agreed with (17) who revealed the matrix metalloproteinase-1 MMP1 marker was commonly expressed among primary breast carcinomas (51.2% of positive cases). The importance of matrix metalloproteinase-1 MMP1 marker expression lead to understanding the most important points in treatment of cancer, therapeutic target, focus on the tumor microenvironment and non-malignant cells are more stable in genetic manner and have a phenotypes not evolve into drug resistant. The microenvironment of the tumor tissue appeared that theirs contribution lead to development of tumor (17). While the microenvironment of normal cell produce signaling lead to malignant cell growth inhibition, the cell proliferation in the tumor microenvironment support against development of cancer in synergistic manner (18,19).

## CONCLUSION

Matrix metalloproteinase-1 MMP1 over expression in present studied cases lead to understand the importance of an altered microenvironment in tumorigenesis and nature of the molecular alterations underlying in treatment and suggesting molecular detection to the studied cases for more understanding (19).

## REFERENCES

1. Al-Anbari SS. (2009). Correlation of the clinicopathological presentations in Iraqi breast cancer patients with the finding of biofield breast cancer diagnostic system (BDS), HER-2 and Ki-67 immunohistochemical expressions. Ph.D. Thesis. College of medicine, University of Baghdad.
2. Al-Khafaji AJ.; Al-Kelabi LH. and Al-Dujaily EA. (2010). HER-2/neu overexpression in correlation to vascular endothelial growth factor, grade and stage of non other wised specified invasive ductal carcinoma. Al- Qadisiah Med. J. 6(10):27-37.
3. American Cancer Society. (2007). Cancer facts and figures. American cancer society. Available at: <https://www.cancer.org/>
4. Gudmundsdottir K. and Ashworth A. (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 25(43): 5864-5874.
5. Hanahan D. and Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer. *Cell*. 144:646-667.
6. Irwin ML.; Smith AW.; McTiernan A.; Ballard-Barbash R.; Cronin K.; Gilliland FD.; Baumgartner RN.; Baumgartner KB. and Bernstein L. (2008). Influence of pre-and postdiagnosis physical activity on mortality in breast cancer survivors: the health, eating, activity, and lifestyle study. *J. Clin. Oncol*. 26(24): 3958-3964.
7. Ricardo S.; Vieira AF.; Gerhard R.; Leitaño D.; Pinto R.; Cameselle-Teijeiro JF.; Milanezi F.; Schmitt F. and Paredes J. (2011). Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol*. 64:937- 946.
8. SAS. (2004). Guide personal computer (ver.7) inst. Inc. Cary. Nc., USA.
9. Jain RK. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 307:58–62.
10. Swanson CA.; Coates RJ.; Malone KE.; Gammon MD.; Schoenberg JB. and Brogan DJ. (1997). Alcohol consumption and breast cancer risk among women under age 40 years. *Epidemiol*. 8:231-237.
11. Takeshita S.; Kawamura Y.; Takabayashi H.; Yoshida N. and Nonoyama S.(2005). Imbalance in the production between vascular endothelial growth factor and endostatin in Kawasaki disease. *Clin. Exp. Immunol*. 139:575–579.
12. Wu SC.; Hotes J.; Fulton JP.; Chen VW.; Howe HL. and Correa C. (2002). Cancer in North America. *NAACCR Comb. Cancer J*. 3:92-144.
13. Yoshiji H.; Gomez DE.; Shibuya M. and Thorgeirsson UP. (1996). Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res*. 56:2013-2016.
14. Zhao J.; Yana F.; Ju H.; Tan J. and Qin J.(2004). Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett*. 204:87–95.
15. Hery C.; Ferlay M.; Boniol M. and Autier P. (2008). Changes in breast cancer incidence and mortality in middle-aged and elderly women in 28 countries with Caucasian majority populations. *Ann. Oncol*. 19(5):1009-1018.
16. Iraqi Cancer Board. (2008). Results of the Iraqi cancer registry. Baghdad. Ministry of Health.
17. Avwioro OG. (2010). Histochemistry and tissue pathology, principles and techniques. Claverianum Press, Nigeria.
18. Balasubramanian SP.; Cross SS.; Globe J.; Cox A.; Brown NJ. and Reed MW.(2007). Endostatin gene variation and protein levels in breast cancer susceptibility and severity. *BMC Cancer*. 7:107.
19. Brandy A. (2004). Breast cancer. Manual. Clin. Oncol. 5: 233-253.

## Immuno-histochemical study of breast cancer in Iraqi women measured by level of matrix metalloproteinase-7

Nagham H. Ali

College of Dentistry / University of Tikrit / Republic of Iraq

E-mail: naghamhas@tu.edu.iq

### ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a heterogeneous disease and is considered the most common cancer of women worldwide. In Iraq, BC incidence was increased, therefore, the aim of the present study was to analyze the immune-histochemical expression parameters for the BC cases using (IHC) technique. All data related to the studied formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) cases were recorded for studying the expression of matrix metalloproteinase-7. The mean value of age of the Iraqi breast cancer patients in this study were  $49.38 \pm 8.29$  years old; ranging from 26-79 years old. Matrix metalloproteinase-7 depending on the scoring system used for the MMP-7, two parameters were dependent; the intensity of the staining of the cytoplasm and the percentage of the tumor giving positive expression. The intensity of the cytoplasm of the stained cells was negative if there is no expression. The IHC study for the MMP-7 expression of the revealed that MMP-7, positive expression was found in 26 (47.3%) out of 55 cases, while 29 cases were not expressed or negative cases. In the 15 benign cases, 3 (20%) were positively expressed, but the positivity was weak and in a low percentage. The results revealed that the percentage of the MMP-7 expression were higher ( $P= 0.01$ ). Thus, there was a significant difference in the immunoexpression of MMP-7 between the malignant and the benign cases used as control cases.

**Keywords:** MMP-7, BC, Immunohistochemistry

### الملخص باللغة العربية

سرطان الثدي هو مرض غير متجانس وهو السرطان الأكثر شيوعاً بين النساء حول العالم. في العراق تزايدت فرص انتشاره ، ولذلك، تأتي الدراسة الحالية بهدف تحليل العوامل المتغيرة للوصف المناعي لحالات سرطان الثدي المشمولة في الدراسة من خلال استخدام تقنية الكيمياء المناعية النسيجية (IHC) وتطبيقها على الحالات التي تعاني سرطان الثدي. كل البيانات التي تتعلق بدراسة حالات Formalin-fixed, Paraffin-embedded (FFPE) تم تسجيلها لدراسة وصف Matrix metalloproteinase-7، ومتوسط عمر حالات مرضى سرطان الثدي في العراق في هذه الدراسة 49.38 بحدى عمري بين 26-79 سنة. متوسط العمر للحالات العراقية كان أقل من الحالات المستخدمة في الدراسة. Matrix metalloproteinase-7 يعتمد على نظام التهديد المستخدم لتحديد MM-7 على عاملين متغيرين مستقلين: كثافة التصبغ (staining) للسايوبلازم ونسبة الورم والتي تعطي وصفاً إيجابياً، في حين تكون سلبية إذا لم يكن هناك وصف. من خلال دراسة IHC لوصف MMP-7، تبين أن الوصف الإيجابي لمستوى MMP-7 موجوداً في 26 (47.3%) من أصل 55 حالة، بينما 29 حالة لم يتم وصفها أو وصفت بأنها حالات سلبية. من بين 15 حالة حميدة، 3 (20%) وصفت إيجابياً، ولكن الإيجابية كانت ضعيفة وبنسبة منخفضة. أظهرت النتائج أن نسبة وصف MMP-7 كانت أعلى عند مستوى احتمالية (P value 0.001). وبهذا يظهر اختلاف كبير في التعبير المناعي لمستوى MMP-7 بين الحالات الخبيثة والحميدة المستخدمة كمجموعات سيطرة.

## INTRODUCTION

Prognostic and predictive tumors markers are tools allowing for more precise treatment allocation of patients. A prognostic marker (or a factor) is in correlation with the expression of the outcome of the disease, ideally for untreated patients. These markers are considered as factors and show sensitivity or resistance to a subjected treatment which used and useful in oncology like different cancers marker which appeared significant response to particular therapies. Molecular chemical oncology represented the widest field in BC diagnosis (1,2). Spatially the recommended predictive markers in early stage detection were matrix metalloproteinase-7 marker used in two ways: the first was selecting endocrine-sensitive breast cancers and the second identification of metastatic breast cancer disease (2), matrix metalloproteinase-7 protein monoclonal antibody (3). Immunohistochemistry IHC technique used this marker for identification 20–75% of patients with invasive breast carcinomas BCS. Several studies had showed that the efficiency of matrix metalloproteinase-7 in prognostic value detection was alternated, based on yielding of some conflicting findings (4). Expression of Matrix metalloproteinase-7 is induced by diverse forms of cytoplasmic stresses such as hypoxia or DNA damage caused by carcinogens; ionizing radiation and UV light (5,6). Matrix metalloproteinase-7 plays important roles in inducing the response of the cell against various stresses, through molecular action spatially the genes involved in cell cycle arrest, senescence, apoptosis, DNA repair, and angiogenesis (7,8).

### The objectives of the study

1. To apply immunohistochemical expression of tumor markers technique.
2. Study and compare the immunohistochemical expression of tumor markers matrix metalloproteinase-7 in Iraqi breast carcinoma cases.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

**Breast cancer patients:** Fifty-eight Iraqi breast cancer paraffin blocks were collected from patients attended to clinical Private laboratory, clinical Private Hospital, Baghdad, Iraq between 2016-2017. The personal information for each patient was obtained, which included: name, age, and the pathological data, including histologic tumor grade and stage, were obtained from the clinical records of the patients and validated by an experienced histopathologist. All cases included invasive ductal and invasive lobular carcinoma and in situ ductal carcinoma type as confirmed by the histopathological records and examinations. Hematoxylin and eosin (H and E) stained slides were prepared from the paraffin embedded blocks and examined by a histopathologist for histopathological diagnosis and determining the degree of differentiation of the tumor.

**Benign breast lesions patients:** Sixteen samples from Iraqi patients with benign breast lesions were used in this study as control cases, which included 13 fibroadenomas and 13 benign breast lesions (9).

**Immunohistochemistry detection kit (DakoCytomation LSAB2 System)- HRP:** Immunohistochemistry studies were performed on the clinical samples under the same conditions of Code KO672 (DakoCytomation, USA) (10).

### Preparation of the reagents

#### 1- Preparation of anti- matrix metalloproteinase-7 antibodies:

The primary antibody was diluted by the common antibody diluent 1:100. Optimal antibodies concentration may vary depending on specimen and preparation method, thus optimization was done.

#### 2- Substrate chromogen solution:

One drop of the DAB chromogen was added to 1 ml of substrate buffer, by using graduated test tube provided by the manufacturer. The prepared substrate chromogen solution was stored at 2-8°C. The substrate must be mixed well before use.

#### 3- Protein-block buffer:

Fifty µl of 20X concentrated protein block buffer was diluted with deionized water to the final volume of 1000 µl. The resulting 1-X protein-block buffer concentration was ready to use and the remaining solution was stored at 4° C.

#### 4- Washing Buffer:

Ten tablets of PBS were dissolved in distilled water with 1ml of Tween 20, and the volume was completed to 1 liter. Hot plate with a stirrer is recommended for ensuring homogenization of this buffer.

#### 5- Ethanol:

To prepare 90% alcohol, 19 ml absolute alcohol was mixed with five ml distilled water, the volume was completed to 100 ml in a volumetric flask. To prepare 70% alcohol, 70 ml absolute alcohol was mixed with twenty-five ml distilled water, and the volume was completed to 100 ml in a volumetric flask. To prepare 50% of alcohol, 50 ml absolute alcohol was mixed with forty-five ml distilled water and the volume was completed to 100 ml in a volumetric flask.

#### 6- Preparation of tissue sections:

Paraffin-embedded sections were sectioned into 4-5 µm thickness, placed on Fisherbrand positively charged slides and drop of mounting media DPX (Distyrene, Plasticizer, and Xylene), was placed onto each Xylene -wet section which was quickly covered with a cover slip and left to dry.

### Evaluation of immunostaining

The expression of Matrix metalloproteinase-7 protein was measured by every tumor was given a score which represents the outcome of the intensity of the staining, the scoring system of Matrix metalloproteinase-7 as follows:

No staining = 0; low level = 1; medium staining = 2; and strong staining = 3. Staining was under light microscopy X 40. For the evaluation of every tumor was given a score which represents the outcome of the expression detected through multiplication of the intensity of the staining based on the below scoring system:

No staining = 0; low level = 1; medium staining = 2; and strong staining = 3.

Expression of immunostaining was assessed semiquantitatively using a scoring system for both intensity and extent of staining.

### Statistical analyses

Chi-square test and mean  $\pm$  S.D. were used for the clinicopathological studies. ANOVA test and *P* value were used for IHC studies, (SPSS, Inc., Chicago, USA) and Microsoft Excel.

## RESULTS AND DISCUSSION

### IHC results

Iraqi breast cancer samples were included in this study. All samples were from females. The mean age of the patients were (49.38 $\pm$ 8.29) years old; ranging from (26-79) years old. Only eight cases from BC cases were under (40) years old (14.5%); twenty cases between (40-49) years old about (36.36%); seventeen cases were between (50-59) years old about (34.54%) and eight cases above (60) years old about (14.5%). Forty-eight cases (87.3%) had invasive ductal carcinoma (moderately differentiated); while five cases had invasive ductal carcinoma (poorly differentiated); one case was suffering from invasive lobular carcinoma and one case was suffering from invasive ductal carcinoma papillary type. Fifteen samples were collected from Iraqi population and used as control cases; thirteen cases were having benign breast lesions (simple cystic mastopathy) and two were fibroadenomas cases.

The results revealed that the high age frequency of cancer occurred between (40-49) years old (36.36%). These results may be related to many main factors, spatially environmental factors, nature of nutrition, low exercise, and poor health education. With all of these factors, the exposure to a depleted uranium in high dose is considered most critical reasons for increasing breast cancer (BC) risk in the Iraqi community. Furthermore, there is weak action of the national screening programs for the breast cancer patients in Iraq (11). The obtained results agreed with many Iraqi studies conducted on breast cancer and revealed that the peak of age frequency in the Iraqi breast cancer patients was 44.5 years and that 76.8% were under 50 years (12). Another study conducted by (13) revealed that the mean age was 48.7 years and that 32.6% of the cancer patients were in the peak age frequency of 40-49 years.

The present study reflected that the risk of breast cancer (BC) showed the highest percentage in middle-aged and in elderly women when compared with young women with the percentage of risk in low percentage, which reflected the relationship between age and incidence of breast cancer. The

present study was agreed with a study conducted in the United States which had studied the correlation between BCS and age of women, and found that more than three to fourths of all breast cancers occurred in women aged 50 or older (14). However, in developed countries the profile of women disease was totally different regarding the median age of diagnosis disease, which was 61 years, and one of nine women is subjected to breast cancer (13). Only 2% of total breast cancers occurred in young women between 20 and 34 years of age and 11% between 35 and 44 years of age (15,16).

### IHC expression of matrix metalloproteinase-7 in the sections

Expression of matrix metalloproteinase-7 MMP-7 was shown in the cytoplasm of the cells and detected by IHC technique. Based on the scoring system used for the MMP-7, two parameters were used in detection; the first was the cytoplasm staining intensity and second was tumor-positive expression, if there is no staining cytoplasmic expression the results was negative. The IHC study for the MMP-7 expression of the revealed that MMP-7, positive expression was found in 26 (47.3%) out of 55 cases, while 29 cases were not expressed or negative cases. In the 15 benign cases, 3 (20%) were positively expressed, but the positivity was weak and in a low percentage. The results revealed that the percentage of the MMP-7 expression were higher (*P* value 0.01). So there was a significant difference in the immunoexpression of MMP-7 between the malignant and the benign cases used as control cases. Figure (1) shows an image of ductal carcinoma stained by IHC, brown stained cytoplasm indicated positive MMP-7 expression and blue stained nuclei indicated no expression for MMP-7 in these cells.

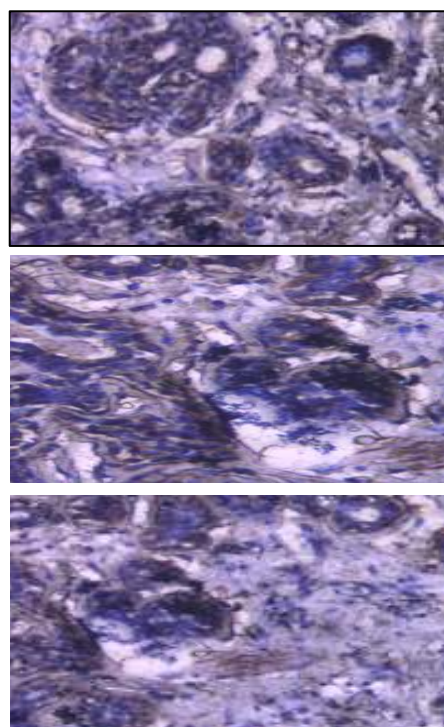


Figure (1): Immunohistochemical Expression of MMP-7, ductal carcinoma, Strong cytoplasmic staining score 3+ (brown stained cytoplasm), blue stained cytoplasm negative (no expression) for MMP-7

The results of the Iraqi Cancer Registry in 2004 (17) had revealed that the MMP-7 immunoexpression was positive in 67.8% of breast cancer patients group from the middle of Iraq (AlKufa district), while it was negative in all benign breast lesions (fibroadenoma). HER-2 immunostaining was significantly associated with histological type and recurrence of breast cancer. It was positively, yet non-significantly, correlated with tumor grade, suggesting that MMP-7 overexpression plays an important role in the pathogenesis of breast cancer and is associated with a worse prognosis. Furthermore, Smith *et. al.* findings (18) indicated that in regions exposed to high levels of depleted uranium, MMP-7 overexpression was high, but its correlation with age, grade, stage, tumor size, and lymph node involvement are similar to studies that were conducted on populations not exposed to depleted uranium. Exposure to depleted uranium may be one of the factors responsible for overexpression of MMP-7 observed in Iraqi patients of the present study (19). MMP-7 cells have been identified as putative cancer stem cells marker (CSCs) in breast cancer. However, the expression of this marker, as well as the CSCs role in the tumor microenvironment of breast cancer, remains largely unknown. In our study, we examined the expression of MMP-7 in human breast tumor tissues and assessed these clinicopathological correlations with other markers. Recent evidence has suggested that breast cancer originates from CSCs, which strongly express adhesion molecule MMP-7 (20). The cell adhesion molecule MMP-7 is the principal cell surface receptor for extracellular matrix glycosaminoglycan hyaluronan (HA), which is involved in a variety of important biological events, such as embryogenesis, hematopoiesis, lymphocyte homing and activation, inflammatory reactions, and tumor dissemination by interactions between MMP-7 (21).

## CONCLUSION

It can be concluded that overexpression of MMP-7 may be used as a tool for detection of malignant breast cancer in earlier stage.

## REFERENCES

1. Loeffler I. and Wolf GR. (2014). Transforming growth factor- $\beta$  and the progression of renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29: i37–i45.
2. Massague J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 753-791.
3. Bandyopadhyay B.; Fan J.; Guan S.; Li Y.; Chen M.; Woodley DT. and Li W. (2006). A "traffic control" role for TGF beta 3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *J. Cell. Biol.* 172 (7):1093-1105.
4. Anderson WF.; Chu KC.; Chatterjee N.; Brawley O. and Brinton LA. (2001). Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database. *J. Clin. Oncol.* 19:18-27.
5. Baeyens A.; Thierens H.; Claes K.; Poppe B.; Messiaen L.; De Ridder L. and Vral A. (2002). Chromosomal radiosensitivity in breast cancer

- patients with a known or putative genetic predisposition. *Br. J. Cancer.* 87: 1379–1385.
6. Abcam (2013). ab80436 – exposure mouse and rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit. Version: 2. UK.
7. SAS. (2004). Guide personal computer (Ver.7) inst. Inc. Cary. Nc., USA.
8. Hussain HT. (2010). Isolation of *Blastomyces dermatitidis* histopathological and immunologically in Baghdad. MSc. Thesis, College of Medicine. Al-Nahrain University, Baghdad. Iraq.
9. Swanson CA.; Coates RJ.; Malone KE.; Gammon MD.; Schoenberg JB. and Brogan DJ. (1997). Alcohol consumption and breast cancer risk among women under age 40 years. *Epidemiol.* 8:231-237.
10. Takeshita S.; Kawamura Y.; Takabayashi H.; Yoshida N. and Nonoyama S. (2005). Imbalance in the production between vascular endothelial growth factor and endostatin in Kawasaki disease. *Clin. Exp. Immunol.* 139: 575–579.
11. Yoshiji H.; Gomez DE.; Shibuya M. and Thorgeirsson UP. (1996). Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.* 56:2013-2016.
12. Al-Hajj M.; Wicha MS.; Benito-Hernandez A.; Morrison SJ. and Clarke MF. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 3983–3988.
13. Zhao J.; Yana F.; Ju H.; Tang J. and Qin J.(2004). Correlation between serum vascular endothelial growth factor and endostatin levels in patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 204:87–95.
14. Shin YJ.; Choi JS.; Choi JY.; Hou Y.; Cha JH.; Chun MH. and Lee MY. (2010). Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 mRNA in glial cells following focal cerebral ischemia in rats. *J. Neuro. Immunol.* 229: 81-90.
15. Schluter C.; Duchrow M.; Wohlenberg C.; Becker MHG.; Key GM.; Flad HD. and Gerdes J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cyclemaintaining proteins. *J. Cell. Biol.* 123:513-522.
16. Khashman BM. (2008). Molecular and virological study of HPV on Iraqi patients with OSCC. MSc. Thesis. College of Medicine, Baghdad University.
17. Iraqi Cancer Board. (2008). Results of the Iraqi Cancer Registry (2004). Baghdad, Ministry of Health.
18. Irwin ML.; Smith AW.; McTiernan A.; Ballard-Barbash R.; Cronin K.; Gilliland FD.; Baumgartner RN.; Baumgartner KB. and Bernstein L. (2008). Influence of pre- and postdiagnosis physical activity on mortality in breast cancer survivors: the health, eating, activity, and lifestyle study. *J. Clin. Oncol.* 26(24): 3958-3964.
19. Gudmundsdottir K. and Ashworth A. (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene.* 25(43): 5864-5874.
20. Yamauchi H.; Stearns V. and Hayes DF. (2001). When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 19:2334-2356.
21. Zhang D.; Salto-Tellez M.; Putti TC.; Do E. and Koay ES. (2003). Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod. Pathol.* 16:79–85.

## Significance of family education and diabetes mellitus morbidities in Diyala province, Iraq

Kareem A. Obaid (1) and Ammar A. Mohammed Al- Shammery (2)

(1) Dept. of Pediatrics / College of Medicine / University of Diyala (2) Medical Dept. / Baquobah Teaching Hospital / Republic of Iraq

E-mail: karimalhamdany@yahoo.com

### ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases with high blood sugar levels over a prolonged period. High blood sugar symptoms include frequent urination, increased thirst, and increased hunger. Untreated diabetes leads to many complications. To minimize the risk of developing complications it is important to provide appropriately child and young person sufficient care and good metabolic control is maintained. To live with diabetes it requires extensive self-care and knowledge.

The present study aimed to find out the role of family and parental educational knowledge, practice and attitude in controlling and managing diabetes mellitus morbidities in Diyala province of Iraq.

The study was an observational and done in the endocrinology clinic of Al-Batool Teaching Maternity Hospital in Diyala province of Iraq between June 2014 to February 2015. The variables included were knowledge, attitude and practice levels as well as demographic information such as age, date of diagnosis, duration of DM, family history of DM, number of affected siblings, parents level of education, school health, type of treatment, compliance of treatment and complication of treatment of DM.

A total of 100 children with type 1 diabetes mellitus (DM) were represented of male (53%) and female (47%) ,age from (1-20) years ,mean age 10.5 . All patients lived in Diyala and had type 1 DM and all on insulin injection. Diabetes duration from (1-15) years, mean diabetes duration was (8) ,diabetes duration <5 years (60 %) and >5 years (40%) . In our study having family history of diabetes about (26% , male/female 14/12) , 6 cases from mother, 6 from father ,6 from uncle and 7 from grandmother and grandfather.

A clear and well defined guidelines and materials for diabetes education and management adapted to the socio-economic context, culture and education levels of population which especially required in developing countries, formal education about the importance of family involvement in self-management behaviors could positively affect individual diabetes self-management outcomes.

**Keywords:** Diabetes mellitus (DM), self-management behaviors, family education

### الملخص باللغة العربية

يمثل داء السكري مجموعة من الأمراض الأيضية حيث ارتفاع مستويات السكر في الدم على مدى فترة طويلة. وتشمل أعراض ارتفاع السكر في الدم التبول المتكرر، وزيادة العطش، وزيادة الجوع. يؤدي مرض السكري غير المعالج إلى العديد من المضاعفات. ولتقليل مخاطر حدوث مضاعفات إلى أدنى حد، من المهم توفير الرعاية الكافية للأطفال والشباب على نحو ملائم والحفاظ على التحكم الأيضي الجيد. للعيش مع مرض السكري يتطلب الرعاية الذاتية واسعة النطاق والمعرفة.

هدفت هذه الدراسة إلى البحث عن دور الأسرة والمعرفة للأسرة وللابناء والممارسة والمواقف في السيطرة على مرض السكري في محافظة ديالى في العراق.

**تصنيف الدراسة:** الدراسة الحالية دراسة رصدية أجريت في عيادة الغدد الصماء بمستشفى البتول التعليمي لمستشفى الأمومة في محافظة ديالى في العراق بين يونيو 2014 وفبراير 2015. وشملت المتغيرات مستويات المعرفة والمواقف والممارسات وكذلك المعلومات الديموغرافية مثل عمر المريض، وتاريخ التشخيص، ومدى مدة المرض، والتاريخ العائلي وعدد الأفراد المصابين به، مستوى الآباء من التعليم والصحة المدرسية، ونوع من العلاج، والامتثال للعلاج، ومضاعفات علاج السكري.

شملت الدراسة عينة من الأطفال بلغت 100 طفل مصاب بداء السكري من النوع 1 من الذكور (53%) والإناث (47%)، والعمر من (1-20) سنة، متوسط العمر 10.5. جميع المرضى من ديالى وجميع الأطفال الذين لديهم نوع 1 دم وجميع على حقن الأنسولين. مدة مرض السكري من (1-15) سنة، ومتوسط مدة السكري كان (8)، ومدة السكري <5 سنوات (60%) و >5 سنوات (40%). في دراستنا لديها تاريخ عائلي من مرض السكري حوالي (26%) / ذكور / إناث (12/14)، 6 حالات من الأم، 6 من الأب، 6 من العم و 7 من الجدة والجدة.

وقد استنتجت الدراسة ضرورة وجود مبادئ توجيهية واضحة ومحددة جيدا لتعليم ومتابعة وعلاج مرض السكري تتكيف مع السياق الاجتماعي والاقتصادي ومستويات الثقافة والتعليم للسكان وبشكل خاص في البلدان النامية. وبذلك فإن التعليم الرسمي حول أهمية مشاركة الأسرة في سلوكيات الإدارة الذاتية يمكن أن يؤثر بشكل إيجابي في إنجاح الإدارة الذاتية للسكري.

## INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease with a group of disorders related to high blood sugar levels for long period. High blood sugar symptoms are presented as increase urination frequency with increase thirst and hunger. Untreated diabetes may lead to many complications. The acute complications include diabetic ketoacidosis and non ketotic hyperosmolar coma (1), while the serious long-term complications include cardiovascular disease, stroke, kidney failure, foot ulcers and damage to the eyes (2). Diabetes development was due to either the pancreas not producing enough insulin or the cells of the body not responding to the produced insulin properly (2). Usually three main types of diabetes mellitus were known: Type 1 DM caused by the body's failure to produce enough insulin known as "insulin-dependent diabetes mellitus" (IDDM) or "juvenile diabetes", with unknown clear cause. Type 2 DM associated with insulin resistance, where cells fail to respond to the insulin, with the disease progresses a lack of insulin may also develop, this form was known as "non insulin-dependent diabetes mellitus" (NIDDM) or "adult-onset diabetes", which is primarily caused by excessive body weight and not enough exercise. The third type called gestational diabetes, occurs when pregnant women without a previous history of diabetes develop a high blood glucose level (1,3). Prevention and treatment involves a healthy diet, physical exercise, avoiding tobacco and being a normal body weight. Controlling blood pressure and proper foot care are also important for people with DM (2,3). Type 1 diabetes must be managed with insulin and diet monitoring, while type 2 diabetes may be treated with medications with or without insulin (4). Weight loss and sometimes surgery for those with obesity are effective for those with type 2 DM (5). Gestational diabetes usually resolves after the birth of the baby (6).

Nearly about 387 million people have diabetes worldwide, with type 2 diabetes making up about 90% of the cases (7), which equal to 8.3% of the adult population (8), with rates equal in both women and men (9). Diabetes is estimated to have resulted in 1.5 to 4.9 million deaths per year as reported between 2012 to 2014, which is expected to rise to 592 million by 2035 (7).

Type 1 diabetes (T1D) occurs more frequently in children who are often pre-school age with specific support needed for optimal management of their blood glucose and insulin regime (8). To minimize the risk of long-term complications it is important that all children and young persons with T1D supplied with appropriate diabetes care started from their diagnosis, and that good metabolic control is maintained (9). In order to live with type 1 diabetes (T1DM) extensive self-care and good medical and diet knowledge required (10). Family and mainly parents of children with T1DM need to be well educated and trained to assume their great

responsibility for their child's management of the disease, medical and psychosocial factors affecting their life (11). Despite that it might increase the risk of family conflict and parental distress (12). Sometimes for autonomy, adolescents with T1DM need distance from their parents, and parents need to continue giving support (13). This requires support for parents concerning how to maintain a positive role in the relationship with their child (14). Effective approaches are needed with different steps of parent education and support regarding skills coping with DM (15). These required approaches in health care services in order to reduce parents' stress and enable them to support their child's self-care (15). During treatment with insulin one of the most common adverse reactions is hypoglycemia and there is release of adrenaline from the adrenal glands, leading to autonomic symptoms: tremors, tachycardia, facial flush, and other symptoms. Besides the autonomic symptoms, there may also be symptoms linked to the lack of glucose in the brain (neuroglycopenia): vertigo, confusion, exhaustion, weakness, headaches, inappropriate behavior, which may be confused with drunkenness, lack of attention, vision abnormalities, convulsions similar to epilepsy, and coma (16). Good metabolic control can be achieved with intensive insulin therapy in patients with type 1 diabetes, which is associated with the risk of severe hypoglycemia (17). Since hypoglycemia is a major complication in patients with type 1 diabetes (18), accounting for up to 6% to 7% of disease-related mortality a strict strategy required to predict and prevent hypoglycemia (19). Patient with diabetes mellitus (DM) live with chronic problems and difficult to be treated that requires drug therapy and blood glucose control, demanding changes in cultural and educational patterns to control them otherwise they will suffer from significant morbidity problems and increase mortality risk (20). Education programs on diabetes are essential components of overall management of diabetes. Many studies have shown the benefits of diabetes education on overall improvement in the care of diabetic patients (21,22). The aim of the present study was to find out the effectiveness of diabetes education programs on metabolic control and psychological growth for diabetes Diyala province of Iraq.

## MATERIALS AND METHODS

The present study is an observational done in the endocrinology clinic of Al-Batool Teaching Maternity Hospital in Diyala province of Iraq between June 2014 to February 2015. The variables included were knowledge, attitude and practice levels as well as demographic information such as age, date of diagnosis, duration of DM, family history of DM, number of affected siblings, parents level of educations, school health, type of treatment, compliance of treatment, and complication of treatment of DM. The questionnaire was completed

after interviewing the family of children during visits to the hospital. The subjective symptoms which were asked included numbness, muscle weakness, and history of previously diagnosed retinopathy or nephropathy. The first part of the questionnaire covered the demographic information that included age, sex, and marital status, level of education, occupation, and average family monthly income, and family history of DM, exposure to health education about DM and health information medias like televisions or radios. The second part assessed general knowledge about diabetes. What is DM about, risk factors of DM, signs and symptoms of DM, Control and management DM and complications of DM? Respondents answered either "Yes" or "No" or "Do not know". The third part assessed the attitude of the respondents towards DM; and the final part covered the community's practice to prevent DM.

#### Statistical analysis

Summary statistics were used for data questionnaire and information, and data analyses were carried out using Microsoft Excel and in addition to the descriptive analysis to test completeness, edited sorted and entered exported to statistical package of

(SPSS) for analysis. On the basis of this information, data distribution was determined.

#### RESULTS

A total of 100 children with type 1 diabetes mellitus (DM) were represented in the study, male (53%) and female (47%), aged from (1-20) years, mean age 10.5 . All patients were from Diyala and all children having type 1 DM and all on insulin injection . Diabetes duration from (1-15) years ,mean diabetes duration was (8) ,diabetes duration <5 years (60 %) and >5 years (40%) . In our study having family history of diabetes about( 26% ,male/female 14/12 ) ,6 cases from mother , 6 from father ,6 from uncle and 7 from grandmother and grandfather .Number of affected siblings in the same family are found in 10 families (7 families having 2 children and 3 families having 3 children with DM type 1 ) , 8 families presented without family history of DM and 2 families presented with family history of DM from father. During the study, it was found that there were 8 families with two DM children, and 2 families with 3 DM children per family . Table (1) summarizes general demographic information of the study sample.

Table (1): General demographic data of the study sample

	No. of cases	%	Male/female
Sex	100	100	53/47
Age of 1 <sup>st</sup> diagnosis (duration )			
<5 years	60	60	36/24
>5 years	40	40	17/23
Family history of DM	26	26	14/12
NO. of affected siblings	10	10	4/6
Neonatal admission	10	10	3/7
Type of delivery			
Vaginal	81	81	46/35
Caesarian section	19	19	7/12
Delayed mile stone	5	5	4/1

Table (2) describes the parents' level of education. For the maternal level of family education, results showed that (non-educated (19%) ,primary school (60%) ,secondary (10%), high level of education

(11%), and paternal level of education showed (non educated (14%), primary school (54%) ,secondary school (5%) and high level of education (27%).

Table (2): levels of parents' education

	Maternal education	%	Paternal education	%
Not educated	19	19	14	14
Primary	60	60	54	54
Secondary	10	10	5	5
High level	11	11	27	27
Total	100	100	100	100

With regard to medical condition, about 35% of cases with type 1 DM reported having failure to thrive (FTT) (21% male and 14% female), these patients with poor family education (30 cases of maternal education were primary and non-educated, 5 cases were secondary, 28 of cases of paternal education were primary and non-educated, 7 of cases were secondary). 9% of cases reported having renal impairments (7 cases of maternal education were primary and non-educated, 2 cases were

secondary, 6 of cases of paternal education were primary and non-educated, 3 of cases were secondary). 3% of cases had eye disease (these all cases with non-educated of maternal and paternal). 36% of cases having dental cares. The prevalence of renal impairment among participants was found to be 9 cases, and eye disease 3 cases (table 3). Table (4) describes the psychosocial problems children were had.

**Table (3): Co-morbidities of diabetes mellitus**

	No. of cases	Sex Male/female	Maternal Low level educated	Maternal Educated	Paternal Low level educated	Paternal educated
Failure to thrive	35	21/14	30	5	28	7
Renal disease	9	4/5	7	2	6	3
Eye disease	3	0/3	3	0	3	0
Dental care	36	21/15	28	8	25	11

**Table (4): Psychosocial problems**

	No. of cases	%
<6 years	17	17
>6 years total	83	83
Leaving school	30	30
Attends school	53	53
School health services	5	5
Parents dead	5	5

## DISCUSSION

The current study showed 30% of cases dropped out of school because of the presence of a large family of negligence. In most 95% schools lack the presence of School Health services which takes care for sick children. An Indian study in a rural area of Chennai reported that the higher the age, socioeconomic, and educational levels, the higher the DM knowledge of the population (23,24). There were some children (5%) have lost one of their parents, which led to neglect of the child and develop of diabetes complications. These were summarized in table (4). All these negatively reflecting patient level of care and education and increasing the risk of diabetes morbidities and mortality. In general, DM knowledge of a population has a positive association with an education degree (22). In an Indian study in Agartala with 200 mothers, only 39.5% knew that an unhealthy diet has a causative role in DM (25,26). In this study, the majority of population had primary education 89% and 11% secondary education for mothers, 73% primary education and 27% secondary education for fathers. 53% of men and 47% of women had correct answers regarding blood glycemic values and 45.4% of people known that an unhealthy diet is a risk factor for DM. Many studies have shown that girls and women performed better than boys and men

regarding knowledge on DM. (27,28). The present study also confirmed that the female gender had higher DM knowledge scores and less DM complications than males as shown in table (3). Many studies had indicated that education programs for patients with DM have produced significant benefits in glycemic control and DM comorbidities control (21,22), while in the present study there was no clear education program conducted uniformly for patient and population where the participation in a multi-factorial health education program on diabetes significantly improved glycemic and lipid levels in the short-term, particularly among participants with extremely adverse HbA1c or low-density lipoprotein levels prior to participation (29). In the present study, we have a limitation of getting a control group, which was affecting our internal validity of the study outcome suggesting a further research is needed to overcome this limitation. Despite of that, our study has provided valuable information on the significance of education on various aspects of the management and care of diabetes especially in our area where the culture and education may not always be helpful to the intervention of diabetes education.

## CONCLUSION

In conclusion, the results of this study indicated that diabetes education is positively associated with improvement in patient dietary plan, physical exercise and adherence to medication, good schooling and development. A clear and well defined guidelines and education programs for diabetes education and management need to be adapted to improve the socio-economic context, culture and education levels of population which especially required in developing countries, whom having limited resources and different financial and social conflict on the establishment of their clear education program for controlling diabetes and it is morbidities.

## REFERENCES

1. Kitabchi AE.; Umpierrez GE.; Miles JM. and Fisher JN. (2009). Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. *Diabet. Care* 32 (7):1335-1343.
2. David G. and Gardner D. (2011). Greenspan's basic and clinical endocrinology. Chapter 17. 9<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill.
3. RSSDI textbook of diabetes mellitus. (2012). 2<sup>nd</sup> ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers. P.: 235.
4. Irwin RS. and James M. (2010). Manual of intensive care medicine. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins. P.: 549.
5. Picot J.; Jones J.; Colquitt JL.; Gospodarevskaya E.; Loveman E.; Baxter L. and Clegg AJ. (2009). The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery for obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* 13 (41):1-190, 215-357.
6. Cash J. (2014). Family Practice Guidelines. 3<sup>rd</sup> ed. Springer Ltd. P.: 368.
7. Williams textbook of endocrinology. (2011). Philadelphia: Elsevier/Saunders. Pp.: 1371-1435.
8. Shi Y. and Hu FB. (2014). The global implications of diabetes and cancer. *Lancet* 383 (9933): 1947-1948.
9. Vos T.; Flaxman AD.; Naghavi M.; Lozano R.; Michaud C.; Ezzati M.; Shibuya K.; Salomon JA.; Abdalla S.; Aboyans V. *et al.* (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet* 380 (9859): 2163-2166.
10. Diamond Project Group. (2006). Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet. Med.* 23:587-566.
11. Diabetes Control and Complications. (1993). Trial research group: the effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329:977-982.
12. Brink SJ.; Miller M. and Moltz KC. (2002). Education and multidisciplinary team care concepts for pediatric and adolescent diabetes mellitus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 15: 1113-1130.
13. Wikblad KF. (1991). Patient perspectives of diabetes care and education. *J. Adv. Nurs.* 16: 837-844.
14. Anderson BJ.; Vangsness L.; Connell A.; Butler D.; Goebel-Fabbri A. *et al.* (2002). Family conflict, adherence, and glycaemic control in youth with short duration Type 1 diabetes. *Diabet. Med.* 19: 635-642.
15. Karlsson A.; Arman M. and Wikblad K. (2008). Teenagers with type 1 diabetes—a phenomenological study of the transition towards autonomy in self-management. *Int. J. Nurs. Stud.* 45: 562-570.
16. Jaser SS. (2011). Family interaction in pediatric diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 11: 480-485.
17. Grey M.; Jaser SS.; Whittemore R.; Jeon S. and Lindemann E. (2011). Coping skills training for parents of children with type 1 diabetes: 12-month outcomes. *Nurs. Res.* 60: 173-181.
18. Frier BM. (2004). Morbidity of hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabet. Res. Clin. Pract.* 65:S47-S52.
19. Bulsara MK.; Holman CD.; Davis EA. and Jones TW. (2004). The impact of a decade of changing treatment on rates of severe hypoglycemia in a population-based cohort of children with type 1 diabetes. *Diabet. Care.* 27: 2293-2298.
20. Nathan DM.; Zinman B.; Cleary PA.; Backlund JY.; Genuth S. *et al.* (2009). Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). *Arch. Intern. Med.* 169: 1307-1316.
21. Balamurugan A.; Ohsfeldt R.; Hughes T. and Phillips M. (2006). Diabetes self-management education program for Medicaid recipients: A continuous quality improvement process. *Diabet. Edu.* 32:893-900.
22. Koproski J.; Pretto Z. and Poretsky L. (1997). Effects of an intervention by a diabetes team in hospitalized patients with diabetes. *Diabet. Care.* 20:1553-1555.
23. Jacobson AM.; Musen G.; Ryan CM.; Silvers N.; Cleary P. *et al.* (2007). Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N. Engl. J. Med.* 356: 1842-1852.
24. Isla PP.; Moncho VJ.; Torras RA.; Oppenheimer SF.; Fernández C.; Pérez L. and Ricart BMJ. (2009). Quality of life in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Clin. Transplant.* 23:600-605.
25. Kim S.; Love F. and Quistberg DA. (2004). Association of health literacy with self-management behavior in patients with diabetes. *Diabet. Care.* 27(12):2980-2982.

26. Majumder N.; Majumder N. and Datta SS. (2013). Knowledge and perception of mothers of under five children regarding etiology of type-II diabetes mellitus in Agartala, Tripura. *Health Agenda*. 1(3):64-70.
27. Borges TT.; Rombaldi AJ. and Knuth AG. (2009). Knowledge on risk factors for chronic diseases: a population-based study. *Cad. Saude. Publica*. 25(7):1511-1520.
28. Diabetes Control and Complications. (2000). Trial/ epidemiology of diabetes interventions and complications research group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N. Engl. J. Med*. 342 :381-389.
29. Brown JB.; Nichols GA. and Glauber HS. (2000). Case-control study of 10 years of comprehensive diabetes care. *West J. Med*. 172:85-90.

## Identification of ephemerovirus species in clinically infected cattle in Basra, Southern Iraq

Hazim T. Al-Thwainy, Firas T. Mansour and Tamadhir A.K. Al-Hamed

College of Veterinary Medicine / University of Basra / Republic of Iraq

E-mail: hazimthwainy@gmail.com

### ABSTRACT

Although clinical cases of bovine ephemeral fever are usually attributed to Bovine ephemeral fever virus (BEFV), at least two other related viruses, kotonkon virus (KOTV; an ephemerovirus) and Fukuoka virus (FUKAV; an unassigned rhabdovirus), can cause similar clinical signs. This is the first study in Basra, southern Iraq that aimed to identify ephemerovirus species in cattle. The study was conducted on 96 cases of cattle (36 male and 60 female) suspected to be infected with BEF based on the characteristic clinical signs. Blood samples were collected from the cattle and processed for RT-PCR to amplify the polymerase (L) gene of BEFV, KOTV, and FUKAV by using a set of universal primer. Sixty eight samples (25 male and 43 female) were positive by RT-PCR. Animals with severe signs such as depression, recumbence, and fever showed the highest percentages of positive PCR results. Sequencing results showed identical sequences between all samples, and blast analysis revealed that BEFV has been the only virus species in Basra province, southern Iraq.

**Keywords:** bovine ephemeral fever, Bovine ephemeral fever virus (BEFV), kotonkon virus (KOTV), Fukuoka virus (FUKAV), RT-PCR .

### الملخص باللغة العربية

بالرغم من أن المسبب المرضي للحالات السريرية للحمى الثلاثية في الأبقار يعزى عادة لفيروس الحمى الثلاثية BEFV، هناك على الأقل فيروسين آخرين KOTV و FUKAV يسببان نفس اعراض المرض. تعتبر هذه الدراسة هي الأولى في مدينة البصرة، جنوبي العراق والتي تهدف إلى تشخيص نوع الفيروس المسبب لهذا المرض في الأبقار. أجريت هذه الدراسة على 96 حالة مرضية في الأبقار (36 ذكور و 60 إناث) متوقع أنها مصابة بمرض الحمى الثلاثية اعتماداً على الأعراض المرضية الظاهرة على الحيوان. تم جمع عينات دم من الحيوانات المصابة لغرض مضاعفة الجين L باستخدام برايمرات متخصصة لثلاثة أنواع من الفيروسات BEFV, KOTV, و FUKAV بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR). أظهرت النتائج أن ثمانية وستين عينة (25 ذكور و 43 إناث) معظمها أخذت من حيوانات ذات علامات مرضية خاصة بالحمى الثلاثية كانت موجبة لاختبار PCR. بالإضافة إلى ذلك، كانت نتائج تسلسل القواعد النروجينية متطابقة بين جميع العينات وجميعها متطابقة مع النوع BEFV والمتوفرة في بنك الجينات. هذه النتائج تؤكد أن هذا النوع من الفيروسات هو المسبب المرضي للحمى الثلاثية في الأبقار في مدينة البصرة، جنوبي العراق.

## INTRODUCTION

Bovine ephemeral fever (BEF), commonly known as Three Day Sickness is a non-contagious arthropod borne viral disease of cattle and water buffalos spanning tropical and subtropical zones of Asia, Australia, and Africa (1,2). The disease is considered to cause major economic losses due to reduced milk production at dairy herds and loss of conditioning of beef cattle and disruption of markets. It is usually characterized by the sudden onset of fever, stiffness, shivering, twitching, lameness, nasal and ocular discharges, depression, reducing water and food intake, cessation of rumination, constipation, and recumbence (3).

The disease is caused by bovine ephemeral fever virus (BEFV), which is classified as the type species of the genus *Ephemerovirus* in the family *Rhabdoviridae*. BEFV displays bullet-shaped morphology with a helical nucleocapsids comprise the negative-sense, single-stranded RNA genome of about 14.9 kilo base. The virion also contains five structural protein genes (N, P, M, G and L) (4).

The virus has been isolated from both biting midges (*Culicoides* spp.) and mosquitoes, and from the clinically infected cow and buffalos (5). Although clinical cases of bovine ephemeral fever are usually attributed to BEFV, definitive diagnosis is rarely performed and at least two other related viruses, kotonkon virus (KOTV; an ephemerovirus) and Fukuoka virus (FUKAV; an unassigned rhabdovirus), can cause similar clinical signs (6).

In our region (south of Iraq), there is lack of studies about determination of virus species that causes clinical signs related to Three Day Sickness. Therefore, it is essential to perform a valuable molecular technique to determine the type of ephemerovirus species, which will help to choose the correct treatment and vaccine for controlling the disease.

A previous study described a simple RT-PCR capable of detecting all known ephemerovirus species and FUKAV by using a set of universal primers that target to a highly conserved region in the polymerase L gene (7).

The present work aimed to identify the ephemerovirus species in Basra city, southern Iraq by using the same published universal primers for RT-PCR and then sequencing and aligning the amplicons with the available sequences in Genbank.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection

Ninety six clinical specimens of whole blood containing EDTA as anticoagulant were collected from cattle of both sex located in different provinces of Basra, southern Iraq, between February 2015 and March 2016. The infected animals were showing different clinical signs related to Three Day Sickness fever. The signs included fever

(temperature between 39°C to 42°C), loss of appetite, shivering and lameness, decrease in milk production, depression and recumbence, and discharges from the eyes and nostrils.

### Viral RNA extraction and quantification

Extraction of viral RNA from the blood samples of infected cattle was performed using a QIAamp viral RNA purification kit (Qiagen company, Germany) following the manufacturer's instructions. The concentration of purified RNA was determined using NanoDrop spectrophotometer by UV absorption. Eluted viral RNA samples were stored at -20°C until further use.

### Polymerase chain reaction

A forward primer 5-GGAYTDACAATGGCNGATGA-3 and a reverse primer 5-CTTTGATARTTATTCCA-3 designed from highly conserved sequence of several species of ephemerovirus (7) were used to amplify about 137 bp from viral RNA by using One-Step AccuPower RocketScript RT-PCR PreMix Kit (Bioneer, Korea). Both cDNA synthesis and PCR amplification were performed in a single tube using this system. Starting material of viral RNA used in cDNA synthesis was 100 ng/μl. PCR conditions were: cDNA synthesis at 55°C for 30 min, initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 35 cycles of: denaturation at 95°C for 15 seconds, annealing at 57°C for 30 seconds, extension at 68°C for 30 seconds. The reaction was then held at 68°C for 5 min, and then cooled to 4°C for 5 min. The PCR product was detected on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The size of the band was estimated by comparison with a standard 100 bp DNA ladder.

### Sequencing and sequence analysis

PCR products were purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions, and they were then sequenced. The sequences were analyzed by using Geneious Inspirational Software for Biologists (8).

## RESULTS

### Detection of ephemerovirus from clinically infected cattles:

Out of 96 samples, 68 (71%) exhibited positive results by using one step RT-PCR. In addition, the virus frequency was higher in female (43 positive samples, 72%) than male (25 positive samples, 69 %). Moreover, the vast majority of the positive results were observed from animals with signs of recumbence, depression, and fever, respectively.

Animals with other clinical signs including lameness, muscle stiffness, shivering, twitching, droopy ears, reduced water and food intake showed less positive results. The lowest positive results

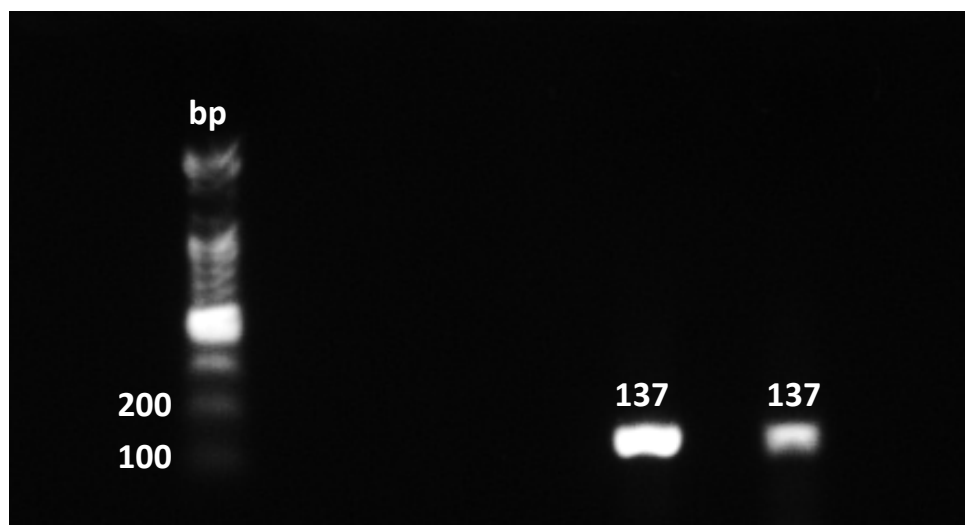
were obtained from animals with signs of drooling saliva, runny nose, and watery eyes (table 1).

**Table (1): Proportions of positive RT-PCR results according to clinical signs of suspected Three Day Sickness cases. The highest percentage of the positive results was detected from samples taken from animals with signs of recumbence and depression, while the lowest percentage was detected from animals with signs of drooling saliva, runny nose, and watery eyes**

Signs	No. of cases	Positive n (%)
Depression	78	68 (87)
Recumbence	70	68 (97)
Reduced water and food intake	90	61 (68)
Lameness, muscle stiffness, shivering, twitching, droopy ears	51	36 (70)
Drooling saliva, watery eyes, runny nose	88	44 (50)
Fever	76	60 (79)

The positive RT-PCR results showed single and clear bands of 137 bp following the load of 10 µl of the product on agarose gel. The size of the band was

determined by comparison with 100 bp DNA ladder (figure 1).

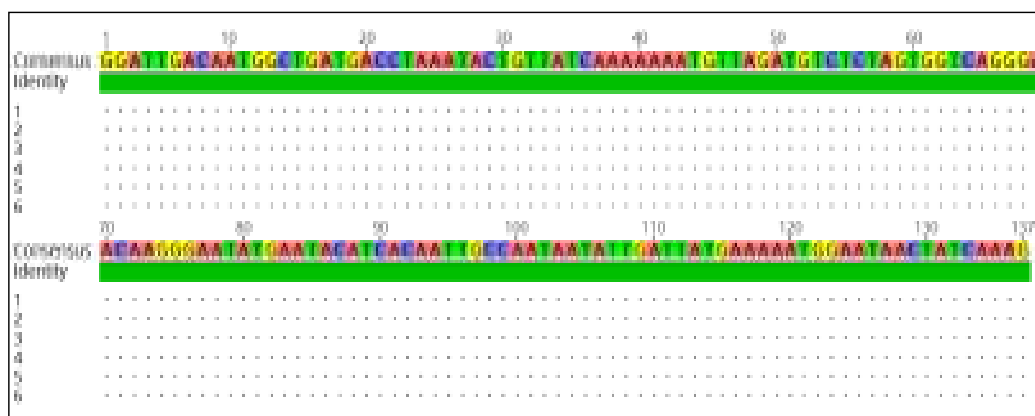


**Figure (1): PCR product of partial polymerase (L) gene of ephemerovirus separated on 1% agarose gel pre-stained with ethidium bromide. The results showed the amplification of 137 bp from clinical specimens collected from cattle with expected Three Day Sickness cases**

#### Sequence analysis:

DNA sequences were aligned and compared with each other by using Geneious software. The results of alignments showed identical sequences between

all samples. The sequences were also blasted with the available sequences in GenBank to determine virus species. The blasting results confirmed that all sequences were belonged to bovine ephemeral fever virus (BEFV) (Figure 2).



**Figure (2): Partial ephemerovirus polymerase L gene sequence alignment. The figure shows identical sequences between selected six amplicons. All sequences were comparable to BEFV sequences in GenBank**

## DISCUSSION

The current study identified ephemerovirus species in cattle in Basra province, southern Iraq. According to the RT-PCR results and sequencing analysis, BEFV species is the only agent that causes bovine ephemeral fever-like disease in our region. In addition, samples taken from animals with signs of recumbence, depression, and fever gave the highest proportion of the positive results. Although all tested samples were collected from clinical cases with signs related to BEF, some samples, however, did not show positive results on agarose gel. Most respiratory diseases can have similar signs (in particular signs of drooling saliva, watery eyes and runny nose) to BEF. Accordingly, some clinical samples used in this study might be collected from animals infected with a respiratory disease rather than BEF, and therefore they showed negative results.

Although the serological diagnostic methods are commonly used to confirm the infection with the virus, the use of universal primers in PCR to diagnose the local ephemerovirus species seems to be the most accurate tool to determine virus species. However, identification of virus identity using PCR method should be followed by sequencing of the amplicon.

The use of serological methods (through the detection of antibodies) to diagnose the clinical cases of BEF seems to have drawbacks. During infection, the antibody titer often takes several days to develop and to be significantly detectable. Moreover, serological cross-reactions have been shown to occur when the serological test is delayed, and also in animals previously exposed to other closely related viruses (9). In contrast, the previously described RT-PCR method requires a single acute-stage blood sample and usually allows identification of the virus species responsible within short time (between 3–5 days) (7). The PCR and sequencing techniques could potentially be used on

samples taken from clinically infected animals to establish the influence of each virus species to the infection burden in an area and identification of virus species responsible for disease could help to establish whether BEFV vaccination is appropriate for use in the affected area (7). In this regard, the results of the present study will have an important contribution of choosing the correct vaccine to stop disease occurrence.

Bovine ephemerovirus fever was described in 1924 in Egypt (10) and in the Jordan valley in Palestine 1931 (11). The disease has also been reported in the other Middle East countries, including Iraq, since 1970s (12,13). An epidemiological investigation showed that BEF is existed in Arabian Peninsula, particularly Saudi Arabia, as outbreaks happen between certain points of time (14). Therefore, it is likely to export the disease to the surrounding countries, including Iraq, through animal trading and animal grazing. This possibility is with an agreement with a study that was conducted in the area of the Middle East and suggested that both winds and animal transport may have an important role in trans-boundary transmission of BEFV (15). Accordingly, there is no doubt that the causative agent is continuously existed in our region and might cause sudden outbreak at any time. Therefore, it is surely essential to determine the virus species by using a sensitive tool (sequencing) rather than using the traditional serological methods that might give cross-reactions between species.

Although the prevalence of bovine ephemeral fever was determined in the countries that border Iraq including Saudi Arabia, Turkey and Iran (14-16), determination of virus agent (species) should not be overlooked. It is highly recommended to identify the circulating ephemerovirus species in the other parts of Iraq, notably the middle and the north regions, and all countries of the Middle East. This kind of approach will play a role in decreasing the burden of disease outbreak via using the correct

vaccine to control the disease, and hence warrants further study.

## REFERENCES

1. van der Westhuizen B.(1967). Studies on bovine ephemeral fever. I. Isolation and preliminary characterization of a virus from natural and experimentally produced cases of bovine ephemeral fever. Onderstepoort. J. Vet. Res. 34(1): 29-40.
2. Walker PJ. (2005). Bovine ephemeral fever in Australia and the world. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 292: 57-80.
3. Fun-In Wang A.; Hsu M. and Huang KJ. (2001). Bovine ephemeral fever in Taiwan. J. Vet. Diagn. Invest. 13(6):462-467.
4. Walker PJ. et. al. (1991). Proteins of bovine ephemeral fever virus. J. Gen. Virol. 72 ( P 1): 67-74.
5. Kirkland PD. (2002). Akabane and bovine ephemeral fever virus infections. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 18(3): 501-14, viii-ix.
6. Tomori O.; Fagbami A. and Kemp G. (1974). Kotonkan virus: experiment infection of white Fulani calves. Bull. Epizoot. Dis. Afr. 22(3): 195-200.
7. Blasdel KR. et. al. (2013). A reverse-transcription PCR method for detecting all known ephemeroviruses in clinical samples. J. Virol. Method. 191(2): 128-135.
8. Al-Mubarak F. et. al. (2015). Identification of morphological differences between avian influenza A viruses grown in chicken and duck cells. Virus Res. 199:9-19.
9. Cybinski DH. (1987). Homologous and heterologous antibody reactions in sera from cattle naturally infected with bovine ephemeral fever group viruses. Vet. Microbiol. 13(1):1-9.
10. Sen SK. (1931). Three-day sickness of cattle. Indian. J. Vet. Sci. 1(1):14-23.
11. Rosen SG.(1931). Ephemeral feverof cattle in Palestine. Vet. J. 87:244-246.
12. Burgess GW. (1971). Bovine ephemeral fever: a review. Vet. Bull. 41(11): 887-895.
13. Abu Elzein EM. et. al. (1997). Bovine ephemeral fever in Saudi Arabia. Vet. Record. 140(24): 630-631.
14. bu Elzein EM. et al. (1999). Observations on the recent epizootic of bovine ephemeral fever in Saudi Arabia. Rev. Sci. Tech. 18(3): 672-680.
15. Aziz-Boaron O. et al. (2012). Circulation of bovine ephemeral fever in the Middle East--strong evidence for transmission by winds and animal transport. Vet. Microbiol. 158(3-4): 300-307.
16. Bakhshesh M. and Abdollahi D. (2015). Bovine Ephemeral Fever in Iran: Diagnosis, Isolation and Molecular Characterization. J. Arthropod. Borne. Dis. 9(2): 195-203.

## قسم الدراسات والبحوث العربية

## ***ARABIC STUDIES AND RESEARCHES SECTION***

## دور المقاومة الاحيائية في حساسية نباتات صنف الشليك قيصر Kaiser's المصابة بالفطر *Fusarium oxysporum*

هديل أحمد العامري

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: hadeelahmed.mu@gmail.com

الملخص باللغة العربية

تظهر الأعراض المرضية على المجموع الخضري لنباتات صنف الشليك قصير المعاملة بالفطر *F. oxysporum* بهيئة شحوب واصفرار يبدأ من حافة الورقة ويتبعه لفحة حواف الأوراق، ينتشر بعدها ليشمّل كامل الورقة، فتموت الأوراق بعدها في الإصابات الشديدة. وقد يظهر عليها أعراض التحرز، فتظهر عروق الأوراق بلون غامق مقارنة مع باقي أجزاء الورقة التي تعاني من الاصفرار، ونتيجة إصابة الأوراق انخفضت كفاءتها في البناء الضوئي والسيطرة على آلية فتح وغلق الثغور، مما أدى إلى انحنائها إلى الأعلى. ويمكن أن تصاب جميع الأوراق مسببة موت النبات بالكامل نتيجة تدمير المجموع الخضري، أو قد تصاب بعض الأوراق دون الأخرى فتسبب انخفاضاً في الكثافة الخضريّة للنبات نتيجة انخفاض عدد الأوراق والوريقات. تنتج الأعراض المرضية الظاهرة على المجموع الخضري من إصابة المجموع الجذري بفطر التعفن *F. oxysporum*، وقد تمثلت أعراض التعفن على الجذور باسوداد المنطقة الجذرية بالكامل والذي سبب موت النبات في المراحل المتأخرة من الإصابة، وقد بين المقطع الطولي للنبات تلونه باللون البني الداكن نتيجة الإصابة.

وقد أشارت نتائج هذه الدراسة إلى تحسن النمو الخضري في المعاملة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه المقاومات الحيوية الثلاثة: الفطري والبكتيري والمقاوم الحيوي Azadirachtin مقارنة مع المعاملة بالفطر لوحده، وكذلك المعاملة بتربة معقمة بالفورمالين والمعاملة بتربة غير معقمة. كما بينت نتائج حساسية صنف الشليك قيصر أن إضافة المقاومات الحيوية الثلاثة الفطري والبكتيري والمقاوم الحيوي Azadirachtin إلى الفطر *F. oxysporum* أعطت انخفاضاً معنوياً في شدة ظهور المرض بالمقارنة مع الفطر لوحده، وكان أفضلها إضافة المقاوم الحيوي الفطري *Trichoerma* إلى الفطر *F. oxysporum*، إذ بلغت النسبة المئوية لشدة ظهور المرض 41.98% في القراءة الأولى، وازداد الانخفاض في شدة ظهور المرض في القراءة الثانية حيث بلغ 36.56% بالمقارنة مع المعاملة بالفطر *F. oxysporum* وحده، وبلغت شدة ظهور المرض 78.32% في القراءة الأولى وزادت هذه النسبة في القراءة الثانية، إذ بلغت 87.15%. وكذلك بالمقارنة مع المعاملة بتربة غير معقمة، إذ بلغت شدة ظهور المرض 75.72% في القراءة الأولى و 82.15% في القراءة الثانية.

الكلمات المفتاحية: فطر التعفن *Fusarium oxysporum*، المجموع الخضري، نبات الشليك.

## The role of bio-resistance in sensitivity of strawberry Kaiser's samling plants infected by fungi *Fusarium oxysporum*

Hadeel A. Al-Ameri

Dept. of Biology / College of Sciences / University of Mosul / Republic of Iraq

### ABSTRACT

Symptoms of the disease in the vegetative Parts of the plants of strawberry Kaiser's samling treated with fungus *F. oxysporum* included pale and yellowing starts from the edge of the leaf followed by the blight of the edges of the leaves spread to cover the whole leaf, then leaves was die, in severe cases and may appear symptoms of strengthening as the veins appeared in dark colors compared with the other parts of the leaf that suffer from yellowing, and the result of infection of leaves decreased efficiency in photosynthesis and control of the mechanism of opening and closing the gaps, which led to curvature to the top, and can be infected all leaves causing the death of the plant as a result of the destruction of the vegetative Part, or may suffer some of leaves cause a decrease in the number of leaves and leaflets. The pathological symptoms of the vegetative parts are the result of the root infection *F. oxysporum*. The symptoms of rotting on the roots, was indicated by blacking of all of roots area which caused the death of the plant in the end and longitudinal section of the crown showed a dark brown color as a result of infection.

The results showed improved vegetative growth in the treatment with *F. oxysporum* in addition to the three biological agents fungal, bacterial and Azadirachtin compared with the treatment of fungi alone, as well as treatment with sterile soil with formalin and treatment of untreated soil. Adding of the three biological agents fungal, bacterial and Azadirachtin to *F. oxysporum* gave a significant reduction in pathogenicity as compared with the fungus alone, the best was the addition of the biological agents *Trichoerma viride* to *F. oxysporum* fungi, where the percentage of the pathogenicity was 41.98% In the first reading, the decrease in the pathogenicity in the second reading was 36.56% compared with the treatment of fungi *F. oxysporum* alone and pathogenicity was 78.32% in the first reading increased the ratio in the second reading 87.15%, as well as the treatment of untreated soil which was 75.72% in the first reading and 82.15% in the second reading.

## المقدمة

المقتر المعقم لغرض إعطاء نمو متجانس للفطر على البذور، فضلاً عن عدم تكتلها (7).

## مصدر المقاومات الحيوية

تم الحصول على المقاوم الحيوي البكتيري *Bacillus subtilis* من مشروع مكافحة المتكاملة والتسميد العضوي التابع لوزارة الزراعة، العراق. وجرى تنشيطها على الوسط الغذائي الصلب (NA) في 28 م لمدة 24 ساعة، وحفظت في أنابيب اختبار تحتوي على (NA) مائل في الثلاجة بدرجة حرارة 5 م لغرض استخدامها في التجارب اللاحقة. أما المقاوم الحيوي الفطري *Trichoerma viride* فتم الحصول عليه من قسم وقاية النبات، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق، مزرعاً على وسط غذائي PDA. في حين كان المقاوم الحيوي *Azadirachtin* إنتاج مخبرات د. راج في الهند بشكل معلق تركيزه 5%.

## حساسية صنف الشليك قيصر للفطر *F. oxysporum*

تم إجراء العدوى الصناعية بالفطر *F. oxysporum* لاختبار حساسية صنف الشليك قيصر (تم الحصول على شتلات الصنف من نباتات الأمهات المزروعة في البيت البلاستيكي في مشروع البطاطس والطماطم التابع لوزارة الزراعة في الموصل) تجاهها في البيت البلاستيكي غير المدفأ، وذلك بخلط التربة بالتموس وبمعدل 1 : 4 (بتموس: تربة مزيجية غرينية) ثم تغقيها بالفورمالين، وتم تغقيتها لمدة خمسة أيام، بعدها جرى تغليظها كل يوم لمدة عشرين يوماً لتخلص من بقايا الفورمالين والنواتج المتحللة من عملية التعقيم. تم تلويث التربة بالفطر *F. oxysporum* وفقاً لطريقة Dewan (7)، وتركزت لمدة ثلاثة أيام. بعدها زرعت شتلات الشليك. أما لمعاملة المقارنة، فقد تم زراعة الشتلات في تربة غير ملوثة بالفطر. جرى تنفيذ هذه التجربة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة بثلاثة مكررات لكل معاملة، كل مكرر 5 سنادين قطر 22 سم وارتفاع 25 سم، واحتوى السندان الواحد على 5 كغم تربة مزيجية غرينية معقمة بالفورمالين بنسبة 1%، وسقيت السنادين حسب الحاجة وتكونت التجربة من المعاملات التالية:

- 1- تربة ملوثة بالفطر *F. oxysporum* لوحده.
- 2- تربة ملوثة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه المقاوم الحيوي الفطري *Trichoerma viride*.
- 3- تربة ملوثة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه المقاوم الحيوي البكتيري *Bacillus subtilis*.
- 4- تربة ملوثة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه المقاوم الحيوي *Azadirachtin*.
- 5- تربة ملوثة بالمقاوم الحيوي الفطري *T. viride* لوحده.
- 6- تربة ملوثة بالمقاوم الحيوي البكتيري *B. subtilis* لوحده.
- 7- تربة ملوثة بالمقاوم الحيوي *Azadirachtin* لوحده.
- 8- تربة معقمة بالفورمالين فقط.
- 9- تربة غير معقمة (المقارنة).

تم تلويث التربة بالمقاومين الحيويين الفطري والبكتيري بتقطيع النموات الفطرية المزروعة على وسط PDA والمحصنة بدرجة 28 م لمدة أسبوع، والبكتيرية المزروعة على وسط NA والمحصنة بدرجة 28 م لمدة 48 ساعة إلى قطع صغيرة تصل إلى 1 سم تقريباً، وخلطها بالطبقة السطحية للتربة السنادين. أما المقاوم الحيوي *Azadirachtin* فتم إضافته للتربة بتركيز 5 مل/لتر بواقع 25 مل على دفعات كل 15 يوماً لحدوث انتهاء التجربة. تم اعتماد الأعراض المرضية لحساب نسبة ظهور المرض وشدة الإصابة في موعدين هما 10 فبراير / شباط 2014 و 10 مارس / آذار 2014. والجدول رقم (1) يعرض دليل شدة الإصابة بالفطر *F. oxysporum*.

ينتمي الفطر *Fusarium oxysporum* إلى العائلة Nectriaceae التابعة للفطريات الكيسية. يكون الفطر ثلاثة أنواع من الأبواغ *Microconidia* وهي إهليلجية إلى بيضاوية الشكل ذات خلية واحدة أو خليتين. أما الأبواغ *Macroconidia* فتكون مقسمة إلى 3-5 حواجز منجلية الشكل، وغالباً ما تمتلك خلية قاعدية قديمة *Foot cell* وخلية قمية *Apical cell*، وتتكون هذه الأبواغ على مجموعة حوامل مجتمعة قصيرة بثرية الشكل *Sporodochium*، أما الأبواغ *Chlamydospores* فتتشأ على الغزل الفطري، وتظهر إما منفردة الخلايا أو في سلاسل قصيرة طرفية أو بينية (1).

يعد الفطر *F. oxysporum* من الفطريات الاختيارية الترمم *Facultative Saprophyte*، ويميل إلى التطفل على النسيج الحي أكثر من ميله إلى المعيشة الرمية. والأبواغ *Chlamydospores* هي الطور الباقي المشئي في التربة فقط، ليكون الأساس في تكرار الإصابة من موسم إلى آخر بعد تحررها من النباتات المصابة أو مخلفاتها المتروكة في الحقل. والفطر منقول بواسطة التربة *Soil borne* وينتقل إلى المسافات البعيدة بواسطة الشتلات المصابة (2). يهاجم الفطر عوائله من خلال اختراقه لقمة الجذر أو من خلال الجروح في الجذر أو من خلال موقع تكوين الأفرع الجانبية (3)، حيث تصل إلى أوعية الخشب وتتكاثر فيها، وتتراكم المستعمرات الفطرية داخل الأوعية إضافة إلى إنتاجها أعداداً هائلة من التراكيب الكونيدية التي تتراكم وتسبب في انسداد الأوعية، فضلاً عن أن للفطر كفاءة عالية في إنتاج العديد من المركبات الكيميائية التي تسهم في إحداث الإصابة بالمرض، منها الإنزيمية كالإنزيمات المحللة لمكونات الجدار الخلوي مثل *Pectinase* المحللة للمواد البكتينية.

*Cellulase* المحللة للمواد السليلوزية. كذلك يقوم الفطر بإنتاج العديد من السموم التي تتباين أنواعها بحسب الأنواع الفطرية مثل سم *Fusaric acid* و *Lycomarasmine* التي ينتجها فطر ، *Fusarium oxysporum* وتسبب هذه السموم تثبيطاً لعملية تكوين التايلازات في أوعية الخشب، فضلاً عن إحداث خلل في العمليات الحيوية التي يقوم بها النبات، كالتركيب الضوئي، والنتج، والتبادل الأيوني، وبذلك يتسبب في تقليل عملية التنفس نتيجة لاتحاده مع عنصر الحديد وتداخله مع إنزيمات الأوكسيداز، كما يتسبب في الإضرار بالغشاء البلازمي، مما يؤدي إلى حدوث اختلال وظيفي في نفاذية الأغشية الخلوية.

يعيش الفطر المسبب للمرض في التربة، وتساعد زيادة رطوبة التربة وارتفاع درجات الحرارة على انتشار الفطر، لذلك تشدّد الإصابة في المناطق الأكثر دفئاً وبخاصة في المناطق الجافة، كما تشدّد الإصابة في الترب الحامضية (2).

يعتبر الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* المسبب الرئيسي للذبول الفيوزاريومي في الشليك، وهو مرض خطير مرتبط بالتربة، ويسبب خسائر كبيرة في إنتاجية الشليك التجارية. والسيطرة الكيميائية لهذا المرض غير مجدية بعد بسبب التنوع الوراثي للمسبب المرضي (4).

يعتبر انخفاض النمو أو موت نباتات الشليك تحدياً خطيراً لإنتاجه في العالم، على الرغم من أن أمراض التاج والجذر من أهم العوامل المحددة خاصة في موسم الإنتاج، إن مسببات الأمراض المرتبطة مع التاج والجذور من الشليك هي فطريات *Fusarium oxysporum* و *Cylindrocarpum destructans* عزلت من لتيجان الجذور (5، 6).

## المواد وطرق العمل

### تحضير لقاح الفطر الممرض

تم تحضير لقاح الفطر *F. oxysporum* باستخدام بذور الدخن المحلي *Panicum miliacum* L. المغسولة جيداً لإزالة التربة العالقة بها، ثم رطبت لمدة 6 ساعات، ثم جففت بواسطة ورق الترشيح ووضعت بمعدل 100 غم في دورق زجاجي نظيف سعة 250 مل. رطبت بالماء المقطر المعقم ثم عقمت بجهاز الأوتوكليف *Autoclave*. تم تلقيح كل دورق بواسطة قرص بقطر 5 ملم أخذ من حافة مستعمرة نامية بعمر أسبوع على وسط PDA. حضنت الأوراق المحتوية لقاح الفطر في الحاضنة بدرجة حرارة 28 م ولمدة 10 أيام، مع مراعاة رج الدوايق كل يومين وإضافة الماء

جدول رقم (1): الدليل المرضي لحساب شدة الإصابة للفطر *F. oxysporum*

الأعراض	دليل الإصابة
نبات سليم دون ظهور أعراض مرضية عليه	0
شحوب أوراق النبات	1
وضوح العروق على أوراق النبات نتيجة الإصابة	2
اصفرار أوراق النبات	3
انحناء الأوراق إلى الأعلى	4
لفحة حواف الأوراق	5
لفحة الأوراق بالكامل	6
موت الأوراق والوريقات	7
موت النبات بالكامل	8

تم استخراج النسبة المئوية لشدة ظهور المرض بطريقة النسبة والتناسب وكالاتي:

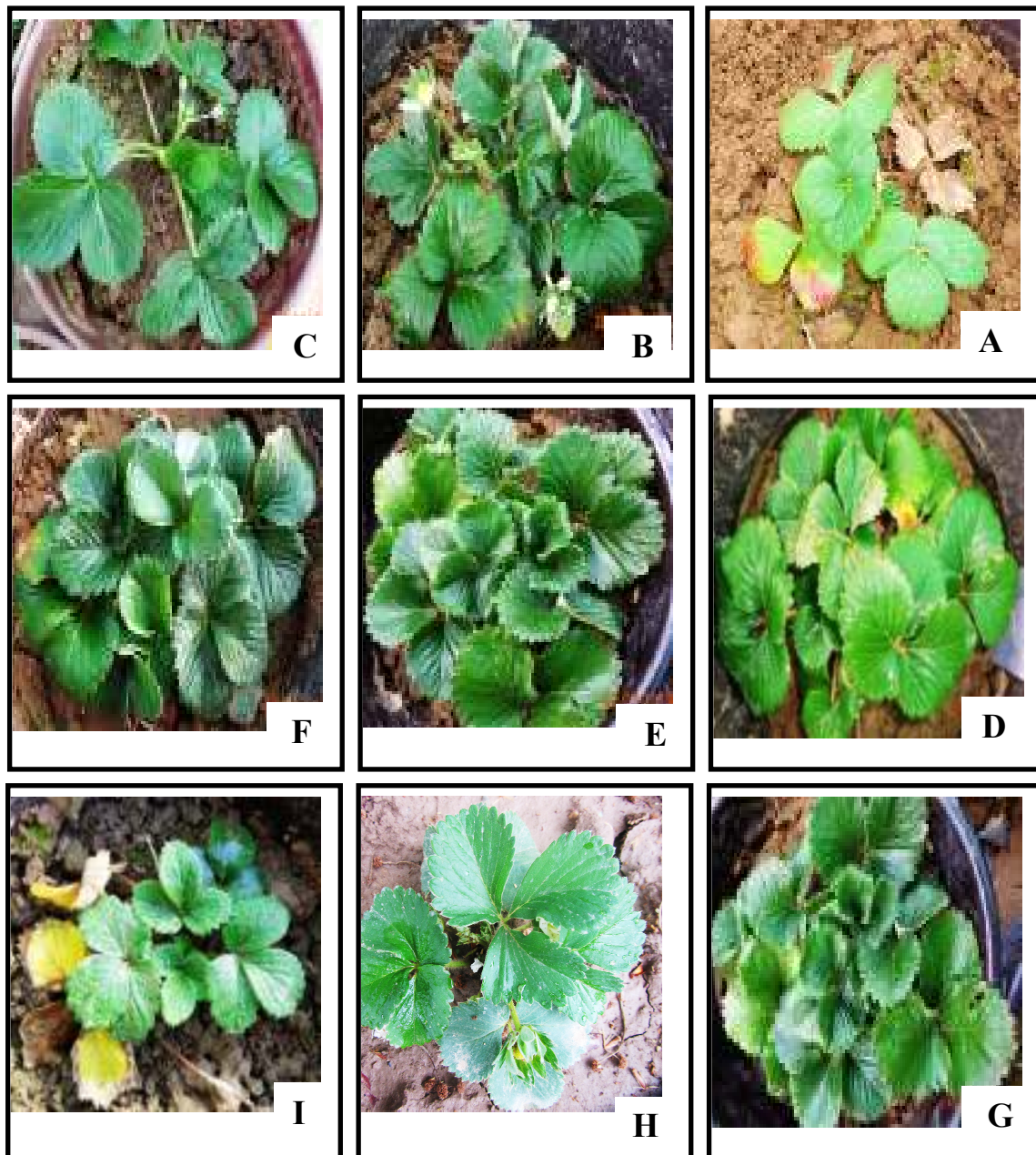
$$\% \text{ لشدة ظهور المرض} = \frac{\text{مجموع (عدد النباتات من كل درجة X دليلها المرضي)}}{\text{عدد النباتات الكلية X أعلى دليل مرضي}} \times 100$$

#### النتائج والمناقشة

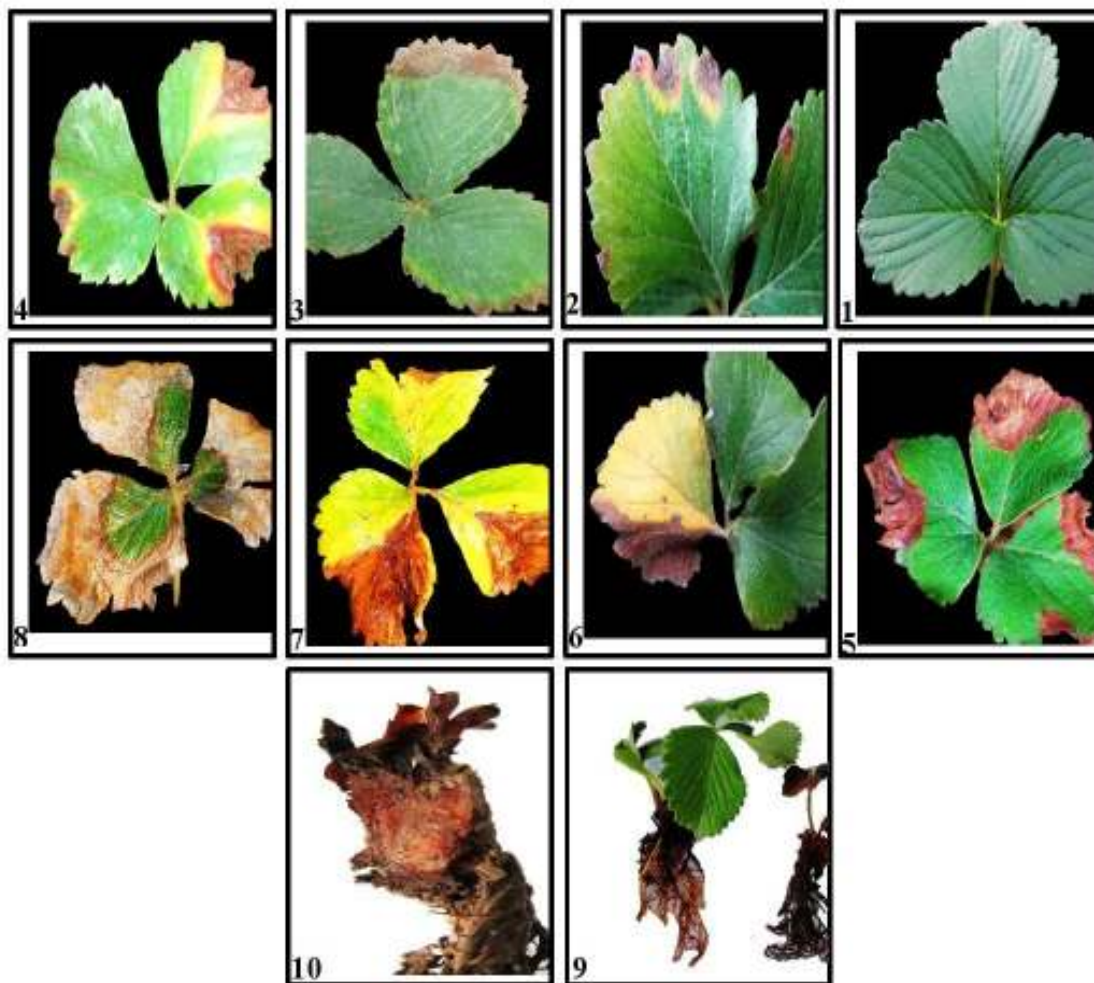
##### حساسية صنف الشليك قيصر للفطر *F.oxysporum*

تشير النتائج إلى تحسن النمو الخضري في المعاملة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه المقاومات الحيوية الفطرية والبكتيرية والمقاوم الحيوي Azadarachtin مقارنة مع المعاملة بالفطر لوحده، وكذلك المعاملة بتربة معقمة بالفورمالين والمعاملة بتربة غير معقمة في صنف الشليك قيصر (شكل رقم 1). إن زيادة الكثافة الخضريّة في المعاملات التي تم فيها إضافة المقاومات الحيوية الثلاثة تأتي نتيجة تحسن النمو الجذري الذي بدأ أنه يعاني من اسوداد الجذور الرئيسية والجذيرات الثانوية في المعاملة بالفطر لوحده (شكل رقم 2/ 9-10) وزيادة قدرة الجذور على النمو وامتصاص العناصر الغذائية وتحفيز صفات النمو الخضري متمثلة بالزيادة في عدد الأوراق والوريقات ومقاومة النبات للإصابات المرضية وتحمل الظروف القاسية ومنع حدوث أكسدة فيتامين C و E اللذين يوجدان في الكلوروبلاست مما يؤدي إلى زيادة كفاءة التركيب الضوئي وبالتالي يحسن من نمو وتطور النبات (8)، إذ إن فائدة البكتيريا المحفزة لنمو النبات تتمثل في زيادة نسبة إنبات البذور ونمو الجذور بشكل جيد، وزيادة في الإنتاج والمساحة الورقية والمحتوى الكلوروفيلي والمغنيز والنيتروجين والمحتوى البروتيني، وحجم المجموع الجذري والخضري، وبذلك يمكن الحصول على نباتات متحملة (9). يعود تفوق المعاملات المضاف لها البكتيريا إلى المنافسة بين البكتيريا والمسببات المرضية على العوامل الأساسية والضرورية للنمو، كالمواد الغذائية وإفرازات الجذور (10، 11)، فضلاً عن مقدرة البكتيريا على إنتاج العديد من المضادات الحيوية التي تحلل سايتوبلازم الخيوط الفطرية للمسببات المرضية وتصنع مواد ومركبات يحتاجها النبات بشكل ضروري ومن بينها الهرمونات النباتية (12)، وتزداد كذلك فعالية أنزيم Peroxidase والذي يؤدي إلى تقوية جدار الخلية ويحد من عملية

اختراق المسببات الفطرية للأنسجة النباتية (13). وقد تعود زيادة الكثافة الخضريّة إلى دور هذه المقاومات في زيادة جاهزية العديد من العناصر للنبات ومنها النيتروجين والبوتاسيوم والفسفور، لما لهذه العناصر من دور فعال في بناء الكلوروفيل، ولا سيما النيتروجين الذي يدخل في تركيبها، علماً بأن أكثر من نصف المحتوى الكلي للنبات من النيتروجين يوجد في الكلوروبلاست، فضلاً عن دور الفسفور في بناء المركبات الحاملة للطاقة، التي تساهم في بناء جزيئات الكلوروفيل والبوتاسيوم الذي يعد واحداً من أهم العناصر التي تعمل كمُنشطات للعديد من البايات التركيب الضوئي والتنفس (14). وقد يعود أيضاً إلى الاختلاف بين الأجناس والأنواع والتغاير الوراثي بين عزلات النوع بسبب التباين في كمية ما تفرزه هذه العزلات من المواد الأيضية التي تؤدي دوراً كبيراً في مقدرة الفطريات الإمراضية ومنها Phenyl acetic acid و Fusaric acid و Polpeptide toxin و Anhydro fusarbin (15)، أو ربما يعود إلى اختلاف العزلات في مقدرتها على إفراز الأنزيمات المحللة للبكتين والسيليلوز في المراحل المبكرة من الإصابة، وهذه الإنزيمات تؤدي دوراً في اختراق العائل ومنها Pectinase و Pectin methylesterase و Pectinase و Cellulase و Laccase و Phosphatase و Lignin peroxidase والتي لها الأثر الكبير في إمراضية الفطر، واختلاف العزلات في مقدرتها على التطفل المباشر، وامتلاك الفطر *Trichoderma spp.* العديد من الآليات التي يؤثر من خلالها في الفطريات الممرضة للنبات. إن زيادة الكتلة الحيوية تدل على قدرة عامل المكافحة الإحيائية *T.viride* في استغلال الوسط استغلالاً أمثل، مما يعزز ازدياد فرص وجوده في بيئته، ومن ثم قدرته في النشاط والتكاثر والبقاء، كما يعزز هذا الجانب فرص إحداث متغيرات حيوية كفوءة حول الجذر كالتطفل والتضاد والتحلل، وزيادة جاهزية العناصر الغذائية وتنشيط منظمات النمو من خلال زيادة أعداد الخلايا المستوطنة من النبات (16).



شكل رقم (1) : تأثير المعاملات المختلفة في حساسية صنف الشليك قيصر، A : المعاملة بالفطر *F. oxysporum* وحده، B : المعاملة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه مقاوم حيوي فطري، C : المعاملة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه مقاوم حيوي فطري، D : المعاملة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه مقاوم حيوي فطري، E : المعاملة بالمقاوم الحيوي الفطري، F : المعاملة بالمقاوم الحيوي البكتيري، G : المعاملة بالمقاوم الحيوي Azadirachtin، H : المعاملة تربة معقمة بالفورمالين، I : المعاملة تربة غير معقمة



شكل رقم (2): أعراض الإصابة المرضية على أوراق صنف الشليك قيصر 1 : أوراق سليمة، 2 : بداية الإصابة اصفرار ولفحة حواف الأوراق، 3- 6 : تقدم الإصابة زيادة المساحة المصفرة والمصابة باللفحة من الورقة، 7- 8 : لفحة الورقة بالكامل، 9 : جذر عاني من مراحل متأخرة من الإصابة بالتعفن متمثل بأسوداد المنطقة الجذرية بالكامل والذي سبب موت النبات (يمين)، جذر غير مصاب (يسار)، 10 : مقطع طولي للتاج يظهر تلونه باللون البني الداكن نتيجة الإصابة.

في القراءة الثانية. إن ارتفاع شدة الإصابة في القراءة الثانية للفطر *F. oxysporum* (الجدول رقم 2) قد يرجع إلى زيادة وتراكم اللقاح الفطري، فضلاً عن تحمله الظروف غير الملائمة لنموه بهيئة أبواغ كلاميدية، مما يؤدي إلى زيادة مقدرة عزلة الفطر على إفراز العديد من المركبات الأيضية الثانوية السامة، والإنزيمات المحللة للبروتين والسليولوز في المراحل الأولى من الإصابة، التي لها الأثر الكبير في إمرضية الفطر واختراق الدفاعات البنائية للعائل (17). كما أن سبب حساسية الأصناف للإصابة بالفطريات الممرضة قد يعود إلى تحلل المركبات الدفاعية للنباتات Phytoalexins من قبل الفطريات المهاجمة عن طريق إفرازها لبعض الأنزيمات المحللة لهذه الدفاعات (18). وقد فسر بعض الباحثين أسباب حساسية أصناف بعض النباتات لفطر الفيوزاريوم وفقاً لعدة نظريات منها تحلل المركبات الدفاعية في النبات من قبل الفطر المهاجم عن طريق إفرازها لبعض الأنزيمات مثل Tomatinase، كما أن ناتج تأثير الفطر في مقدار التمثيل الغذائي للنبات وجميع وظائفه الفسيولوجية يعطي دلالات واضحة لحساسيته للإصابة. أما النظرية الثانية فتتمثل في تباين تحمل بروتوبلاست النبات لمركبات التمثيل الثانوية البروتينية الخارج خلوية Extracellular المنتجة من المسبب، ومن هذه المركبات Fusaric Acid و Lycomarasmine، التي تزيد من إمرضية الفطر. إن الإصابات الفطرية قد تسبب نقص البوتاسيوم والذي يؤدي إلى ظهور جذر خلايا وسيقان ضعيفة وصغيرة وجذور مختزلة وتراكم السكريات في الأوراق وعدم استغلال النبات للنيتروجين، مما يشجع على حدوث الإصابة (19). فضلاً عن أن له

#### حساب شدة ظهور المرض (%) للفطر *F. oxysporum*

تبين النتائج في الجدول رقم (2) أن إضافة المقاومات الحيوية الثلاثة إلى الفطر *F. oxysporum* سببت انخفاضاً معنوياً في شدة ظهور المرض بالمقارنة مع المعاملة بالفطر لوحده، حيث سجلت المعاملة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه مقاوماً حيوياً فطرياً انخفاضاً معنوياً في شدة ظهور المرض بلغ 41.98% في القراءة الأولى. زاد الانخفاض في شدة ظهور المرض في القراءة الثانية، حيث بلغ 36.56% بالمقارنة مع المعاملة بالفطر *F. oxysporum* وحده، وبلغت شدة ظهور المرض 78.32% في القراءة الأولى، وزادت هذه النسبة في القراءة الثانية، إذ بلغت 87.15%. كما سببت المعاملة *F. oxysporum* مضافاً إليه مقاوماً حيوياً بكتيرياً انخفاضاً معنوياً في شدة ظهور المرض في القراءة الأولى وبلغت 65.77%، كما زاد انخفاض شدة ظهور المرض في القراءة الثانية، وبلغ 55.21% بالمقارنة مع المعاملة بالفطر وحده، في حين سببت المعاملة بالفطر *F. oxysporum* مضافاً إليه المقاوم الحيوي Azadirachtin انخفاضاً معنوياً في شدة ظهور المرض بلغ 47.15% في القراءة الأولى، وزاد هذا الانخفاض في القراءة الثانية وبلغ 43.11%. وسجلت المعاملة بتربة معقمة بالفورمالين انخفاضاً معنوياً في شدة ظهور المرض بلغ 59.11% في القراءة الأولى، وزادت هذه النسبة في القراءة الثانية وبلغت 51.12% بالمقارنة مع المعاملة بالفطر وحده من جهة، ومن جهة أخرى المعاملة بتربة غير معقمة، حيث بلغت شدة ظهور المرض 75.72% في القراءة الأولى و 82.15%

المرمضة عن طريقها بواسطة تجميع السليكا في الجدر الخلوية ومن ثم زيادة متانتها (18).

القدرة في استحداث المقاومة للنبات وخفض شدة الإصابة وتحسين الدفاعات التركيبية في النبات، كما أن نقص البوتاسيوم يعمل على إبقاء فتحات الثغور مفتوحة لمدة أطول، مما يسهل دخول الفطريات

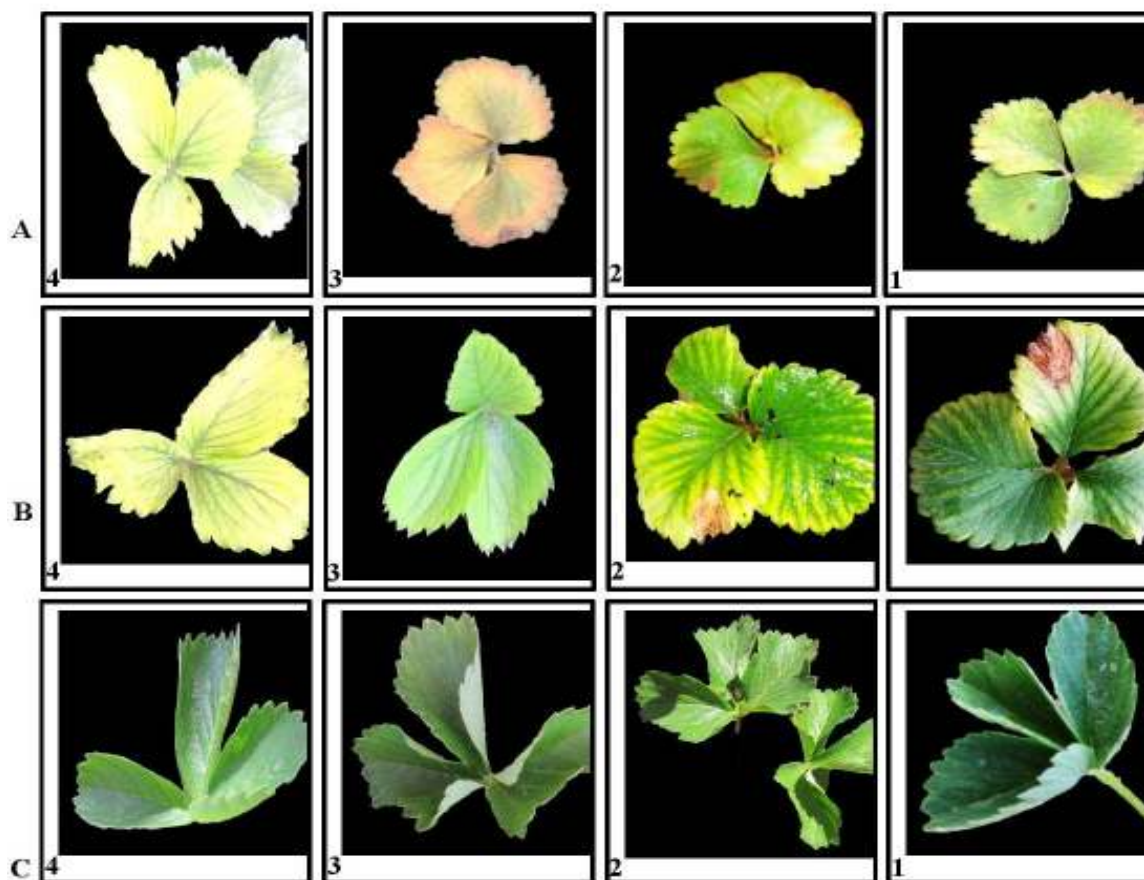
جدول رقم (2): تأثير المعاملات المختلفة في النسبة المئوية لشدة ظهور المرض للفطر *F. oxysporum* لصنف الشليك قيصر

شدة ظهور المرض (%)		المعاملات
2013/3/10	2013/2/10	
87.15 <sup>ا</sup>	32.78 <sup>ا</sup>	<i>F. oxysporum</i>
36.56 <sup>و</sup>	41.98 <sup>و</sup>	<i>F. oxysporum</i> + مقاوم حيوي فطري
55.21 <sup>د</sup>	56.77 <sup>د</sup>	<i>F. oxysporum</i> + مقاوم حيوي بكتيري
43.11 <sup>هـ</sup>	47.15 <sup>هـ</sup>	<i>F. oxysporum</i> + المقاوم الحيوي Azadarachtin
61.12 <sup>ج</sup>	59.11 <sup>ج</sup>	تربة معقمة بالفورمالين
82.15 <sup>ب</sup>	75.72 <sup>ب</sup>	تربة غير معقمة

<sup>ا-د</sup> التحليل الاحصائي تم حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05

الضوئي والسيطرة على آلية فتح وغلق الثغور، مما يؤدي إلى انحنائها إلى الأعلى (شكل رقم 3- C ) ، ويمكن أن تصاب جميع الأوراق مسببة موت النبات بالكامل نتيجة تدمير المجموع الخضري، أو قد تصاب بعض الأوراق دون الأخرى فتسبب انخفاضاً في الكثافة الخضرية للنبات نتيجة انخفاض عدد الأوراق والوريقات (شكل رقم 1).

**الأعراض المرضية للإصابة بالفطر *F. oxysporum***  
تضمنت الأعراض المرضية على المجموع الخضري للفطر *F. oxysporum* حصول شحوب واصفرار (شكل رقم 3- A) يبدأ من حافة الورقة يتبعه لفحة حواف الأوراق ينتشر بعدها ليشمل كامل الورقة فتموت الأوراق (شكل رقم 2، 2-8) بعدها في الإصابات الشديدة قد يظهر عليها أعراض التحرز (شكل رقم 3- B)، إذ تظهر عروق الأوراق بلون غامق مقارنة مع باقي أجزاء الورقة التي تعاني من الاصفرار، ونتيجة إصابة الأوراق تنخفض كفاءتها في البناء



شكل رقم (3): أعراض الإصابة المرضية على أوراق صنف الشليك قيصر، A 1-4 : اصفرار الأوراق، B 1-4 : وضوح العروق، C 1-4 : انحناء الأوراق إلى الأعلى

يفعل إنزيمات فطريات التعفن (29). وقد يعود تلف خلايا أنسجة الجذور إلى نقص العناصر المعدنية نتيجة الغصابات الفطرية ومنها النيتروجين والفسفور والكالسيوم التي تساعد في بناء الجدر الخلوية أثناء اتحادها مع البكتين غير الذائب، وتكوين بكتات الكالسيوم التي تزيد من صلابة الجدر الخلوية، وتنظيم نفاذية الأغشية للماء والعناصر الغذائية، فضلاً عن دور الكالسيوم في تحفيز نمو واستطالة خلايا الجذور، كما يؤثر في تكوين الأوكسين الذي يحفز نمو أنسجة النبات وتطوره، وبالتالي زيادة معنوية في أغلب صفات الحاصل الكمية (30).

## المصادر

1. Attia MF.; Arafah AM.; Moustafa MA. and Mohamed MA. (2003). Improvement of pepper resistance to *Fusarium* wilt. Egypt. J. Phytopathol. 31:151-165.
2. Davis JG.; Iversen KV.; Vigil MF. and Meyer RB. (2008). Manure sampling and spreader calibration: testing our recommendations. In Proc. of the 20<sup>th</sup> Annual Central Plains Irrigation Conference, Greeley, Co., 19–20 F. pp: 1- 6.
3. Agrios GN.(2005). Plant Pathology. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Academic Press, Burlington, U.S.A.
4. Kim JS.; Kang NJ. ; Kwak Y S. and Lee C. (2017). Investigation of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using PCR-RFLP. Plant. Pathol. J. 33(2):140-147.
5. Fang XL.; Phillips D.; Li H.; Sivasithampam K. and Barbeti MJ. (2012). Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in Western Australia, J. Aust. Plant Pathol. 40 (2):109-119.
6. Tewoldemedhin Y.; Mazzola M.; Mostert L. and Mcleod A. (2011). *Cylindrocarpum* species associated with apple trees in South Africa, and the development of a molecular quantification technique from roots. J. Phytopathol. 99:127.
7. Dewan MM. (1989). Identity and frequency of occurrence of fungi in roots of wheat and rye grass and their effect on take all and host growth. Ph.D. Thesis. University of West Australia. P.: 210.
8. Jensen E. (2004). Seaweed fact or fancy. From the organic broadcaster. Published by Noses the Midwest organic and sustainable education. 12(3): 164-170.
9. Luky M.; Reed E. and Glick BR (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Rev. Antonie Van Leeuwenhoek. 86:1-25.
10. Verma JP.; Yadav J. and Tiwari KN.(2009). Effect of meosorhizobium and plant growth promoting rhizobacteria on nodulation and yields of chickpea. Biol. Forum. An Int. J. 1: 11-14.
11. Verma JP.; Yadav J.; Tiwari KN.; Lavakush S. and Singh V. (2010). Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. Int. J. Agric. Res. 11: 954-983.
12. Mali GV. and Bodhankar MG. (2009). Antifungal and phytohormone production potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from Groundnut (*Arachis hypogea* L.), Asian J. Exp. Sci. 23(1):293-297.
13. Faize M.; Faize L.; Koike N.; Ishizaka M. and Ishii H. (2004). Acibenzolar S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with

إن الأعراض المرضية الظاهرة على المجموع الخضري هي نتيجة إصابة المجموع الجذري بفطر التعفن *F. oxysporum*، إذ يغزو الفطر الجذور ويخترق نسيج البشرة والقشرة وقد يسبب تحلل الجدر الخلوية وخروج محتويات الخلية للخارج، وينتقل عبر الأوعية الناقلة إلى منطقة التاج مما يؤدي إلى تعفنها، ونتيجة ترسب السموم الفطرية فيها تؤدي إلى تلونها بلون غامق (شكل رقم 2/ 9-10) وبعدها تصل إلى الأوراق عبر الأوعية الناقلة مسببة ظهور أعراض الإصابة بلفحة الأوراق (شكل رقم 2/ 8-1) والذي سببه تعفنت الجذور.

أجريت العديد من الدراسات على اختبار كفاءة بعض أنواع *Trichoderma* spp. وفي مقدمتها *T.harzianum* و *T.viride* في مكافحة ضد مدى واسع من مسببات المرضية، ولقد اهتمت الدراسات في تحسين مواصفات الفطر، وإن هذا التحسين شمل جميع الفعاليات التي يتمتع فيها الفطر في المكافحة فضلاً عن تحمله لبعض لمبيدات التربة الفطرية (20).

عرف الفطر *Trichoderma* spp. بمهاجمته للفطريات في محيطه الحيوي وفي إنتاجه للمضادات الحيوية المؤثرة في الكائنات الحية المجهرية، فضلاً عن كونه من أكثر الكائنات الحية المجهرية استخداماً وانتشاراً على مستوى العالم في مجال المكافحة الإحيائية، ويشكل ذلك أهمية اقتصادية كبيرة في مجال المكافحة والسيطرة لدى واسع من مسببات المرضية، ولا سيما في مكافحة فطريات التربة وأمراض الجذور (21). سجلت أنواع الفطر *Trichoderma* كعامل مكافحة إحيائية ضد مجموعة كبيرة من الفطريات الممرضة، ومنها الفطر *Fusarium solani*، والفطر *Sclerotium rolfii* المسبب لمرض تعفن ساق فسق الحقل (22)، والفطر *Stemphylium vesicarium* المسبب للفة البصل (23)، والفطريات *Plectosporium tabacinum* و *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium* spp. و *Rhizopocynis vagum* و *Sclerotinia sclerotiorum*، و *Trichoderma* sp. مواد *Gliotoxin* و *Piptaibols* والتي لها تأثير مثبط للعديد من فطريات التربة الممرضة للنبات، فضلاً عن زيادة المقدرة الاستيطانية في التربة وتحمل الأوساط القاعدية والحرارة المنخفضة (20). يعود سبب التلون البني في أنسجة أوعية الخشب (شكل رقم 2/ 9-10) لتكوين صبغات من الميلانين *Melanin* ذات اللون البني – البني الغامق والناشئة من جراء تأكسد متعدد الفينولات *Polyphenols* وتحولها إلى الكينونات *Quinones* عن طريق إنزيم أوكسيداز متعدد الفينول *Polyphenol oxidases* ومن ثم حصول عملية البلمرة *Polymerization* للكينونات وتكوين الميلانين ذي اللون البني. إن الفطر *Fusarium* spp. الممرض يستمر بالنمو ما بين خلايا قشرة الجذور حتى يصل أوعية الخشب فيدخلها عن طريق النقر ويستمر الفطر بنموه نحو الأعلى باتجاه الساق، ويكون الفطر ثلاثة أنواع من السموم هي *Fusaric acid* و *Dehydrofusaric acid* و *Lycomarasin*. ويبدو أن هذه المواد تؤثر في نفاذية جدران الخلايا الحشوية للماء، مما يحدث اضطراباً في تنفس النباتات المصابة، فضلاً عن استحوذها على بعض العناصر الثقيلة كالحديد والنحاس، وبالتالي يؤثر في نشاط وفعالية الإنزيمات النباتية وبالتالي المساحة الورقية للنبات (3). إن انخفاض شدة الإصابة بالفطر بفعل المقاوم الحيوي، وبقاء الأنسجة الجذرية نشطة وفعالة قد يؤدي إلى تحسين النمو الجذري والشعيرات الجذرية، مما قد ينعكس إيجابياً في النشاط الفسلجي للجذور وزيادة معدلات امتصاص الماء والعناصر المغذية وزيادة كفاءتها، وبالتالي بناء نمو خضري جيد، وحاصل نوعي جيد (جنول رقم 2، شكل رقم 1)، وهذا يتماشى مع ما وجدته *Deshwal* وآخرون (25، 26).

أما أعراض مرض التعفن، فتظهر على شكل بقع نخرية للتيجان والجذور خاصة الأنسجة الخشبية (27)، كما أن أمراض الجذور السوداء على نبات الشليك المتسببة عن العديد من الفطريات منها *Pythium* spp. و *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* تحدث تقرحات تمع المجموع الجذري وتعفن قشرته وتفصل عن الاسطوانة الوعائية، كما تسبب غمناً لمنطقة التاج، ولسموم فطريات التعفن مثل *Fusaric acid* و *Javanicing* و *Naphthazavin* و *Trichothecenes* و *lycomarasin* و *Anhyolrofunbin* و *Polypeptide toxin* دور كبير في اختزال المجموع الجذري، فضلاً عن الإنزيمات المحللة للسليولوز والبكتين والمكونة منها الجدر، وتسبب أيضاً تدمير منطقة التاج

Compendium of Wheat Disease and Pest . APS Press.

30. David B.; Barry M.; Honda F R.; Mantiri G. and Samuels J. (2007). *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria* mammoidea group and species lacking microconidia. J. Myco. 96 (3) : 572-597.
- potential of multiple defense responses. J. Phytopathol. 94 (604): Abs.
14. Taiz L. and Zeiger E. (2002). Plant Physiology. 3rd ed. Publisher Sinauer Associates. P.:690.
15. Barreto D.; Babbitt S.; Gally M. and Perez BA.(2003). *Nectria haematococca* causing root rot in olive greenhouse plants revista. de la Soiciedad Argentina de Horticultura. 32: 49-55.
16. Jaime M.; Valderrama L., Sánchez S.; Herrera R.; Besoain X. and Pérez ML. (2011). Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants, Elec. J. Biotechn. 13(2):1-11.
17. Lilja A.; Lozovaya VV.; Lygin AV.; Zernova OV.; Li S.; Wind Holm JM. and Hartman GL. (2006). Lignin degradation by *Fusarium solani*. J. Plant Dis. 9:77-82.
18. Amtmann A.; Troufflard S. and Armengaud P.(2008). The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. Physiol. Plant. 13:1399-1405.
19. Fixen PE. (2002). Soil test levels in North America. Better. Crops. 86: 12-15.
20. Besoain AX.; Perez LM.; Araya A.; Lefever L.; Sanguinetti M. and Montealegre JR. (2007). New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma harzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici*. E. J. Biol.Tech. 10:664-617.
21. Fravel DR. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol, Ann. Rev. Phytopathol. 43: 337-359.
22. Ganesan SR.; Kuppusamy G. and Sekar R. (2007). Integrated management of stem rot disease *Sclerotium rolfsii* of groundnut *Arachis hypogaea* L. using rhizobium and *Trichoderma harzianum*. J. Theor. Expl. Biol. 3: 53-58.
23. Hussein MAM.; Hassan MHA.; Allam ADA. and Abo-Elyousr KAM. (2007). Management of stemphylium blight of onion by using biological agents and resistance inducers. Egypt J. Phytopathol. 35: 49-60.
24. Carlucci F.; Lops M.; Mucci C.; Lazzizera L.; Colatruglio ML.; Aimondo R. and Frisullo S. (2006). Effectiveness of biological and chemical tread products used in the nursery to control telluric pathogens of melon crops. J. Plant Pathol. 88:31-63.
25. Deshwal VK.; Devi MS.; Bhajanka N.; Mistri J.; Bose A. and Saini N. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* strains and their role in plant growth promotion in medicinal plant. Global. J. Appl. Agr. Res. 1: 49-55.
26. Deshwal VK.; Vig K.; Amisha DM.; Yadav P.; Bhattacharya D. and Verma M. (2011). Synergistic effects of the inoculation with plant growth-promoting *Rhizobium* and *Pseudomonas* on the performance of *Mucuna*. Ann. Forest. 19(1):13-20.
27. Erper İ. and Tunali B. (2011). First report of *Cylindrocarpon liriodendri* on Kiwi fruit in Turkey. Turk. J. 95(1):763-773.
28. Dart NL. and Weeda SM. (2011). First report of *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Acer palmatum* in Virginia. Phytopathol. Med. 95(12):592-595.
29. Bockus WW.; Bowden RL.; Hunger RM.; Morrill W.; Murray L. and Smiley RW. (2010).

## دور المقاومة الحيوية في التقدير الكمي لمنظم النمو ABA لنباتات صنف الشليك قيصر Kaiser's المصاب بالفطر *Fusarium oxysporum*

نديم أحمد رمضان، هديل أحمد العامري

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل/ جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: hadeelahmed.mu@gmail.com

### الملخص باللغة العربية

أظهرت نتائج التقدير الكمي لمنظم النمو ABA بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) High Performance Liquid Chromatography في النباتات المعاملة لصنف الشليك قيصر تباين النتائج تبعاً لتباين المعاملات، إذ قل مستوى منظم النمو ABA في النباتات المصابة صناعياً بالفطر *F. oxysporum* والمعاملة بالمقاومات الحيوية الفطري والبكتيري والمقاوم الحيوي Azadarachtin عن مستواه في النباتات غير المعاملة بها والمصابة صناعياً بالفطر، وبلغ أعلى تركيز لمنظم النمو ABA 1038.562 نانوغرام/غرام وزن رطب في النباتات المعاملة بالفطر *F. oxysporum* وحده، في حين بلغ أقل تركيز 187.838 نانوغرام/غرام وزن رطب في النباتات المعاملة بالمقاوم الحيوي الفطري قياساً إلى معاملة المقارنة، والتي تضمنت تربة غير معقمة، وبلغ تركيز منظم النمو ABA فيها 986.573 نانوغرام/غرام وزن رطب.

الكلمات المفتاحية: المقاومة الحيوية، الشليك، *F. oxysporum*

## The role of bio-resistance in the quantitative estimation for growth regulator ABA in Strawberry plant Kaiser's infected by fungi *Fusarium oxysporum*

Nadeem A. Ramadan and Hadeel A. Ameri

Dept. of Biology/ College of Sciences / University of Mosul / Republic of Iraq

### ABSTRACT

The results of quantitative estimation of growth regulators ABA technology High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the treated plants for Variety strawberry Kaiser's varied results depending on the variation of treatments, as the decreased level of the growth regulators ABA in infected plants artificially with fungi *F. oxysporum* thoughtful treatment resistance fungal, bacterial and Azadarachtin bio-control, compared to the non -treatment plants and experimental fungi infected with fungi , the highest concentration of the growth regulator ABA 1038.562 ng /g wet weight in plants treatment by fungus *F. oxysporum* alone and less concentration was 187.838 ng /g wet weight in the plants treated with fungal bio-control according of control witch is unsterilized soil concentration of the growth regulator ABA in it was 986.573 ng /g wet weight.

## المقدمة

والسيطرة الكيميائية لهذا المرض غير مجدية بعد بسبب التنوع الوراثي للمسبب المرضي (1).

تساهم منظومات النمو النباتية بشكل فعال ومؤثر في تنظيم النمو والتكيف في خلايا وأنسجة النباتات المختلفة، وتساهم في بناء جسم النبات بشكل متكامل، وأن إنتاج تلك الهرمونات ليس مقتصرًا على النباتات فحسب، وإنما وجد بأن للبكتيريا المتعايشة في الجذر *Rhizobacteria* وبعض من المجتمعات الميكروبية الأخرى في التربة دوراً في إنتاج الهرمونات النباتية والمركبات الشبيهة بها وإفرازها في المحيط الجذري، وهذه الصفة وجدت في أجناس بكتيرية متعددة منها *Rhizobium*، *Azotobacter*، *Bacillus*، *eudomonas*، ومن الهرمونات المهمة المنتجة من تلك البكتيريا هو *Indol Acetic Acid* و *Cytokinin* و *Gibberellin*، وهذه الهرمونات تساهم بدورها بشكل كبير في تطور نمو النبات والسيطرة على سائر الفعاليات الفسيولوجية المختلفة في خلايا النبات (13).

## المواد وطرق العمل

أخذت عينة من الأوراق الغنية بوزن رطب مقداره 10 غرام، وأضيف إليها 10 سم<sup>3</sup> من الميثانول MeOH بتركيز 70%، وتركزت لمدة 24 ساعة في الظلام وفي درجة حرارة 4°C. جرى بعد ذلك ترشيح العينات باستخدام ورق ترشيح نوع Whatman No.1. وتم تبخير الميثانول MeOH بالمixer الدوار، ومن ثم جرى تعديل الأس الهيدروجيني للطور المائي إلى 8.5 باستخدام محلول الفوسفات الدائري. وتمت إضافة خلايا الإيثيل Ethyl Acetate إلى المحلول، وتم إجراء الفصل باستخدام قمع الفصل، ولثلاث مرات وبعد التخلص من طور خلايا الإيثيل Ethyl Acetate. عدل الأس الهيدروجيني للطور المائي إلى 2.5 باستخدام حامض الهيدروكلوريك HCL 1 عياري. وجرى الفصل لثلاث مرات باستخدام داي إيثايل إيثر Diethyl Ether باستخدام قمع الفصل، وبعد ذلك فصل طور داي إيثايل إيثر Diethyl Ether وجفف باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Anhydrous، ترك طور داي إيثايل إيثر Diethyl Ether في جو المختبر وفي الظلام لحين تمام التبخر وأذيت البقايا في 2 مل من الميثانول MeOH وحفظت في 4°C لحين التقدير (14).

تم التقدير الكمي لمنظم النمو ABA باستخدام جهاز HPLC المجهز من شركة Shimadzu اليابانية نوع LC-20 AD باستخدام عمود فصل نوع SUPELCO SILMT COLUMN LC-8 بأبعاد 25 سم × 4.6 ملم. الطور المتحرك يتكون من Acetonitrile وماء مقطر بنسبة 30:70، وحجم العينة 10 مايكروليتر بمعدل جريان 0.8 Flow rate مل/دقيقة. استعمل محلول قياس بتركيز 1 ملغم/لتر، استخدم الطول الموجي 265 نانوميتر لمنظم النمو ABA. تم حساب تركيز المركبات عن طريق مقارنة نتائج التقدير الكمي للمركبات الموجودة في نماذج العينات النباتية المدروسة لكل من زمن الاحتباس Retention Time، ومساحة الحزم المجهولة للنماذج مع زمن الاحتباس ومساحة المنحنيات للنموذج القياسي المعروف وفق المعادلة الآتية:

$$\text{تركيز المركب في العينة} = \frac{\text{مساحة حزمة المركب}}{\text{مساحة حزمة النموذج القياسي}} \times \text{تركيز النموذج القياسي}$$

اختبرت المعاملات التالية من التجربة الحقلية لغرض التقدير الكمي لمنظم النمو ABA:

- 1- تربة ملوثة بالفطر *F.oxysporum* لوحده.
- 2- تربة ملوثة بالفطر *F.oxysporum* + المقاوم الحيوي الفطري *Trichoderma viridi*.
- 3- تربة ملوثة بالفطر *F.oxysporum* + المقاوم الحيوي البكتيري *Bacillus subtilis*.
- 4- تربة ملوثة بالفطر *F.oxysporum* + المقاوم الحيوي *Azadirachtin*.
- 5- تربة ملوثة بالمقاوم الحيوي الفطري لوحده.
- 6- تربة ملوثة بالمقاوم الحيوي البكتيري لوحده.
- 7- تربة مضاف إليها المقاوم الحيوي *Azadirachtin* لوحده.

نبات الشليك ( *Fragaria x ananassa* Duch ) ينتمي إلى رتبة *Rosales* والعائلة الوردية *Rosaceae* وتحت العائلة *Rosaideae* وإلى الجنس *Fragaria* ، وإلى النوع *Fragaria x ananassa* Duch، وهو نبات عشبي معمر جميل الشكل وثماره لذيذة الطعم (1)، ويعد من الفواكه ذات الثمار الصغيرة، وتنتشر زراعته في مساحات شاسعة في العديد من دول العالم لما يتمتع به من قيمة غذائية وعلاجية عالية. اشتق اسمه من الكلمة اللاتينية (Fragrance وFragrant) ويسمى بالإنجليزي Strawberry، واسمه بالفرنسية (Fraise) وبالإيطالية (Fragola)، ومنه اشتقت تسميته في مصر بالفراولة، وفي تركيا يسمى Chilliak (2)، ومنه أتت تسميته في العراق بالشليك (3).

وتعتبر هذه الثمار ذات قيمة اقتصادية مهمة لتعدد استخداماتها، فهي تستخدم كثمار طازجة وتدخل في العديد من الصناعات الغذائية والعصائر. وتحتوي ثمار الشليك على العديد من المكونات الغذائية منها ماء وكربوهيدرات ومواد صلبة ذائبة، وحوامض منها حامض الستريك وبيروثينات وألياف ودهون وكالسيوم وفسفور وحديد وصوديوم وبوتاسيوم، فضلاً عن احتوائه على فيتامين C وفيتامين A وفيتامين B6 نياسين وعناصر معدنية. ويعطي حوالي 37 سرعة حرارية (4). وتعتبر ثماره وأوراقه مصدراً جيداً للكثير من الأدوية للوقاية والعلاج من بعض الأمراض (1)، وبالرغم من ملاءمة الظروف البيئية وانتشار زراعة الشليك في العديد من الدول العربية والمجاورة للعراق مثل سوريا ولبنان والأردن وفلسطين ومصر وتركيا ودول حوض البحر الأبيض المتوسط، إلا أنه لا يزال محدود الانتشار في العراق ومقتصر على المحطات البحثية وبعض المزارع الخاصة والحدائق المنزلية، خاصة في المحافظات الشمالية من القطر (5).

يعتبر انخفاض إنتاج أو موت نباتات الشليك تحدياً خطيراً لإنتاج الشليك، على الرغم من أن أمراض التاج والجذر من أهم العوامل المحددة خاصة في موسم الإنتاج. إن مسببات الأمراض الرئيسية المرتبطة مع التاج والجذور في الشليك هي فطريات *Fusarium*، *Pythium*، *Cylindrocarpon destructans*، *oxysporum*، *Macrophomina phaseolina*، والتي عزلت في معظم الأحيان من للتيجان، والفطر *C. destructans* و *F. oxysporum* عزل من الجذور بنسبة 11.8% و 12.0%، على التوالي (6). وقد أجريت عدة دراسات للتحقيق في مكونات التربة الميكروبية التي تسبب تعفن جذور الشليك الأسود وهي *Fusarium*، *Cylindrocarpon destructans*، والفطر *Pestalotia longiseta* و *F. solani* و *oxysporum* زادت وتيرة الاستعمار الجذري لنباتات الشليك بقوة من الخريف إلى الربيع، ومثل الفطر *Cylindrocarpon destructans* ما نسبته 60% من الفطريات الممرضة (7).

يعتبر تعفن جذور الشليك مرضاً شائعاً في مزارع الشليك الدائمة. وقد أظهر العزل من النباتات المريضة العديد من مسببات الأمراض مثل *Phoma*، *Fusarium* spp.، *Cylindrocarpon* spp.، *Rhizoctonia solani* spp. (Moročko، 2006)، كما أن *G. fragariae* كان المسبب لمرض تعفن الجذور الأسود على الشليك في لاتفيا والسويد، وهو قادر على التسبب في إحداث تعفن شديد في الجذور ومرض لفحة السويقات (8). ارتبط الفطر *Macrophomina phaseolina* بما يتسبب به من خسائر تعفن التاج الخطيرة في نباتات الشليك في أستراليا في السنوات الأخيرة، فالفطريات تنتج *Microsclerotia* (9، 10). وفي إيطاليا أجريت عدة دراسات لمعرفة مكونات التربة الميكروبية التي تسبب تعفن الجذور الأسود في الشليك الذي يحدث في جميع أنحاء إيطاليا، وهذه الفطريات هي *Fusarium* و *Cylindrocarpon destructans* و *oxysporum* و *Pestalotia longiseta* و *F. solani* (11). وفي الولايات المتحدة الأمريكية، تم عزل الفطر *R. solani* من تعفن جذور الشليك في ولاية كاليفورنيا بنسبة 70% و 88%. إن إضافة بكتيريا *Pseudomonads* وبخاصة *P. chlororaphis* إلى التربة المزروعة بالشليك أدت إلى خفض تأثير فطريات عفن الجذور والتاج، إضافة إلى تبخير التربة ببروميد الميثيل/الكلووروكرين (12).

يعد الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* المسبب الرئيسي للذبول الفيوزاريومي في الشليك، وهو مرض خطير مرتبط بالتربة، ويسبب خسائر كبيرة في إنتاجية الفراولة التجارية،

- 8- تربة معقمة بالفورمالين.  
9- تربة غير معقمة (مقارنة).

### النتائج

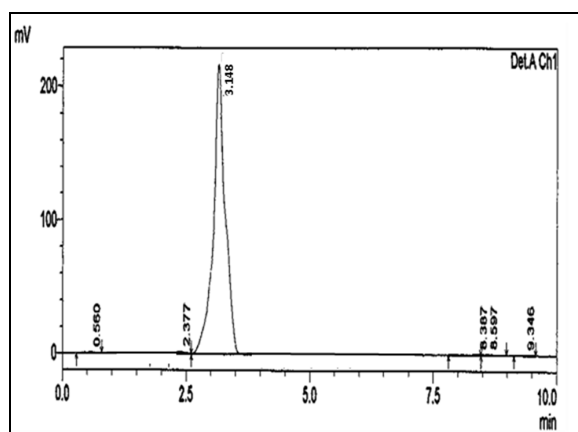
أظهرت نتائج التقدير الكمي لمنظم النمو ABA في النباتات المعاملة لصنف الشليك قيصر نتائج تبين لتباين المعاملات، ويلاحظ من الجدول رقم (1) والأشكال أرقام (1-3) نقصان في مستوى منظم النمو ABA في النباتات المصابة صناعياً بالفطر *F.oxysporum* المعاملة بالمقاومات الحيوية الثلاثة الفطري والبكتيري و Azadarachtin عن

مستواه في النباتات غير المعاملة بها والمصابة بالفطر أعلاه، إذ بلغ تركيز منظم النمو ABA في المعاملة *F.oxysporum* وحده 1038.562 نانوغرام/غرام وزن رطب (الجدول رقم 1 والشكل رقم 1). أما في المعاملات المصابة صناعياً بالفطر *F.oxysporum* ، والمضاف إليها المقاومات الحيوية الثلاثة فيلاحظ نقصان في تركيز منظم النمو. إذ بلغ التركيز في *F.oxysporum* مضافاً إليه المقاوم الحيوي الفطري 305.200 نانوغرام/غرام وزن رطب (الشكل رقم 2)، في حين بلغ التركيز في المعاملة بالفطر *F.oxysporum* مضافاً إليه المقاوم الحيوي Azadarachtin 454.671 نانوغرام/غرام وزن رطب وكان التركيز في المعاملة بالفطر *F.oxysporum* مضافاً إليه المقاوم الحيوي البكتيري 486.860 نانوغرام/غرام وزن رطب.

جدول رقم (1) : زمن الاحتباس ومساحة المنحنيات وتراكيز منظم النمو ABA نانوغرام/غرام وزن رطب في أوراق صنف الشليك قيصر المعاملة بالفطر *F. oxysporum* ومقاوماته الحيوية والمقارنة

المعاملات	تركيز منظم النمو ABA (نانوغرام/غرام وزن رطب)	الارتفاع	المساحة	زمن الاحتباس
المنحنى القياسي	10000	131225	21140140	3.148
<i>F. oxysporum</i>	1038.562	245922	2195534	3.250
<i>F. oxysporum</i> + مقاوم حيوي فطري	305.200	122801	645201	3.712
<i>F. oxysporum</i> + مقاوم حيوي بكتيري	454.671	178652	4546710	3.244
<i>F. oxysporum</i> + مقاوم حيوي Azadarachtin	486.860	192980	102992288	3.159
مقاوم حيوي فطري	187.838	36278	397092	3.659
مقاوم حيوي بكتيري	191.608	286748	405061	3.217
مقاوم حيوي Azadarachtin	125.635	264322	265594	3.160
تربة معقمة بالفورمالين	224.792	371002	475213	3.167
تربة غير معقمة	986.573	185130	2085629	3.699

تتكون التربينات الأخرى الأحادية ، سواء ذات السلسلة المفتوحة أو الحلقية والتي تختلف فيما بينها في تأكسد أو اختزال ذرات الكربون داخل الهيكل الكربوني للتربين. ويمكن الحصول على Farnesy و Granylgerany بإضافة وحدات أخرى من IPP (19). ومن التربينات المهمة في هذا الجانب من الدراسة التربينات الثنائية وهي التربينات التي يحتوى هيكلها على أربع وحدات من الأيزوبين ومن المركبات التابعة لهذه المجموعة الجبرلينات. وقد اتفق على أن المادة تعتبر جبرليناً متى ما احتوت على الهيكل الكربوني العام المعروف Gibbene (18).



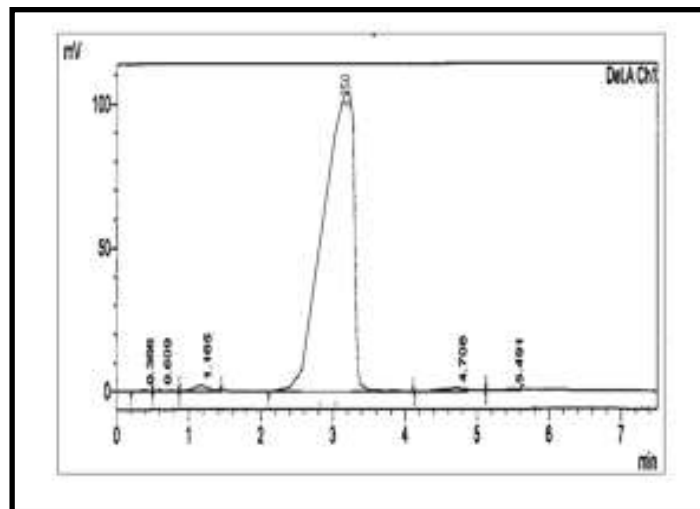
شكل رقم (1): المنحنى القياسي لمنظم النمو ABA

واختلفت هذه التراكيز مع تركيز ABA في معاملات المقاوم الحيوي الفطري و Azadarachtin والمقاوم البكتيري كلاً على حدٍ ولوحده وكانت معاملة بالمقاوم الحيوي الفطري افضل المعاملات في خفض تركيز منظم النمو ABA، إذ بلغ التركيز 187.838 نانوغرام/غرام وزن رطب (الشكل رقم 3) والمعاملة بالمقاوم الحيوي Azadarachtin، إذ بلغ التركيز 191.608 نانوغرام/غرام وزن رطب ثم المعاملة بالمقاوم البكتيري بتركيز 125.635 نانوغرام/غرام وزن رطب قياساً إلى معاملة المقارنة التي تضمنت تربة غير معقمة إذ كان تركيز ABA فيها 986.573 نانوغرام/غرام وزن رطب (الشكل رقم 4).

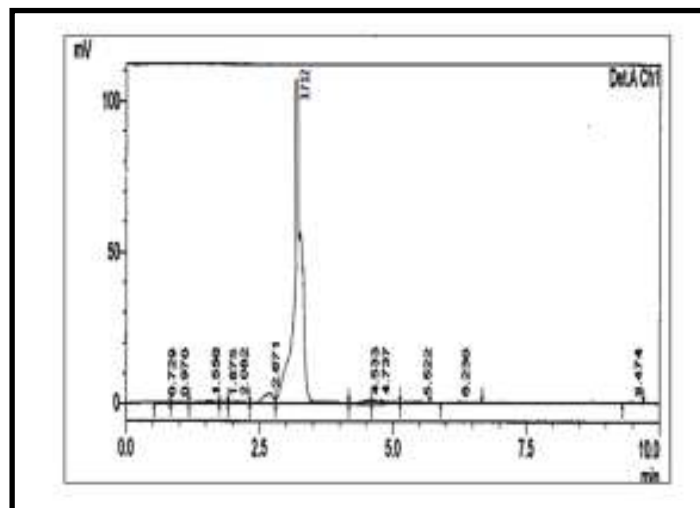
أشار كل من Thomas (15) و Valerie وآخرون (16) إلى أن للفطر *Trichoderma* spp. دوراً في مستوى منظمات النمو في النبات ومنها الأوكسينات، من خلال إنتاج هذه المنظمات أو تنظيم مستوياتها، وأشارت الدراسات إلى قدرة الفطر *Trichoderma* spp. في إنتاج منظمات النمو ومنها الأوكسين IAA، وقد بلغ هذا الإنتاج 200 مايكرو غرام/مل من الوسط الغذائي، فضلاً عن قدرة عزلات الفطر على إنتاج الجبرلينات (16).

كما بين عيود وآخرون (17) قدرة الفطر *Trichoderma* spp. في إنتاج منظمات النمو ومنها الجبرلينات والأوكسينات. وتعد الجبرلينات نموذجاً لمواد الأيض الثانوي في الأحياء المجهرية. وهناك 126 نوعاً من الجبرلينات تم تمييزها في النباتات والفطريات والبكتيريا (18). ويخلق الجبرلين في الفطريات عبر مسار التربينات أحد المسارات المهمة والشائعة في الأيض الثانوي للفطريات بدءاً من ارتباط وحدة من Acetyl CoA الناتجة من هدم الكلوكوز في دورة الكلايكوليسيز مع وحدة أخرى من Acetyl CoA، ثم وحدة ثالثة لينتج في النهاية المركب المعروف باسم حامض Mevalonic Acetoacetyl CoA لينتج حامض الميفالونيك Mevalonic Acid والذي يحول إلى الإيزوبرين النشط، وهو عبارة عن Isopentenyl Pyrophosphate (IPP)، والذي يتكون من الحامض السابق بعد نزع جزيء CO<sub>2</sub> وجزيء ماء، وكذلك عملية فسفرة في وجود مجموعة ATP ثم يتحول جزيء IPP إلى شبيه الإيزوميري المعروف Dimethyle Ally IPP والذي يندمج مع هيكل السلسلة المفتوحة للتربين الأحادي (Geranyl- Monoterpene Pyrophosphate)، ومنه

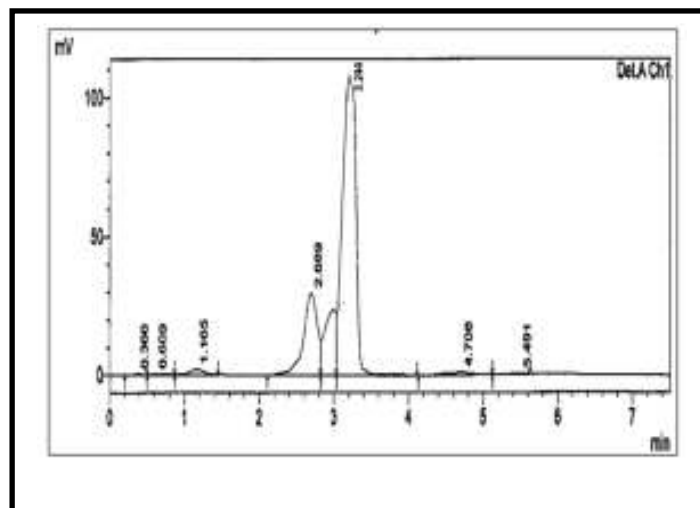
(A)



(B)

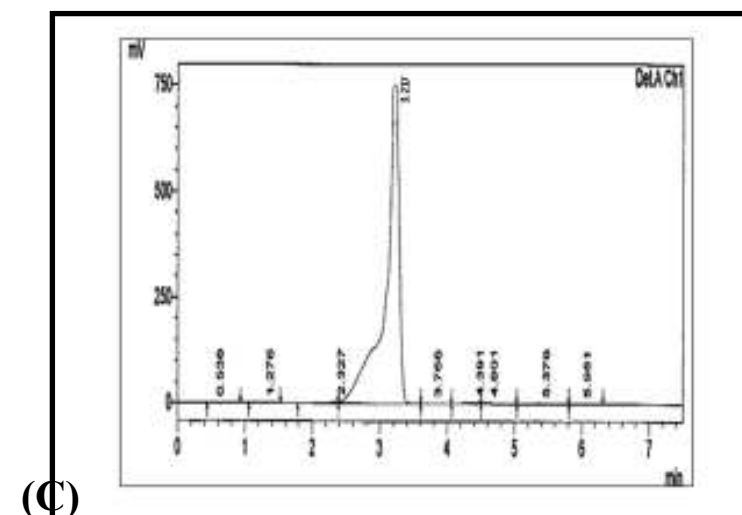
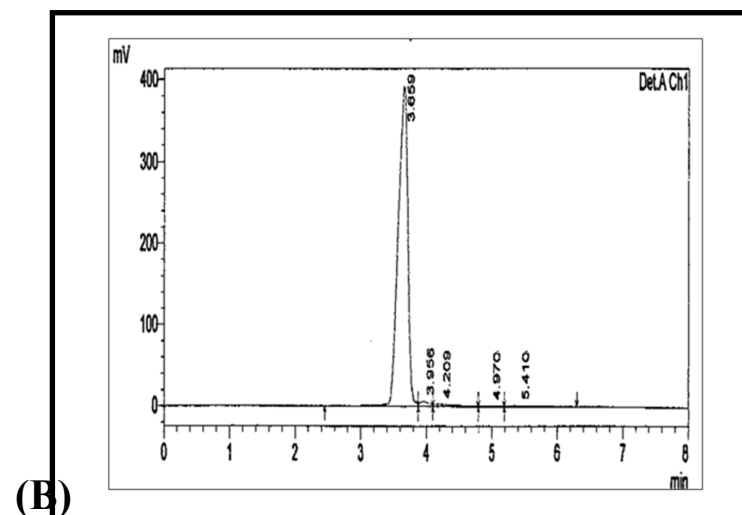
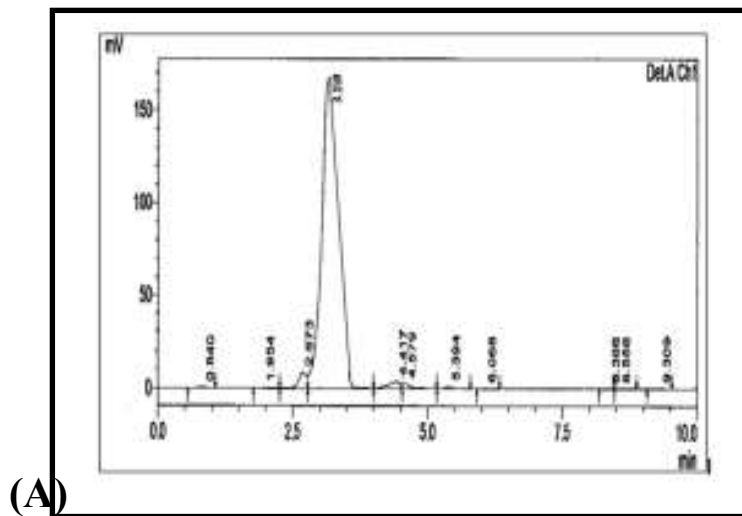


(C)

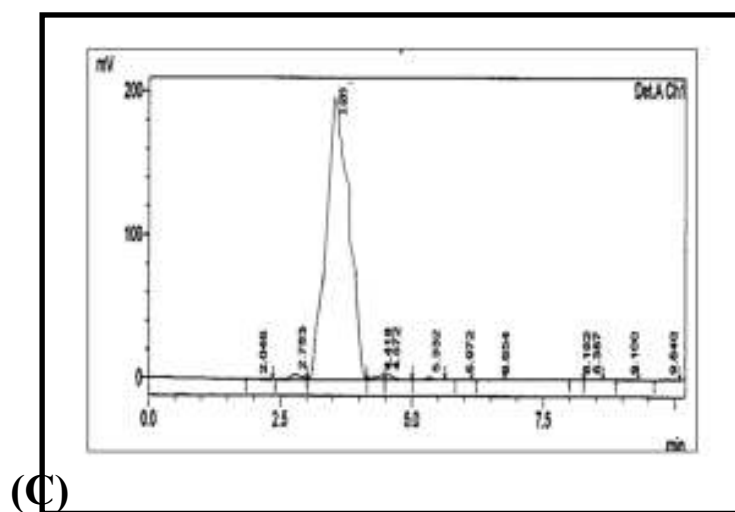
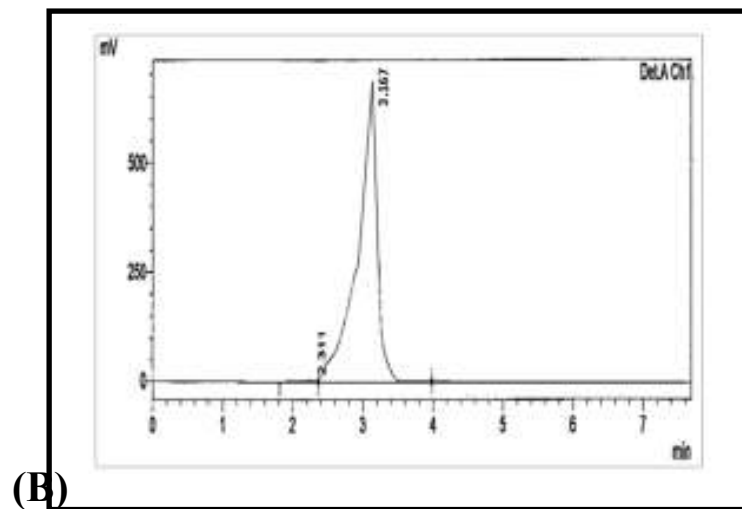
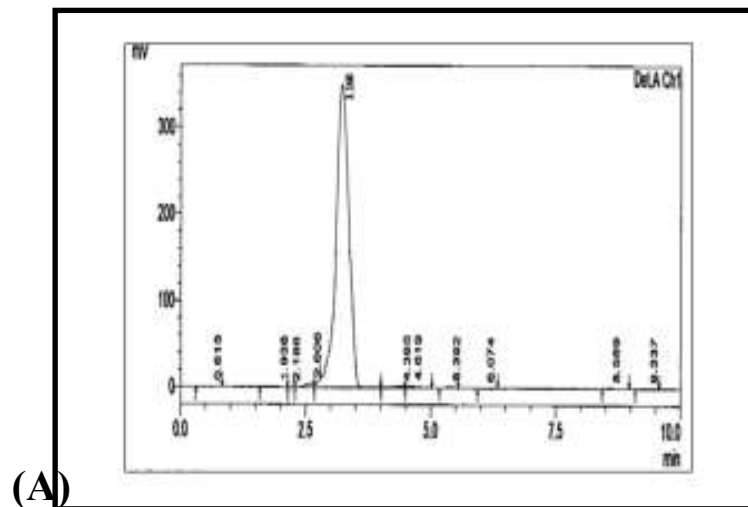


شكل رقم (2) : التقدير الكمي لمنظم النمو ABA (نانوغرام/غرام وزن رطب) في اوراق صنف الشليك قيصر

(A) : المعاملة *F. oxysporium* وحده، (B) : المعاملة بالفطر *F. oxysporium* + المقاومة الحيوي الفطري، (C) : المعاملة *F. oxysporium* + المقاومة الحيوي Azadarachtin.



شكل رقم (3) : التقدير الكمي لمنظم النمو ABA (نانو غرام/غرام وزن رطب) في اوراق صنف الشليك قيصر  
(A) : المعاملة بالفطر *F. oxysporium* + المقاومة الحيوي البكتيري، (B) : المعاملة بالمقاوم الحيوي الفطري، (C) : المعاملة بالمقاوم الحيوي Azadarachtin.



شكل رقم (4) : التقدير الكمي لمنظم النمو ABA (نانوغرام/غرام وزن رطب) في اوراق صنف الشليك قيصر  
(A) : المعاملة بالمقاوم الحيوي البكتيري، (B) : المعاملة تربة معقمة بالفورمالين، (C) : معاملة المقارنة تربة غير معقمة.

7. Tewoldemedhin Y.; Mazzola M.; Mostert L. and Mcleod A.(2011). *Cylindrocarpon* species associated with apple tree roots in South Africa and their quantification using real-time PCR. *Europ. J. Plant. Pathol.* 129:637-651.

8. Inga M.; Jamshid F. and Berndt G. (2006). *Gnomonia fragariae*, a cause of strawberry root rot and petiole blight. *J. Plant Pathol.* 114(3):235-244.

9. Garrido C.; Carbú M.; Fernández-Acero FJ.; Boonham N.; Colyer A.; Cantoral JM. and Budge G. (2009). Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *J. Plant Pathol.* 58(1): 43-51.

10. Don GH.; Apollo OG. and Scott WM. (2013). *Macrophomina phaseolina* and its association with strawberry crown rot in Australia. *Int. J. Fruit Sci.* 13(1-2):149-155.

11. Manici LM.; Caputo F. and Baruzzi G. (2005). Additional experiences to elucidate the microbial component of soil suppressiveness towards strawberry black root rot complex. *Annal. Appl. Biol.* 146 (4):421-431.

12. Schroersa HJMZ.; Alenka M.; Francois H. and Pedro WC. (2008). *Cylindrocarpon pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. *Mycol. Res.* 112: 82-92.

13. Glick BR.; Penrose JJ. and Cantoral JLi. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190: 63-68.

14. Kelen M.; Demiraloy EC.; Sen S. and Ozkan G. (2004). Separation of abscisic acid indole acetic acid and gibberellic acid in 99 Rcvitis *Berlandievix vitis rupestris* and rose oil (*Rose domascena* Mill) by reversed phase liquid chromatography. *Turk. J. Chem.* 28:603-610.

15. Thomas B. (2004). Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. *Plant Growth Regulation.* 43:89-92.

16. Valerie G.; Antoun H. and Tweddell R. (2004). Growth stimulation of greenhouse tomato plants by *Pseudomonas putid* and *Trichoderma atroviride*. *Proceedings 33<sup>rd</sup>. PGRSA Annual Meeting.*

17. عبود، هادي مهدي، مؤيد، رجب عبود، فلاح، حسن سعيد. (2008). الكشف عن المواد الشبيهة بالجبرلينات والأكسينات وهرمون الإيثيلين في راسخ نمو ثلاثة عزلات محلية من الفطر لفطر *Trichoderma harzianum*. *مجلة العلوم الزراعية العراقية.* 18-39:12.

18. Taiz L. and Zeiger E. (2002). *Plant Physiology.* 3<sup>rd</sup> ed. Publisher Sinauer Associates. P.: 690.

19. Dyakov YT.; Dzhavakhiya VG. and Korpele T. (2007). *Comprehensive and Molecular Phytopathology.* Elsevier Publications. P.: 483.

20. Slininger PJ.; Behle RW.; Jackson MA. and Schisler DA. (2003). Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotrop. Entomol.* 32:183-195.

21. Ahmed F.; Ahmed I. and Saghir KM. (2004). Indol acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *Fluorescent pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.* 29:29-34.

تعمل البكتيريا المحفزة للنمو PGPR بآليات عدة، منها إنتاج مواد أجنبية ومركبات عضوية، وكذلك إنتاج IAA والإنزيمات المحللة لجدران خلايا الممرض والمضادات الحيوية والهرمونات، التي يعتقد أنها تعمل على كبح الممرض (20، 21). كما أن للمجاميع الميكروبية في التربة دوراً في إنتاج الهرمونات النباتية والمركبات الشبيهة بها، وإفرازها في المحيط الجذري، وقد وجدت هذه الصفة في أجناس بكتيرية متعددة منها *Rhizobium* و *Azotobacter* و *Pseudomonas* و *Bacillus*، ومن الهرمونات المهمة المنتجة من تلك البكتيريا IAA و Cytokinin و Gibberellin والتي تسهم بدورها بشكل كبير في تطور نمو النبات والسيطرة على سائر الفعاليات الفسيولوجية المختلفة في خلايا النبات (13). لقد تمكن الباحثان (22) من خلال تحليل الوسط الذي تنمو فيه البكتيريا *A.vinelandii* وخلاياها باستخدام صفائح TLC للكشف عن السايكوكاينينيات في الحصول على ثلاثة أنواع وهي Trans-Isopentenyladenine و Isopentenyladenosine والتي لها دور كبير في تحفيز نمو العديد من النباتات.

من ناحية أخرى، أثبت إبراهيم (23) أن معاملة نباتات الفاصوليا المعاملة بالعزلات Thk20 و Thk80 و Th5 سجلت أدنى مقدار لمنظم النمو ABA 38.02 و 51.73 و 25.6 نانوغرام/غرام وزن رطب على التوالي) وتسببت العزلة Th4 في رفع مقدار ABA بواقع 57.5 % عن معاملة المقارنة، ولم يختلف تأثير العزلتين Th2، Th3 في مقدار منظم النمو ABA عن معاملة المقارنة (235.26 نانوغرام/غرام وزن رطب).

يعمل ABA على تعزيز أنشطة إنزيمات الدفاع المضادة للأكسدة من أوراق الشليك، كما أن حساسية الشليك لعوامل البيئة مثل الجفاف يمكن أن يسببها ABA عن طريق دوره في تحسين النمو الخضري ونضج الفاكهة (24). إن إصابة المجموع الجذري للنبات بالتعفن تؤدي إلى ضعف قابلية امتصاص الماء والمغذيات، ويؤدي العجز المائي إلى ارتفاع مستويات ABA الذي يعزز الشيخوخة عن طريق تسريع فقدان النيتروجين والكلوروفيل وزيادة بيروكسيد الدهون (25).

إن البكتيريا والمسببات المرضية تعتبر من العوامل الأساسية والضرورية للنمو كالمواد الغذائية وإفرازات الجذور (26، 27)، فضلاً عن مقدرة البكتيريا على إنتاج العديد من المضادات الحيوية التي تحلل سايتوبلازم الخيوط الفطرية للمسببات المرضية، وتقوم بتصنيع مواد ومركبات يحتاجها النبات بشكل ضروري ومن بينها الهرمونات النباتية (28)، وتزداد كذلك فعالية إنزيم Peroxidase والذي يؤدي إلى تقوية جدار الخلية ويحد من عملية اختراق المسببات الفطرية للأنسجة النباتية (29). وأكد Marchi وآخرون (30) انتقال البكتيريا جهازياً في الأنسجة النباتية.

#### المصادر

- Kim JS.; Kang NJ. ; Kwak Y S. and Lee C. (2017). Investigation of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using PCR-RFLP. *Plant. Pathol. J.* 33(2):140-147.
- الإبراهيم، أنور. (2002). الفريز. نشرة إرشادية 451. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. الهيئة العامة للبحوث الزراعية، إدارة بحوث البساتين. سوريا.
- السعيد، إبراهيم حسن. (2000). إنتاج الثمار الصغيرة. دار الكتب والنشر، جامعة الموصل. العراق.
- USDA. (2006). National Nutrient database for standard. Available at: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4857?form=Fulltext>
- طه، شلير محمود، خورشيد، بهرام. (2004). استجابة أربعة أصناف من الشليك للظروف البيئية في حقل كرده ره شه/ أربيل. *مجلة زانكو.* 16(5): 41-29. العراق.
- Fang XL.; Phillips DLH.; Sivasithamparam K. and Barbetti MJ. (2011). Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in Western Australia. *J. Austr. Plant. Pathol.* 40 (2):109-119.

22. Taller BJ. and Tit-Yee W.(1988). Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* culture medium. American Society for Microbiology. P.:266.

23. إبراهيم، بسام يحيى. (2009). استحداث طرز إحيائية من أنواع الفطر *Trichoderma* لتحسين كفاءتها كعوامل للمكافحة الإحيائية وتحفيز صفات نمو النبات. أطروحة دكتوراه. قسم وقاية النبات، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

24. Shu-cheng XU. and Di-hui F. (2007). Effects of ABA and Ca<sup>2+</sup>-CaM on antioxidant defense enzyme systems of strawberry leaves. J. Fuyang. Teach. College (Natural Science). 2007-02.

25. Chai Y.; Jia H.; Li C.; Dong Q. and Shen Y. (2011). FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. J. Exp. Bot. 62(14): 5079-5089.

26. Verma JP.; Yadav J. and Tiwari KN.(2009). Effect of meosorhizobium and plant growth promoting rhizobacteria on nodulation and yields of chickpea. Biol. Forum. Annal. Int. J. 1:11-14.

27. Verma JP.; Yadav J.; Tiwari KN.; Lavakush S. and Singh V. (2010). Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. Int. J. Agric. Res. 11:954-983.

28. Mali GV. and Bodhankar MG. (2009). Antifungal and phytohormone production potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from Groundnut (*Arachis hypogea* L.). Asian. J. Exp. Sci. 23(1):293-297.

29. Faize M.; Faize L.; Koike N.; Ishizaka M. and Ishii H. (2004). Acibenzolar S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. J. Phytopathol. 94(604):(Abs.).

30. Marchi G.; Mori B.; Pollacci P.; Mencuccini M. and Surico G. (2009). Systemic spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive explants. Plant Pathol. 58 :152-158.

## دور السيلينيوم في تحمل نبات الباقلاء *L. Vicia faba* للإجهاد الملحي

أمل غانم محمود القزاز، رهف وائل محمود عطار باشي، إيمان حسين هادي الحياتي، سهاد سعد يحيى

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم / جامعة بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: amelkazzaz61@gmail.com

### الملخص باللغة العربية

أجريت تجربة أصص في الحديقة النباتية التابعة لقسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم / جامعة بغداد خلال موسم النمو 2015-2016. هدفت التجربة إلى دراسة تأثير تعريض نبات الباقلاء *L. Vicia faba* للإجهاد الملحي بتركيزات من كلوريد الصوديوم (0، 50، 100، 150 ملليمول لتر<sup>-1</sup> مع رش جزئه الخضري بتركيز من السيلينيوم (0، 10، 20) ملغم لتر<sup>-1</sup> ودراسة التداخل بين العاملين في بعض المؤشرات المظهرية والفسلجية للنبات.

أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في مؤشرات النمو المدروسة بتأثير زيادة تركيز كلوريد الصوديوم مع وجود زيادة معنوية في مؤشرات النمو نفسها بعد رشها بالسيلينيوم، أما التداخل بين العاملين فكان تأثيره واضحاً، إذ تمكن التركيز 10 ملغم لتر<sup>-1</sup> سيلينيوم من خفض التأثير السلبي لكلوريد الصوديوم 150 ملليمول لتر<sup>-1</sup> وأعطى أفضل القيم لمؤشرات النمو، عدد التفرعات، قطر الساق، الوزن الجاف، معدل النمو المطلق، النسبة المئوية للنمو النسبي، ومحتوى الكلوروفيل الكلي، في حين أعطى التداخل بين التركيز 20 ملغم لتر<sup>-1</sup> سيلينيوم والتركيز 150 ملليمول لتر<sup>-1</sup> كلوريد الصوديوم أقل انخفاض في فعالية إنزيمي Superoxide dismutase و peroxidase.

**الكلمات المفتاحية:** الإجهاد الملحي، سيلينيوم، نبات الباقلاء

## Role of selenium in tolerance of broad bean plant *Vicia faba* L. to salinity stress

Amal G. M. Al- Kazzaz, Rahaf W. M. Atarbashi, Eman H. H. Al-hayani and Suhad S. Yahya

Dept. of Biology / College of Education for Pure Sciences – Ibn Al- Haitham / University of Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

An experiment was conducted by using pots in the botanical garden, College of Education Ibn Al-Haitham, University of Baghdad, during the growing season 2015-2016. The experiment aimed to study the effect of exposition broad bean plant *Vicia faba* L. to salinity stress using sodium chloride concentrations (0, 50, 100, 150) mM.L<sup>-1</sup> and spraying vegetative part with Selenium (0, 10, 20) mg.L<sup>-1</sup> and interactions for both factors on some plants morphological and physiological parameters.

Results indicated that the increase of Sodium chloride concentrations caused significant decreases in plant growth parameters studied, as well as there was significant increases in the same growth parameters after spraying with selenium.

Results for the interactions for both factors indicated that the concentration 10mg.L<sup>-1</sup> Selenium minimized the adverse effect of 150 mM.L<sup>-1</sup> Sodium chloride and gave the best values for No. of branches.plant<sup>-1</sup>, stem diameter, dry weight, absolute growth rate, the relative growth rate, total chlorophyll content, while the interaction of concentration 20 mg.L<sup>-1</sup> selenium and 150 mM.L<sup>-1</sup> sodium chloride gave lower decline in the activity of enzymes peroxidase and Superoxide dismutase.

## المقدمة

صممت التجربة وفق التصميم العشوائي الكامل Complety CRD Design Randomized بثلاثة مكررات بحيث أصبح عدد الوحدات التجريبية 36 إصيصاً. تم إحضار التربة من موقع الحديقة النباتية بعد نخلها وتنعيمها. ثم تم تعبئتها في الأصص الفخارية بسعة 10 كغم/تربة.

زرعت بذور نبات الباقلاء بتاريخ 2015/11/2 بعدد ثمان بذرات لكل إصيص وتم إرواؤها بالماء وصولاً إلى 50% من السعة الحقلية كرية أولى، وبعد مرور أسبوعين من تاريخ الزراعة، خفت النباتات إلى خمسة نباتات لكل وحدة تجريبية، واستمرت عمليات الإرواء وإزالة الإدعال لحين انتهاء مدة التجربة.

رويت الأصص بالتراكيز الملحية ثلاث مرات، إذ كانت أول رية بتاريخ 2015/12/6، الرية الثانية 2015/12/8 والرية الأخيرة 2015/12/10. تم رش النباتات بتراكيز السيلينيوم بتاريخ 2015/12/13 صباحاً وحتى البلل الكامل. أخذت نبات واحد من كل وحدة تجريبية بعد مرور 57 يوماً من تاريخ الزراعة كمعد أول ورمز له H<sub>1</sub> - 57، وتم دراسة بعض مؤشرات النمو الخضري وكالاتي:

1- عدد التفرعات/نبات<sup>1</sup>

2- قطر الساق

تم تخفيف العينة النباتية بمجفف كهربائي وعلى درجة حرارة 65 درجة مئوية ولحين ثبات الوزن وتم حساب الوزن الجاف لها. كما تم أخذ نبات آخر وبنفس الموعود وذلك لتقدير فعالية إنزيم Superoxid Dismutase (SOD) حسب طريقة (16)، وإنزيم Peroxidase (POD) حسب طريقة (17). تم تقدير محتوى الكلوروفيل الكلي باستعمال جهاز SPAD، وذلك باخذ معدل أربع قراءات لأربع أوراق عشوائية من كل معاملة. وبعد مرور 78 يوماً من تاريخ الزراعة، تم أخذ نبات واحد كمعد ثان، ورمز له H<sub>2</sub> - 78. وتم تخفيفه كما في الموعود الأول وحساب الوزن الجاف له، ودرست بعض صفات النمو التالية:

1- نسبة النمو النسبي %: حسب لكلا الموعدين وفق المعادلة التالية (18):

$$\text{نسبة النمو النسبي} \% = \frac{\text{الوزن الجاف لأي معاملة} - \text{الوزن الجاف لأعلى معاملة}}{\text{الوزن الجاف لأعلى معاملة}} \times 100$$

2- معدل النمو المطلق غم/يوم<sup>1</sup>: حسب وفق المعادلة التالية (19):

$$\text{Absolute Growth Rate} = \frac{W_2 - W_1}{T_2 - T_1}$$

حيث يمثل W<sub>2</sub>، W<sub>1</sub> معدل الوزن الجاف (غم) للجزء الخضري للموعود الأول والثاني.

T<sub>2</sub>، T<sub>1</sub>: عمر النبات (يوم) عند الموعود الأول والثاني.

تم تحليل النتائج حسب البرنامج الإحصائي (20)، وقورنت المتوسطات باستعمال أقل فرق معنوي تحت مستوى احتمال 0.05.

## النتائج والمناقشة

تبين نتائج الجدول رقم (1) وجود انخفاض معنوي في متوسط صفتي عدد التفرعات/نبات<sup>1</sup>، وقطر الساق عند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم من صفر إلى 150 ملليمول/لتر<sup>1</sup> وبنسبة انخفاض (30.29، 23.08) % للصفتين على التوالي، في حين كان هناك زيادة في متوسط الصفتين عند رفع تركيز السيلينيوم من صفر إلى 20 ملغم/لتر<sup>1</sup>، وبنسبة زيادة (7.69، 28.89) % للصفتين على التوالي. أما التداخل فكان تأثيره معنوياً، إذ تمكن التركيز 10 ملغم/لتر<sup>1</sup> سيلينيوم من رفع قيمة الصفتين عند التركيز العالي لكلوريد الصوديوم 150 ملليمول/لتر<sup>1</sup> وبلغت 3.50، 0.70 للصفتين مقارنة مع قيمها عند تركيز صفر سيلينيوم، 150 ملليمول/لتر<sup>1</sup> لكلوريد الصوديوم، والتي كانت 2.50، 0.30 على التوالي.

يعد نبات الباقلاء من نباتات العائلة البقولية Fabaceae، يزرع في العالم بموعدين أحدهما شتوي والآخر ربيعي، وهو نبات ذو جذر وتدي تنفرع منه جذور ثانوية ذات عقد بكتيرية، ساقه قائمة مضلعة جوفاء، أوراقه مركبة بيضاوية متبادلة، وأزهاره بيضاء ذات بقع سوداء، وثمرة قرنفة (1).

تعد الملوحة من أكثر الجهود البيئية التي تؤثر سلباً في نمو النبات، إذ تؤدي إلى حدوث سلسلة من التغيرات المظهرية، الفسيولوجية والبيوكيميائية والجزيئية (2). ويرجع ذلك إلى تأثيرها الأسموزي الضار والنتاج عن زيادة تجمع الأيونات الضارة في أنسجة النبات والمؤدية إلى موته (3)، وهي من الجهود البيئية اللاحيوية التي تؤدي إلى حدوث جهود تأكسدية وذلك لاختلال التوازن بين أنواع الجذور الفعالة ROS Reactive oxygen species)، وبين الجهاز الدفاعي الداخلي والمتمثل بمضادات الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية (4). هذه الجذور تؤثر سلباً، إذ تؤكسد الدهون والأحماض النووية، وتثبط بناء البروتينات وإنزيمات البلاستيدات مما يؤثر في خفض بناء الصبغات الكلوروفيلية، كما تؤثر في إضعاف سلسلة نقل الإلكترونات وتزيد من نفاذية الأغشية الخلوية (5). وبناء على ذلك، ينخفض نمو النبات بشكل عام. والنبات له القدرة على التحمل ومواجهة الجهد البيئي القاسي المتمثل بزيادة ملوحة وسط النمو ويختلف مقدار تحمله باختلاف النبات (6)، إذ يتمكن النبات من تحفيز آليات الدفاع المتمثلة بمضادات الأكسدة الإنزيمية مثل إنزيم Superoxid Dismutase (SOD) و Catalase (CAT) و Glutathione peroxidase (GSH-PX) ومضادات الأكسدة غير الإنزيمية مثل الكلوتاثيون، حامض الأسكوربيك وحامض البرولين (7).

يعد السيلينيوم من العناصر المهمة لنمو النبات، بعد أن كان ضمن العناصر السامة (8). يعتمد محتواه في التربة على صيغته الكيميائية، pH وسط التربة، الجهد التأكسدي redox potential، المادة العضوية، التنافس بين الأيونات وفعالية الأحياء المجهرية (9). في التربة القاعدية يكون السائد هو صيغة Selenate<sup>2-</sup>SeO<sub>4</sub>، في حين في التربة الحامضية والمتعادلة فإن صيغته الكيميائية هي Selenite<sup>2-</sup>SeO<sub>3</sub> (10)، لذا فعندما يكون Selenate هو مصدر السيلينيوم فإن الأخير يتحضر نظه من الجذور إلى الساق (11). ولكن عندما يكون Selenite هو المتوفر فإن السيلينيوم يحتجز في الجذور ولا ينقل إلى الساق (12). يؤثر السيلينيوم في تنظيم مضادات الأكسدة ويعمل على قنص الجذور الفعالة وإعادة تنظيم مستوياتها، لذلك فإنه يعتبر المفتاح في ميكانيكية مواجهة الجهود البيئية حيث يؤثر في خفض إنتاج جذر السوبر أوكسيد الضار O<sub>2</sub><sup>-</sup> وتحويله إلى H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (13) فهو يساهم في زيادة فعالية مضادات الأكسدة الإنزيمية مثل إنزيم Superoxid Dismutase SOD ومضادات الأكسدة غير الإنزيمية والمتمثلة بالكلوتاثيون GSH وحامض الأسكوربيك ASA مما يؤدي إلى زيادة تحمل النبات للجهد التأكسدي (14). وقد لوحظت زيادة في نمو نبات فول الصويا Soybean المعرض إلى إجهاد بيئي تأكسدي، إذ أحدث تأثيراً في زيادة مضادات الأكسدة وعزز النظام الدفاعي للنبات وبذلك حفز نمو البادرات التي تعرضت إلى شيوخة مبكرة (15).

ونظراً لزيادة الملوحة في الأراضي الزراعية العراقية ولأهمية نبات الباقلاء الاقتصادية، أجريت هذه الدراسة لمعرفة التركيز الأمثل للسيلينيوم لكونه من مضادات الأكسدة غير الإنزيمية والذي له القدرة على زيادة تحمل النبات للتركيزات العالية لكلوريد الصوديوم.

## المواد وطرق العمل

تم إجراء تجربة باستعمال أصص فخارية في الحديقة النباتية التابعة لقسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم / جامعة بغداد خلال موسم النمو (2015-2016)، وذلك لمعرفة تأثير إجهاد الملوحة والرش بعنصر السيلينيوم على بعض مؤشرات النمو لنبات الباقلاء. تضمنت التجربة العوامل التالية:-

1- ثلاثة تراكيز من ملح كلوريد الصوديوم (50، 100، 150) ملليمول/لتر<sup>1</sup> فضلاً عن معاملة السيطرة.

2- تركيزان من عنصر السيلينيوم (10، 20) ملغم/لتر<sup>1</sup> فضلاً عن معاملة السيطرة.

جدول رقم (1): تأثير تركيز كلوريد الصوديوم والسيلينيوم في عدد التفريعات، نبات<sup>1</sup> وقطر المساق (ملم)

تركيز السيلينيوم (ملغم. لتر <sup>-1</sup> )	تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )				متوسط تأثير السيلينيوم	عدد التفريعات، نبات <sup>1</sup>				متوسط تأثير السيلينيوم
	150	100	50	0		150	100	50	0	
0	0.30	0.45	0.50	0.55	3.25	2.50	3.50	3.50	5.03	0
10	0.70	0.75	0.55	0.65	3.50	3.50	3.50	4.00	3.00	10
20	0.50	0.50	0.55	0.75	3.50	2.00	3.00	4.00	5.00	20
متوسط تأثير كلوريد الصوديوم	0.50	0.57	0.53	0.65		2.67	3.33	3.83	3.83	
LSD (0.05)	تركيز السيلينيوم = 0.83 تركيز كلوريد الصوديوم = 1.00 التداخل = 1.67					تركيز السيلينيوم = 0.14 تركيز كلوريد الصوديوم = 0.16 التداخل = 0.28				

التداخل تأثيراً معنوياً، إذ تمكن التركيز 10 ملغم. لتر<sup>-1</sup> سيلينيوم من خفض التأثير الضار للتركيز 150 مليمول لتر<sup>-1</sup> كلوريد الصوديوم وبلغت القيم 2.11، 2.62 غم للموعدين على التوالي، مقارنة مع قيمها عند التركيز صفر سيلينيوم، 150 مليمول. لتر<sup>-1</sup> والتي كانت 1.22، 2.17 غم للموعدين على التوالي.

من ناحية أخرى، بينت نتائج الجدول رقم (2) بأن زيادة تركيز كلوريد الصوديوم من صفر إلى 150 مليمول. لتر<sup>-1</sup> أثرت في انخفاض متوسط الوزن الجاف ونسبة انخفاض 39.06% للموعد الأول H<sub>1</sub>-57 و 34.23% للموعد الثاني H<sub>2</sub>-78. كما تبين بأن رش النباتات بالسيلينيوم أدى إلى زيادة في متوسط الوزن الجاف ونسبة زيادة (23.67، 36.22)% للموعدين الأول والثاني. وأعطى

جدول رقم (2): تأثير تركيز كلوريد الصوديوم والسيلينيوم في الوزن الجاف (غم)

تركيز السيلينيوم (ملغم. لتر <sup>-1</sup> )	تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )				متوسط تأثير السيلينيوم	تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )				متوسط تأثير السيلينيوم
	150	100	50	0		150	100	50	0	
0	2.17	2.96	3.06	3.13	1.96	1.22	1.72	2.28	2.60	0
10	2.62	3.38	3.66	3.79	2.39	2.11	2.20	2.31	2.94	10
20	2.54	3.50	3.75	4.22	2.67	2.09	2.23	2.98	3.37	20
متوسط تأثير كلوريد الصوديوم	2.44	3.28	3.49	3.71		1.81	2.05	2.52	2.97	
LSD (0.05)	تركيز السيلينيوم = 0.16 تركيز كلوريد الصوديوم = 0.18 التداخل = 0.32					تركيز السيلينيوم = 0.12 تركيز كلوريد الصوديوم = 0.14 التداخل = 0.24				

لتر<sup>-1</sup> من إعطاء أعلى نسبة زيادة، حيث بلغت 12.20%. أما التداخل فكان تأثيره واضحاً، حيث تمكن التركيز 10 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من خفض تأثير كلوريد الصوديوم عند تركيزه العالي 150 مليمول. لتر<sup>-1</sup> وبلغت قيمته 0.024 غم. يوم.

أكدت نتائج الجدول رقم (3) وجود انخفاض في متوسط صفة معدل النمو المطلق عند رفع تركيز كلوريد الصوديوم من صفر إلى 150 مليمول. لتر<sup>-1</sup> ونسبة انخفاض 48.79%، وأن الرش السورقي بالسيلينيوم أثر في زيادة متوسط الصفة، إذ تمكن التركيز 10 ملغم

جدول رقم (3): تأثير تركيز كلوريد الصوديوم والسيلينيوم في معدل النمو المطلق (غم. يوم)

تركيز السيلينيوم (ملغم. لتر <sup>-1</sup> )	تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )				متوسط تأثير السيلينيوم
	150	100	50	0	
0	0.045	0.059	0.037	0.025	0
10	0.024	0.056	0.064	0.040	10
20	0.021	0.060	0.037	0.041	20
متوسط تأثير كلوريد الصوديوم	0.021	0.060	0.037	0.041	
LSD (0.05)	تركيز السيلينيوم = 0.004 تركيز كلوريد الصوديوم = 0.005 التداخل = 0.009				

الصوديوم، وبلغت قيمته 62.61، 62.09 مقارنة مع القيم عند التركيز سيلينيوم والتركيز نفسه من كلوريد الصوديوم والتي بلغت 36.20، 51.42 غم للموعدين على التوالي.

أظهرت النتائج في الجدول رقم (4) وجود انخفاض في نسبة النمو النسبي % والذي ارتبط بانخفاض الوزن الجاف، حيث انخفض متوسط الصفة بنسبة انخفاض (39.17، 34.20)% للموعدين الأول والثاني، وذلك عند رفع تركيز كلوريد الصوديوم من صفر إلى 150 مليمول. لتر<sup>-1</sup>، وأن الرش بالسيلينيوم أثر في زيادة متوسط الصفة ونسبة زيادة (36.46، 23.77)% للموعدين على التوالي، وذلك بعد رفع تركيز السيلينيوم من صفر إلى 20 ملغم. لتر<sup>-1</sup>. أما التداخل فكان تأثيره معنوياً، إذ تمكن التركيز 10 ملغم. لتر<sup>-1</sup> سيلينيوم من خفض التأثير السلبي للتركيز العالي 150 مليمول. لتر<sup>-1</sup> لكلوريد

جدول رقم (4): تأثير تركيز كلوريد الصوديوم والسيلينيوم في نسبة النمو النسبي (%)

تركيز السيلينيوم (ملغم. لتر <sup>-1</sup> )	تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )				تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )					
	H <sub>2</sub> – 78				H <sub>1</sub> – 57					
	متوسط تأثير السيلينيوم	150	100	50	0	متوسط تأثير السيلينيوم	150	100	50	0
0	67.06	51.42	70.14	72.51	74.17	58.01	36.20	51.04	67.66	77.15
10	79.68	62.09	80.09	86.73	89.81	70.92	62.61	65.28	68.55	87.24
20	83.00	60.19	82.94	88.86	100.00	79.16	62.02	66.17	88.43	100.00
متوسط تأثير كلوريد الصوديوم		57.90	77.72	82.70	87.99		53.61	60.83	74.88	88.13
LSD (0.05)	تركيز السيلينيوم = 3.52 تركيز كلوريد الصوديوم = 4.06 التداخل = 7.03					تركيز السيلينيوم = 3.75 تركيز كلوريد الصوديوم = 4.33 التداخل = 4.50				

وجود حالة الإجهاد التأكسدي. أما التداخل بين العاملين فقد تمكن التركيز 20 ملغم لتر<sup>-1</sup> سيلينيوم من إعطاء أقل انخفاض في فعالية الإنزيمين عند التركيز العالي لكلوريد الصوديوم 150 ملغم لتر<sup>-1</sup> وبلغت 4.34، 14.66 وحدة مل<sup>-1</sup> للإنزيمين على التوالي، مقارنة مع التركيز صفر سيلينيوم والتركيز 150 ملغم لتر<sup>-1</sup> كلوريد الصوديوم والتي بلغت 10.95، 20.14 وحدة مل<sup>-1</sup>.

أما نتائج الجدول رقم (5)، فقد أشارت بوجود زيادة معنوية في إنزيمات الدفاع المتمثلة بـإنزيمي Peroxidase (POD) و Superoxid dismutase (SOD) وذلك عند زيادة الجهد التأكسدي عند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم من صفر إلى 150 ملغم لتر<sup>-1</sup>، حيث أدى إلى زيادة في فعالية الإنزيمين بنسبة (102.18، 140.89) %، في حين كان هناك انخفاض في فعالية الإنزيمين عند الرش بالسيلينيوم ورفع تركيزه من صفر إلى 20 ملغم لتر<sup>-1</sup> وبنسبة انخفاض (26.23، 47.32) %، وذلك لعدم

جدول رقم (5): تأثير تركيز كلوريد الصوديوم والسيلينيوم في فعالية إنزيمي POD، SOD (وحدة مل<sup>-1</sup>)

تركيز السيلينيوم (ملغم. لتر <sup>-1</sup> )	تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )				تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )					
	SOD				POD					
	متوسط تأثير السيلينيوم	150	100	50	0	متوسط تأثير السيلينيوم	150	100	50	0
0	15.44	20.14	16.69	13.98	10.96	7.65	10.95	7.01	6.96	5.67
10	11.47	15.23	13.77	10.55	6.32	4.57	7.34	5.34	4.00	1.59
20	11.39	14.66	12.21	11.23	7.47	4.03	4.34	4.00	5.67	2.12
متوسط تأثير كلوريد الصوديوم		16.68	14.22	11.92	8.25		7.54	5.45	5.54	3.13
LSD (0.05)	تركيز السيلينيوم = 2.15 تركيز كلوريد الصوديوم = 2.48 التداخل = 4.30					تركيز السيلينيوم = 1.12 تركيز كلوريد الصوديوم = 1.29 التداخل = 2.23				

نسبة زيادة عند رفع التركيز من صفر إلى 10 ملغم لتر<sup>-1</sup> للسيلينيوم وبلغت 11.74 % . أما التداخل فكان له تأثير، إذ تمكن التركيز 10 ملغم لتر<sup>-1</sup> سيلينيوم من رفع قيمة الصفة عند التركيز العالي لكلوريد الصوديوم 150 ملغم لتر<sup>-1</sup> والتي بلغت 52.10 مايكرو غرام .سم<sup>-1</sup> مقارنة مع التركيز صفر سيلينيوم والتركيز 150 ملغم لتر<sup>-1</sup> كلوريد الصوديوم والتي بلغت 48.00 مايكرو غرام .سم<sup>-1</sup>

أما محتوى الكلوروفيل الكلي، فقد أشارت نتائج الجدول رقم (6) إلى وجود انخفاض معنوي في متوسط الصفة عند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم من صفر إلى 150 ملغم لتر<sup>-1</sup> وبنسبة انخفاض 11.61 % . في حين كان هناك زيادة في متوسط محتوى الكلوروفيل الكلي عند رفع تركيز السيلينيوم من صفر إلى 20 ملغم لتر<sup>-1</sup> وبلغت أعلى

جدول رقم (6): تأثير تركيز كلوريد الصوديوم والسيلينيوم في محتوى الكلوروفيل الكلي (مايكرو غرام .سم<sup>-1</sup>)

تركيز السيلينيوم (ملغم. لتر <sup>-1</sup> )	تركيز كلوريد الصوديوم (مليمول. لتر <sup>-1</sup> )				متوسط تأثير السيلينيوم
	0	50	100	150	
0	53.08	51.74	50.62	48.00	50.86
10	62.55	58.76	53.91	52.10	56.83
20	56.23	54.45	49.16	51.79	52.91
متوسط تأثير كلوريد الصوديوم	57.28	54.99	51.23	50.63	
LSD (0.05)	تركيز السيلينيوم = 4.86 تركيز كلوريد الصوديوم = 5.62 التداخل = 9.73				

تنخفض كفاءة البناء الضوئي مؤثرة بذلك في خفض نمو النبات وبالتالي خفض المادة الجافة (22). يساهم السيلينيوم في خفض عجز الماء عن طريق زيادة كفاءة الثغور وزيادة كفاءة النظام الصبغي الثاني PSII، مما يؤكد دوره في التنظيم المائي (23). إن دعم السيلينيوم لكفاءة الثغور يؤدي إلى زيادة امتصاص وتثبيت CO<sub>2</sub>، وبذلك يدعم عملية البناء الضوئي، ليس فقط في النبات المعرض للإجهاد وإنما في النبات الذي ينمو في الظروف الطبيعية. كما يعمل على قنص والتخلص من أنواع الأوكسجين الفعالة ROS والتي زاد إنتاجها بتأثير الإجهاد التأكسدي

بملاحظة نتائج الجداول السابقة، فإن هناك وجود انخفاض معنوي في مؤشرات نمو النبات بتأثير الملوحة، حيث أثرت في خفض فعالياته الحيوية، لكن النبات يواجه هذه التغيرات بخلق ثغوره كخطوة أولى للحد من فقد الماء عن طريق عملية النتج، وبذلك يحافظ على المحتوى المائي للخلايا (2). تؤثر عملية غلق الثغور في خفض عملية انتشار CO<sub>2</sub> المهم في عملية البناء الضوئي، وبذلك تنخفض نسبة تنبئته (21)، وتتأثر إنزيمات دورة كالفن مما يحدث انخفاضاً في إنتاج NADP<sup>+</sup> وزيادة في غنتاج الطاقة المحفزة والمثارة والتي تؤدي إلى تخريب النظام الضوئي وزيادة في إنتاج ROS، وبذلك

11. Mehdi Y.; Hornick JL.; Istasse L. and dufrasne I. (2013). Selenium in the environment metabolism and involvement in body functions. *Molecules*. 18: 3292- 3311.
12. Li HF.; Mcgrath SP. and Zhao FJ. (2008). Selenium uptake translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist*. 178:92-102.
13. Mroczek-Zdyrska M. and Wojcik M. (2012). Influence of Selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *vicisfaba* L. Minor plant. *Biol. Trace. Elem. Res.* 147:320- 328.
14. Ibrahim HM. (2014). Selenium pretreatment regulates the antioxidant defense system and reduces the oxidative stress on drought stressed wheat *Triticumaestivum* L. plants. *Asian J. Plant. Sci.* 13: 120-128.
15. Djanaguiraman M.; Devi DD.; Shanker AK.; Sheeba A. and Bangarusamy U. (2005). Selenium an antioxidative protectant in soybean during Senescence. *Plant. Soil*. 272: 77-86.
16. Beyer WF. and Fridovich I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity:some large consequences of minor changes conditions. *Anal. Bio. Chem.* 161:559-566.
17. Nezh M. (1985). The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *Food. Agric.* 36:877-880.
18. Daughtrey ZW.; Gilliam JW. and Kamprath BJ. (1973). Phosphorus supply characteristics and organic soil measured by absorption and mineralization. *Soil. Sci.* 11:18-24.
19. Hunt R. (1978). *Plant Growth Analysis Studies in Biol.* (96), Edward Arnold. (Pub 1.) Ltd. London.
20. SAS. (2010). Statistical Analysis System. User's Guide for personal computers release 9.1. SAS. Institute Inc. Cary and N.C. USA.
21. Yordanov V.; Velikova T. and Sonev V. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant. Physiol. Special Issue.* 187-206.
22. Hajiboland R. and Sadeghzade N. (2014). Effect of selenium supplementation on CO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> assimilation under low and adequate nitrogen supply in wheat *Triticumaestivum* L.. *Photosynt.* 52(4):501-510.
23. Tadina N.; Germ M.; Kreft I.; Breznik B. and Gaberscik A. (2007). Effect of water deficit and selenium on common buck wheat *Fagopyrum esculentum* Moench. *Plant. Photosynt.* 45:472-476.
24. Hajiboland R.; Sadeghzadeh N. and Sadeghzadeh B. (2014). Effect of se application on photosynthesis, osmolytes and water relations in two drum wheat *Triticum drum* L. genotypes under drought stress. *Actaagric. Sloven.* 103(2): 167-179.
25. Habibi G. (2013). Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley. *Actaagric. Sloven.* 101(1): 31-39.

(24). إن التخلص من ROS يؤدي إلى حماية وإدامة عضيات جهاز البناء الضوئي التي أصابها التلف نتيجة لتعرضها للإجهاد، ويساهم أيضا في موازنة أنظمة الدفاع المتمثلة بزيادة فعالية مضادات الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية (25). فإذا كان الإجهاد بمستوى قليل، فإن سعة ومقدرة مضادات الأكسدة تتحضر بوجود السيلينيوم وتكون كافية لصد الضرر الحاصل، إذ يعد إنزيم كلوتاثيون بيروكسيداز GSH-PX الأول الذي يتحضر بوجود السيلينيوم والذي يتمكن من قنص O<sub>2</sub><sup>-</sup> وتحويله إلى H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> دون الحاجة إلى إنزيمات الدفاع مثل SOD، POD، لكن في حالة التعرض إلى جهد بيئي قاس، فإن مستويات ROS تكون عالية، وخاصة جذر السوبر أوكسيد O<sub>2</sub><sup>-</sup> لذلك فإن هناك حاجة ماسة لزيادة فعالية إنزيم SOD من أجل التخلص من إنتاج ROS الفائض (26). إن زيادة تركيز السيلينيوم ضمن المستوى المطلوب أدت إلى زيادة في المحتوى الداخلي لإنزيمات الدفاع والمقتنصة للجذور الحرة والتي سوف ينخفض محتواها الداخلي في أنسجة النبات، وبذلك يكون هناك انخفاض تدريجي في فعالية إنزيمات الدفاع (27).

#### المصادر

1. علي، حميد جلوب، عيسى، طالب أحمد، جددان، حامد محمود. (1990). محاصيل البقول. جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق ص: 79-103.
2. Chaves MM.; Flexas J. and Pinheiro C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress : regulation mechanism : from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103:551-560.
3. Benlloch- Gonzalez M.; Fournier J.; Ramos J. and Benlloch M. (2005). Strategies underlying salt toleranc in halophytes are present in *Cynaracardunculus*. *Plant. Sci.* 168: 653-659.
4. Sharma P.; Iha AB.; Dubey RS. and Pessarakli M. (2012). Reactive oxygen species. Oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 1- 26.
5. Habibi G. and Hajiboland R. (2011). Comparison of water strees and UV radiation effects on the induction of CAM and antioxidative defense in the succulent *Rasularia elymaitica* (crassulaceae). *Acta. Biol. Cracov. Bot.* 53:7-15.
6. Rabie GH. and Almadini AM. (2005). Role of bioinoculants in development of salt – tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *Afr. J. Biotechnol.* 4:210-222.
7. Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their function. *Plant. Physiol.* 141(2):391-396.
8. Schwarz K. and Foltz CM. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 70:3292-3293.
9. Hayrylak- Nowak B.; Matraszek R. and Pogorzelec M. (2015). The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth. Selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Actaphysiol.* 37-41.
10. Zhu YG.; Pilon- Smits EAH.; Zhao FJ.; Williams PN. and Mehary AA. (2009). Selenium in higher plants: under standing mechanisms for biofortication and phytoremediation. *Trends. Plant. Sci.* 14: 436-442.

26. Hartikainen H.; Hue TL. and Piironen V. (2000). Selenium as an antioxidant and oxidant in ryegrass. *Plant. Soil.* 225: 193-200.
27. Kong L.; Wang M. and Bi D. (2005). Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress. *Plant. Growth. Regul.* 45:155-163.

## التأثير المضاد لبعض المركبات السمادية الحاوية على العناصر الصغرى ومستخلص الثوم على المسبب المرضي *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

سعد الدين شمس الدين سعد الدين، ألحان هاشم شيت، أحمد رحيم ناصر، سيف أحمد عبد الرزاق، نجاة عدنان سعد

قسم بحوث وقاية المزروعات / دائرة البحوث الزراعية / بغداد / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: saadaldin\_iq@yahoo.com

### الملخص باللغة العربية

جرى تنفيذ هذه الدراسة في مختبر أمراض النبات، قسم بحوث وقاية المزروعات في دائرة البحوث الزراعية في مدينة بغداد، وذلك بهدف التعرف إلى التأثيرات الضد فطرية Antifungal Effect لبعض المركبات السمادية الحاوية على العناصر الصغرى مثل كبريتات الحديدوز والمائية وكبريتات النحاس المائية وكبريتات الخارصين المائية مع مستخلص الثوم ضد المسبب المرضي *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. وكما هو صديق للبيئة.

أظهرت النتائج أن تلك المواد تأثيراً مثبطاً متفاوتاً للنمو الفطري للفطر *M. phaseolina*، فقد بلغ مقدار التثبيط لكل من كبريتات الحديدوز و كبريتات النحاس و كبريتات الخارصين و مستخلص الثوم عند تركيز 1000 جزء بالمليون 73.61 % و 80.28 % و 75.10 % ولمستخلص الثوم 66.66 %، كما تثبط تلك المواد تكوين الأجسام الحجرية لهذا الفطر و تقلل أعدادها، إذ منعت المركبات السمادية تلك منعا تاما تكوين الأجسام الحجرية عند التركيز 1000 جزء بالمليون، في حين كان معدل عدد الأجسام الحجرية في مستخلص الثوم 6.5 جسم حجري تحت القوى الصغرى للمجهز المركب، كما تبين تأثير تلك المركبات المثبط لحيوية الفطر، إذ زادت حيوية الفطر الضعف بزيادة التركيز المستخدم وصولاً إلى تركيز 1000 جزء بالمليون. وقد بلغت حيوية الفطر في معاملة كبريتات الحديدوز 1.52 و لمستخلص الثوم 1.71، وفي معاملة المقارنة 4.59، و كذلك أدت كبريتات النحاس و كبريتات الخارصين إلى إحداث انحسار كبير لحيوية الفطر بلغ 1.09 و 1.44 على التوالي في حين كانت حيوية الفطر في معاملة المقارنة 3.38. في حين لم يكن لتلك المركبات السمادية و مستخلص الثوم أي تأثير سلبي في إنبات بذور زهرة الشمس.

**الكلمات المفتاحية:** التأثيرات الضد فطرية، كبريتات الحديدوز المائية، كبريتات النحاس المائية، كبريتات الخارصين المائية، مستخلص الثوم.

## Antifungal effect of some fertilizer compounds containing trace elements and garlic extract on the pathogen *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid

Saadaldin Shamsaldin Saadaldin, Alhan H. Sheet and Ahmed R. Nasir

Dept. of Plant Protection / Directorate of Agricultural Research / Baghdad / Republic of Iraq

### ABSTRACT

This study was carried out in the laboratory of plant pathology / Plant Protection Researches Department, State board of Agricultural Researches, Baghdad to find out the impact of Antifungal effects of some fertilizer compounds containing trace elements such as aqueous ferrous sulfate and aqueous copper sulfate and aqueous Zinc sulfate with garlic extract against the pathogen *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid, as well as its influence on environment as environmental friendly materials.

The results showed that those compounds have a disincentive uneven impact on the radial growth of fungus *M. phaseolina*, it observed that amount of inhibition for each of ferrous sulfate, copper sulfate, zinc sulfate and garlic extract at a concentration of 1000 ppm was 73.61%, 80.28%, 75.10% and 66.66% respectively. Furthermore those compounds show an inhibitory effect on the production of sclerotia of this fungus and consequently minimize their numbers. These compounds have blocked the production of sclerotia at 1000 ppm, while the number of sclerotia in garlic extract was 6.5 under low power field.

Another effect of these compounds was on the fungal vigour, it was observed that as the fungal vigour decreased with increasing the concentration at 1000 ppm. When treating the fungus with ferrous sulfate and garlic extract, the fungus vigour was 1.52 and 1.74 respectively. While in the control treatment was 4.59.

Similarly, copper sulfate and zinc sulfate treatments resulted in a significant reduction in fungus vigour, the observed vigour was 0.275 and 1.460, respectively, while the vigour of fungus in the control treatment was 3.38. Finally, these compounds and the garlic extract treatments did not show any adverse effect on the germination of sunflower seeds.

## المقدمة

150 ، 200 ، 250 ، 300 ، 350 ، 400 ، 450 ، 500 ، 600  
700 ، 800 ، 900 و 1000 جزء بالمليون باستخدام المعادلة التالية:

كمية المادة المطلوبة من المحلول الرئيسي =

التركيز المطلوب (ppm) X حجم الوسط الزراعي المطلوب (100 سم<sup>3</sup>)  
تركيز المحلول الرئيسي (0.01) 1000000

وتركت معاملة المقارنة بدون إضافة ويتم تحريك الوسط الزراعي المعامل بحركة دورانية متعكسة حتى يتم التجانس قدر الإمكان ، ثم صب في أطباق بتري (9 سم) وبكمية 25 سم<sup>3</sup>/طبق، ولكل معاملة أربعة أطباق. وتركت الأطباق حتى يتصلب الوسط الزراعي ومن ثم زرع قرص بقطر 1 سم من مستعمرة الفطر في وسط الطبق، وتم حضان الأطباق لمدة 4-5 أيام وعلى درجة حرارة من 25-30 م وحسب ظروف الدراسة.  
تم حساب النسبة المئوية لمقدار التثبيط وفق معادلة Naze (12):

$$\% \text{ للتثبيط} = 100 - \frac{\text{النمو الفطري في المعاملة}}{\text{النمو الفطري في المقارنة}} \times 100$$

وبعد تمام قياس التثبيط تم حساب عدد الأجسام الحجرية تحت القوة الصغرى للمجهر المركب Under Low Power Field. ولتقدير حيوية الفطر Vigor تم استخدام معادلة Maguire (13) بعد إجراء بعض التعديل فيها، وكما يلي:

$$\text{حيوية} = \frac{\text{مقدار النمو اليومي}}{\text{مقدار النمو اليومي}} \times \frac{\text{عدد أيام الحضانة عند نهاية القياس}}{\text{عدد أيام الحضانة عند وقت القياس}}$$

ولمعرفة تأثير تلك المواد في إنبات بذور زهرة الشمس، أخذت أربعمائة بذرة لكل معاملة ثم غمقت سطحياً بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم 5% (1% كلور حر) ولمدة ثلاث دقائق، ومن ثم غسلها جيداً بالماء المقطر المعقم لعدة مرات ووضعت بمعدل 25 بذرة /طبق و غمرت البذور بمحلول كل مادة على حده وبتركيز 1000 جزء بالمليون وتركت معاملة المقارنة، حيث غمرت البذور بالماء المقطر المعقم وحضنت الأطباق على درجة حرارة 25 ± 2 م وبعد 14 يوماً، تم حساب عدد البذور النابتة واستخرجت النسبة المئوية للإنبات لكل معاملة.

## النتائج والمناقشة

التأثير التثبيطي للنمو الفطري للفطر *M. phaseolina*:

إن استخدام الأسمدة خاصة تلك الحاوية على العناصر الصغرى وبتراكيز مختلفة ضد المسبب المرضي لمرض التعفن الفحامي قد أدى إلى إحداث تأثير سلبي على هذا الفطر، فقد ثبتت كبريتات الحديدوز المائية (جدول رقم 1، 2) نمو الفطر وبنسب مختلفة تبعاً للتركيز المستخدم وبفروقات معنوية أحياناً فيما بين المعاملات وبفروقات معنوية عالية جداً قياساً بالمقارنة وعلى مستوى (P=0.01)، وقد بلغ معدل مقدار التثبيط عند استخدام كبريتات الحديدوز بتركيز 200 جزء بالمليون 27.22% ، ثم ازداد معدل مقدار التثبيط بزيادة التركيز المستخدم، حيث بلغ 53.61% عند تركيز 500 جزء بالمليون ، ثم أصبح معدل مقدار التثبيط عند التركيز 1000 جزء بالمليون 73.61%، وبهذا يكون لهذا المركب تأثير مضاد للفطر Antifungus Effect ، ويؤيد هذا ما ذهب إليه الشال وزملاؤه (14) من أن استخدام محلول كبريتات الحديدوز حول قواعد أشجار الكمثرى في مصر، لمنع أبواغ الفطريات من النمو ومنع تكشف النمو الخضري لها. كما أدى استخدام مستخلص الثوم Garlovit إلى إحداث تثبيط لنمو المسبب المرضي موازياً وقريباً إلى حد ما لكبريتات الحديدوز، فقد بلغ معدل مقدار التثبيط

يتميز الفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid بالمدى العائلي الواسع، و تتخذ الإصابة بهذا المسبب المرضي صوراً عديدة مثل التعفن الفحامي Charcoal rot ، لفحة البادرات Seedling blight ،تعفن الجذور Root rot ، تعفن السيقان Stem rot ، تعفن القنرات Pod rot لأكثر من 500 نوع من النباتات (1). كذلك فإنه يعد من الفطريات صعبة المكافحة بسبب قابليته العالية على البقاء في التربة على هيئة أجسام حجرية ولطبيعة الإصابة التي تبدأ في وقت مبكر من عمر النبات، إلا أن الأعراض لا تظهر إلا في وقت نضج المحصول (2-4)، فمثلاً لهذا الفطر القدرة على البقاء و المعيشة على مخلفات سيقان الذرة الصفراء والبيضاض على هيئة أجسام حجرية لمدة تتراوح بين 16-18 شهراً (5)، وفي العراق سجل الطور السكاروشي لهذا الفطر *Sclerotium bataticola* على نبات السمسم من قبل Al-Adhami (6).

استخدمت طرق عديدة لمكافحة هذا المسبب المرضي، إلا أنه لم يثبت وجود طريقة فعالة ناجعة و اقتصادية لمكافحته على المحاصيل الاقتصادية (7) ، كما أكد Sinclair (8) على أن أي برنامج لإدارة مكافحة هذا المرض يجب أن يتضمن تطوير أصناف مقاومة أو متحملة واستخدام الأحياء الدقيقة المضادة للفطر (المسبب المرضي)، بالإضافة إلى طرق زراعية وكيميائية مختلفة. وعليه فقد تعددت طرق ووسائل مكافحة هذا المسبب المرضي وقطع الطريق عليه وعلى وسائل بقائه قدر الإمكان. درس Al-Hassan (9) تأثير تراكيز مختلفة من ملح الطعام Sodium Chloride على النمو الفطري للفطر وتكوين الأجسام الحجرية، ووجد أن التراكيز العالية لملاح الطعام قد أثرت سلباً في النمو الفطري للفطر ومنعت تكوين الأجسام الحجرية لهذا الفطر. من ناحية أخرى، أشار Mihal (10) إلى أن لمادة كلورات البوتاسيوم Potassium Chlorate بعض التأثير السلبي في هذا الفطر. لقد أدى استخدام المبيدات الحشرية والفطرية بمستويات مثيرة للقلق إلى الاتجاه نحو البحث عن مبيدات صديقة للبيئة ومن مصادر مختلفة يكون لها الحد الأدنى من الآثار السلبية للكائنات الحشرية وغيرها، ولها نشاط مؤثر ضيق لطائفة من الكائنات المستهدفة (11).

إن هدف هذه الدراسة يكمن في إيجاد مواد كيميائية لها تأثير فاعل في تثبيط النمو الفطري لهذا الفطر ومنعه من تكوين الأجسام الحجرية، ومعرفة مدى تأثيرها في حيوية الفطر. وبنفس الوقت تكون تلك المواد ذات فائدة عند إضافتها للتربة واستخدامها كمركبات سمادية لتغذية النبات وتحسين نموه وأدائه وكذلك مدى تأثير تلك المواد في إنبات البذور.

## المواد وطرق العمل

اعتمدت عزلة ممرضة من الفطر *M. phaseolina* عزلت من نباتات زهرة الشمس المصابة بمسبب مرض التعفن الفحامي (تم الحصول عليها من كلية الزراعة جامعة البصرة، د.محمد عامر فياض) وتكاثرت على الوسط الزراعي Potato Dextrose Agar (PDA) ، واستخدمت المستعمرات الناتجة منها بعمر 4-5 أيام في جميع الدراسات اللاحقة، كما استخدمت المواد الآتية:

- Ferrous Sulfate Heptahydrate (Fe2SO4.7H2O).
- Copper Sulfate Pentahydrate (CuSO4.5H2O).
- Zinc Sulfate Heptahydrate (ZnSO4.7H2O).
- Garlic Extraction (Garlovit 20000 ppm).

وهي من إنتاج شركة AGAS، المجموعة العربية للخدمات الزراعية، مصر.

تم تحضير سلسلة من تراكيز تلك المواد كل على حدة ، إذ تم وزن 1غم من المركبات الكيميائية التي على هيئة مساحيق وإسم<sup>3</sup> من المبيد Garlovit وأضيفت إلى 100 سم<sup>3</sup> من الماء المقطر المعقم ليصبح تركيز المحلول الرئيسي Stock Solution 1%، ومنه تم تحضير التراكيز النهائية عند إضافتها إلى 100 سم<sup>3</sup> من الوسط الزراعي PDA بعد تعقيمه لتصبح التراكيز النهائية: 50 ، 100 ،

كما بينت هذه الدراسة أن لكبريتات النحاس المائية (الجدول رقم 3) تأثيراً تثبيطياً جيداً، وبفروقات معنوية فيما بين التراكيز أحياناً وبفارق معنوي عال جداً قياساً بمعاملة المقارنة، فقد كان مقدار التثبيط 63.45% عند تركيز 500 جزء بالمليون ثم أصبح 80.28 % عند تركيز 1000 جزء بالمليون.

ومن المعروف عن هذه المادة أنها قد استخدمت منذ أمد بعيد كمبيد للفطريات، فقد ذكر ووكر (17) في معرض سرده لتاريخ المبيدات أن هذا المركب قد استخدم في معاملة بذور القمح ضد مرض التقحم المغطى وكذلك كمادة حافظة للخشب، واستخدمت كذلك كمادة مضافة للتربة لمنع مرض اللقحة المتأخرة في البطاطا.

عند تركيز (200) جزء بالمليون 23.05% و43.88% عند تركيز 500 جزء بالمليون وصولاً إلى 66.66% تثبيط عند تركيز 1000 جزء وبفارق معنوي كبير قياساً بمعاملة المقارنة، وهذا يوافق ما ذكره Bang (15) من أن تركيز 77 جزء بالمليون من الزيت الطيار لمستخلص الثوم أدى إلى تثبيط كامل لنمو الفطريات *Helminthosporium solani* و *Fusarium solani* ويؤيد ما ذهب إليه حسن (16) من أن لمستخلص الثوم المائي المضاف للوسط الزراعي PDA بتركيز 2 و4 و8 % له تأثير معنوي في تحديد النمو الفطري للفطريات *Alternaria alternata* و *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* وبهذا يكون لمستخلص الثوم تأثير مثبط لبعض مسببات المرضية الفطرية والبكتيرية (2).

جدول رقم (1): تأثير كبريتات الحديدوز ومستخلص الثوم (تركيز 300-50 PPm) في تثبيط النمو الفطري وتكوين الأجسام الحجرية للفطر *M.phaseolina* بعد خمسة أيام من الحضارة على درجة حرارة 25-30 م°

التركيز PPm	تثبيط النمو الفطري		تثبيط تكوين الأجسام الحجرية	
	Garlovit	FeSO4	Garlovit	FeSO4
المقارنه	0.0		264.0	264.0
50	15.27		108.20	184.50
100	19.44		193.20	183.80
150	19.99		189.80	178.20
200	27.22		187.0	171.80
أقل فرق معنوي 0.01	10.43		22.29	23.54

جدول رقم (2): تأثير كبريتات الحديدوز ومستخلص الثوم (تركيز 300-1000 PPm) في تثبيط النمو الفطري وتكوين الأجسام الحجرية للفطر *M.phaseolina* بعد أربعة أيام من الحضارة على درجة حرارة 25-30 م°

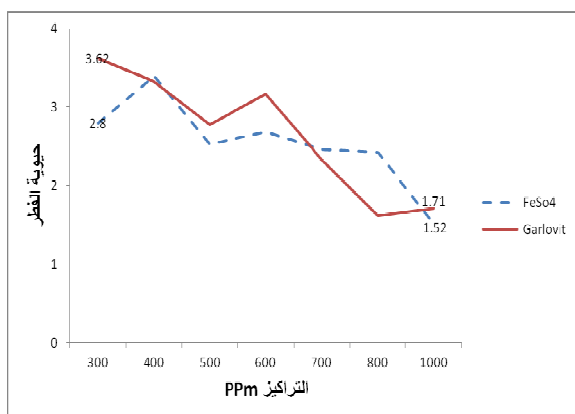
التركيز PPm	تثبيط النمو الفطري		تثبيط تكوين الأجسام الحجرية	
	Garlovit	FeSO4	Garlovit	FeSO4
المقارنه	0.0		256.80	256.80
300	285.33		186.80	168.50
350	30.83		180.20	158.80
400	42.49		179.80	145.20
450	52.22		167.00	140.00
500	51.61		151.20	139.20
600	54.18		138.20	141.50
700	54.72		126.80	107.20
800	57.22		51.20	49.50
900	61.66		26.50	23.80
1000	73.61		6.50	00.00
أقل فرق معنوي 0.01	4.57		13.73	13.62

جدول رقم (3): تأثير كبريتات النحاس وكبريتات الخارصين (تركيز 300 - 1000 PPm) في تثبيط النمو الفطري وتكوين الأجسام الحجرية للفطر *M.phaseolina* بعد خمسة أيام من الحضارة على درجة حرارة 25-30 م°

التركيز PPm	تثبيط النمو الفطري		تثبيط تكوين الأجسام الحجرية	
	ZnSO4	CuSO4	ZnSO4	CuSO4
المقارنه	0.0		253.80	253.80
300	27.50		87.00	190.20
400	41.67		51.20	86.00
500	63.45		38.50	59.20
600	74.87		29.50	46.00
700	76.01		14.00	22.00
800	78.66		00.00	00.00
1000	80.28		00.00	00.00
أقل فرق معنوي 0.01	11.18		13.10	12.41

فيما بين التراكيز المستخدمة عند مستوى (P=0.01) وبفارق معنوي عال مع معاملة المقارنة، وقد بلغ معدل التثبيط 75.10% عند التركيز 1000 جزء بالمليون قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغ فيها معدل مقدار التثبيط 0.00%.

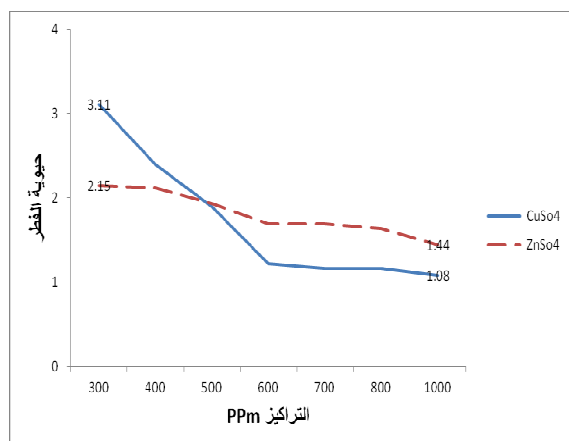
تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما ذكره Virupakshaprbhu (18) من أن لكبريتات النحاس تأثيراً مثبطاً للنمو الفطري لفطر *M. phaseolina* عند استخدامها بتركيز 1000 و2000 و3000 جزء بالمليون. كما أظهرت الدراسة أن للمركب السمادي كبريتات الخارصين المائية تأثيراً مثبطاً أيضاً لنمو الفطر *M. phaseolina*، إذ قل معدل النمو الفطري تبعاً للتركيز المستخدم وبفروق معنوية



شكل رقم (1): تأثير كبريتات الحديدوز ومستخلص الثوم Garlovit على حيوية الفطر *M. phaseolina* بعد أربعة أيام من الحضنة على درجة حرارة 30 – 25 °م

كما يلاحظ من الشكل رقم (2) انخفاض كبير لحيوية الفطر، إذ بلغ 1.09 و 1.16 عند التركيزين 800 و 1000 جزء بالمليون والتي عندها حققت كبريتات النحاس أعلى تثبيط للنمو القطري للفطر بلغ 78.66% و 80.28% على التوالي، ومنعاً تاماً لتكوين الأجسام الحجرية قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغت فيها حيوية الفطر 3.38، وكذلك الحال بالنسبة لكبريتات الخارصين المائية، إذ بلغت حيوية الفطر فيها عند التركيزين 800 و 1000 جزء بالمليون 1.68 و 1.44 قياساً بمعاملة المقارنة التي كان فيها معدل التثبيط 3.38، في حين كان معدل مقدار التثبيط للنمو القطري لتلك المادة عند نفس التركيزين 71.00% و 75.10%، ومنعاً تاماً لتكوين الأجسام الحجرية، في حين كان معدل حيوية الفطر عند معاملة المقارنة 3.38 ومعدل عدد الأجسام الحجرية 253.80 جسماً حجرياً.

مما تقدم يلاحظ أن معدل التثبيط للنمو القطري وتكوين الأجسام الحجرية ازداد بزيادة التراكيز المستخدمة، وقد رافق ذلك زيادة ضعف حيوية الفطر التي هيبت لمستويات متدنية جداً قياساً بمعاملات المقارنة وبفروقات معنوية عالية عند مستوى 0.01، مما يؤكد أن تلك المواد قابلة للتأثير السلبى Antifungal Effect ضد الفطر *M. phaseolina* المسبب لمرض التعفن الفحيمى لزهرة الشمس.



شكل رقم (2): تأثير كبريتات النحاس و كبريتات الخارصين على حيوية الفطر *M. phaseolina* بعد أربعة أيام من الحضنة على درجة حرارة 30 – 25 °م

لقد أظهرت جميع المواد المستخدمة قدرتها على إحداث خفض في معدل النمو القطري للفطر *M. phaseolina* عند استخدامها بتركيزات مختلفة ولجميع المعاملات، وربما يعود ذلك إلى احتوائها على الكبريت، فقد ذكر محمد وزملوه (19) أن هناك تأثيراً معنوياً للمعاملة بكبريتات الكالسيوم عند تركيز 400 جزء بالمليون حيث أعطت أعلى تثبيط للنمو الطولي وإنتاج الأجسام الحجرية لعزلات الفطر *M. phaseolina*، وقد أدت إلى خفض الإصابة بهذا المسبب المرضي. ويبدو مما تقدم أن العامل المشترك لتلك المواد المستخدمة هو احتوائها على الكبريت.

### التأثير على تكوين الأجسام الحجرية:

يتضح من الجداول (1-3) أن لجميع مركبات أسمدة العناصر الصغرى و مستخلص الثوم تأثيراً سلبياً على تكوين الأجسام الحجرية للمسبب المرضي *M. phaseolina* عند حساب أعداد الأجسام الحجرية تحت القوة الصغرى للمجهر، فقد أدى استخدام كبريتات الحديدوز و مستخلص الثوم عند تركيز 1000 جزء بالمليون إلى خفض معدل أعداد الأجسام الحجرية إلى صفر و 6.5 جسم حجري على التوالي، وبفارق معنوي عال جداً قياساً بمعاملة المقارنة التي كان معدل عدد الأجسام الحجرية فيها 256.8 جسماً حجرياً. كما أدت المركبات السمادية كبريتات النحاس المائية وكبريتات الخارصين المائية إلى إحداث تثبيط كامل لتكوين الأجسام الحجرية عند التركيزين 800 و 1000 جزء بالمليون، وقد بلغ معدل عدد الأجسام الحجرية صفراً قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغ فيها معدل عدد الأجسام الحجرية 253.80 جسماً حجرياً، وبفارق معنوي كبير عن معاملة المقارنة عند مستوى 0.01.

يتضح مما تقدم فعالية جميع المركبات المستخدمة في إحداث تثبيط وتحديد للنمو القطري وتكوين الأجسام الحجرية للفطر *M. phaseolina*، وربما يعود ذلك إلى احتواء تلك المركبات المستخدمة على عنصر الكبريت. فقد بين Synge (20) أن الثوم يحتوي على أعلى نسبة من الأحماض الأمينية التي تحتوي على الكبريت مثل Cysteine و Methionine والتي تنتج مادة Allicin بعد سلسلة من التفاعلات الكيميائية، وهو من أهم المركبات التي تحمل الصفة العلاجية والفعالة ضد العديد من الأحياء المجهرية (21-23). كما أشارت بعض الدراسات إلى أن مستخلص الثوم يمتلك فعالية في تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة للنبات من خلال قدرته على قتل الهياضات وتثبيط الإنزيمات، وكذلك تثبيط عملية التنفس من خلال تثبيطه لإنزيم Acetyl - CoA Synthetase (24-27). ومن تلك الفطريات التي تثبط نموها بالكامل عند تعرضها للزيوت الطيارة لمستخلص الثوم *Fusarium solani* (28).

### التأثير على حيوية الفطر *M. phaseolina*:

يشير الشكل رقم (1) فيما يتعلق بقدرة الفطر على النمو ومقاومة تأثير كبريتات الحديدوز المائية ومستخلص الثوم عند التراكيز المنخفضة إلى أنه لم تكن هناك فروقات معنوية بين التراكيز ولكنها كانت معنوية على مستوى 0.01، إذ بلغت 2.61 و 2.75 على التوالي عند التركيز 200 جزء بالمليون قياساً بمعاملة المقارنة التي كانت حيوية الفطر فيها 3.87، وإن كان هناك بعض الخلل في معاملة مستخلص الثوم عند التركيز 150 جزء بالمليون، وربما يعود ذلك إلى عدم تجانس الكمية المضافة من مستخلص الثوم إلى الوسط الزراعي بصورة جيدة. واستمرت حيوية الفطر وقدرته على مقاومة التأثير السلبى لكبريتات الحديدوز ومستخلص الثوم حتى عند التركيز 500 جزء بالمليون، إذ بلغت 2.53 و 2.78 على التوالي، في حين كانت حيوية الفطر في معاملة المقارنة 4.59، ثم بدأت حيوية الفطر بالانخفاض والتراجع بزيادة التركيز وصولاً إلى 1.52 و 1.71 عند التركيزين 1000 جزء بالمليون قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغت فيها حيوية الفطر 4.59. من ذلك يتبين أن لكبريتات الحديدوز قدرة كبيرة في التأثير على حيوية الفطر بعد أربعة أيام من الحضنة على درجة حرارة 30-25 °م، وهو التركيز الذي حقق أعلى معدل تثبيط للنمو القطري وتكوين الأجسام الحجرية بلغ 73.61% و صفر، في حين كان معدل التثبيط لمستخلص الثوم 66.66% و 6.5 جسماً حجرياً عند نفس المستوى من التركيز. وربما يعود ذلك إلى ضعف تركيز المادة الفعالة في المستحضر التجاري.

9. Al-Hassan KK.; Sadic AA. and Hameed AR. (1973). Studay on *Sclerotium bataticola* the cause of charcoal rot disease of Sesmae. Iraq. J. Agric. Sci. VIII:12-29.
10. Mihal JD. and Tylor SJ. (1995). Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium Production and chlorate utilization. Can. J. Bot. 73:1546-1603.
11. Looper JE.; Henkels MD.; Roberts RG.; Grove GG.; Willett MJ. and Smith TJ. (1991). Evaluation of streptomycin, oxytetra cycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pea orchard in Washington state. Plant. Dis. 75:287-290
12. Naze F.; Rauf CA.; Haque IU. and Ahmad I. (2006). Management of *Rhizoctonia solani* with plant diffusates and chemicals. Pakist. J. Phytopathol. 18 :36-43.
13. Maguire JD. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop. Sci. 2:176-177.
14. الشال ، سعد عبد الواحد، توفيق، علي السيد، عبد المجيد، جمال. (2001). زراعة وإنتاج الكمثرى في مصر. نشرة إرشادية 695 لسنة 2001 . مركز البحوث الزراعية، جمهورية مصر العربية.
15. Bang U. (1997). Control storage disease of potato and sprout inhibition by plant volatile progress in essential oil research. Proceeding Of the 28<sup>th</sup> International Symposium on Essential oils, 1-3. September, Eskisehir, Turkey. Eds Baser, K.H.C. and Kirimer. Pp.:273-279.
16. حسن ،محمد صادق. (2003). استعمال مستخلص فصوص النوم في مقاومة بعض الفطريات الممرضة. المجلة العراقية للعلوم الزراعية. (عدد خاص للمؤتمر القطري الثالث لوقاية المزروعات). 39:31-39
17. ووكر، جون تشارلز. (1966). أمراض النبات. ترجمة: محمود ماهر رجب ، كمال ثابت، محمد شاكر حسن، مصطفى شكرى. دار البشر. مكتبة النهضة المصرية. ص: 1061
18. Virupakshaprbhu H. (2009). Viriability and management of charcoal rot of Sorghum caused by *Mcrophomina phseolina* (Tassi) Goid. Ph.D. Thesis. University of Agricultural Science. Dharwad, India. P.:128.
19. محمد، عماد الدين يوسف محمود، محمد، محمود أحمد إبراهيم، ممدوح، محمد عبد الفتاح خليفة. (2009). تأثير كيريتات الكالسيوم على إصابة نباتات السمسم وعياد الشمس بمرض التعفن الفحامي ومحصول البذور الناتج . معهد بحوث أمراض النباتات، مركز البحوث الزراعية. مصر.
20. Synge RLM. (1971). Proteins and poisons in plant. Naturwissen Schaftliche Rundschau. 24(2):54-61.
21. Brenner S. and Wolf R. (1994). Possible nutritional factors in induced Pemphigus. Dermatol. 189:337-339.
22. Yoshida H.; Katsuzaki H.; Ohta R.; Ishikawa K.; Fukude H.; Fujino I. and Suzuki A. (1999). Antimicrobial activity of the thiosulfates isolated from oil macerated garlic extract. Bio. Sci. Biotechnol. Biochem. 63:591-594.
23. Ankri S. and Mirelman D. (1999). Antimicrobial properties of Allicin From garlic. Microb. Infect. 2: 125-129.
24. Garacia RP. ;and Lawas MVP. (1990). Note: potential plant extracts for control of *Azolla* fungal pathogens. Philipp. Agriculturist. 73:343-348.
25. Singh UP.; Pandey VN.; Wagner KG. and Singh KD. (1990). Antifungal activity of ajoene,

#### تأثير المواد المستخدمة على إنبات بذور زهرة الشمس:

يتضح من الجدول رقم (4) أن هناك تبايناً واضحاً في إنبات البذور، إذ بلغت النسبة المئوية للإنبات في معاملة كيريتات النحاس أعلى مستوى 77 % وبفارق معنوي عن معاملة كيريتات الخارصين والمقارنة، وهذه النتيجة تخالف ما ذكره Verma وزملاؤه (29) الذي أشار إلى أن كيريتات النحاس لم تؤدي إلى إحداث فرق معنوي في الإنبات عند معاملة بذور الماش (*Vigna radiata*) بها، وربما تعود تلك الزيادة إلى مستوى ما من الدعم والتحصين وفرته تلك المادة للبذور من مسببات المرضية المحمولة بالبذور، تليها معاملة كيريتات الحديدوز، غز بلغت النسبة المئوية للإنبات فيها 72%. وكانت أقل نسبة إنبات في معاملة كيريتات الخارصين 62%. وهذه النتيجة توافق ما ذكره Wei وزملاؤه (30) من أن كيريتات الخارصين ليس لها تأثير معنوي في تحصيل ودعم إنبات بذور الرز، علماً بأنه لا توجد دراسات حول موضوع تأثير الأسمدة الحافظة على العناصر الصغرى على إنبات البذور.

جدول رقم (4): تأثير المركبات الكيميائية على إنبات بذور زهرة الشمس بعد 14 يوماً من الحضانة على درجة حرارة  $25 \pm 2^\circ \text{C}$

الإنبات %	المادة
77	CuSO4.5H2O
72	Fe2SO4.7H2O
65	Garlovit
62	ZnSO4.7H2O
63	المقارنة
11.97	أقل فرق معنوي على مستوى 0.05

#### المصادر

1. Dhingra OD. and Sinclair JB. (1978). Biology and pathology of *M. phaseolina*. Imprensa Universitaria. Universidade Fedral Dvicosa-Minas Minas Gerais –Brazil. P.: 166.
2. Garrett SD. (1956). Biology of root infecting fungi . Cambridge University Press, London. P.:293.
3. Short GE.; Wyllie TD. and Ammon VD. (1978). Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in Soybean tissue. Phytopathol. 68:736-741.
4. Ahmed I.; Burney K. and Aslam M. (1991). Analysis of resistance in sunflower to charcoal rot *Macrophomina phaseolina*. Pak. J. Bot. 23:189-193.
5. Cook GE.; Boosalis MG.; Dunkle ID. and Odvod GN. (1973). Survival of *Macrophomina phaseolina* in corn and sorghum Stalk residues. Plant. Dis. Report. 57:873-875.
6. Al- Adhami AR. (1953). A preliminary list of plant diseases in Iraq. Bull. Mini. Agric.17:1-14.
7. Holliday P. and Punithalingam F. (1970). *Macrophomina phaseolina*, description of pathogenic fungi. Bacteria. No. 275. Kew Surrey England. Commonwealth Mycological Institute.
8. Sinclair JB. (1984). Root and stalk rot caused by *Macrophomina phaseolina* in Legumes and other crops. Proceedings of the consultative group discussion on research needs and strategies for control of sorghum root and stalk rot diseases. 27 November – 2 December 1983 India . ICRISAT.

aconstituent of garlic (*Allium sativum*). Can. J. Bot. 68: 1354-1356.

26. Saniewska A. (1995). The garlic- derived diallyldisulphide as the inhibitor of mycelium growth of *Stagonospora cutisii* Brok. Sacc. Phytopath. Polonica. 9(XXI):37-43.

27. Saniewska A. (1996). Potential use of garlic compound and fungicides in control of fungi on seeds of some ornamental plants. The 5<sup>th</sup> Conference of the section for biological control of plant diseases of the polish phytopathological society " Effectiveness of some microorganism and plant Extract in the control of plant diseases". April 18-19. Skiernie wice, Poland. Pp.:141-147.

28. Bang U. (1999). Control of seedborne pathogens by natural volatile Substances. 14<sup>th</sup> Triennial conference of the EAPR. Published by assessora to Agricoltura Regione Compania. Pp.:174-175.

29. Jayprakash V.; Singh V. and Yadav J. (2011). Effect of copper sulphate on seed germination, plant growth and peroxidase activity of Mung bean (*Vigna radiate*). Int. J. Botan. 7(2):200 -204.

30. Wei Y.; Shohag MI.; Wang Y.; Lu L.; Wu C. and Yang X. (2012). Effect of zinc sulphate fortification in germinated brown rice on seed , znic concentration , bioavailability and seed germination. J. Agric. Food Chem. 60(7):1871-1879.

## التقدير الآلي لكميات دقيقة الصغر للباراسيتامول والكلورفينارامين ماليت والكوافينيسين وهيدروكلوريد البرومهكسين في مستحضرها الصيدلاني رباعي المكونات

خلف فارس السامرائي

قسم الكيمياء / كلية التربية / جامعة سامراء / جمهورية العراق

البريد الإلكتروني: [alfarisalsamarrai2013@gmail.com](mailto:alfarisalsamarrai2013@gmail.com)

### الملخص باللغة العربية

تم ابتكار طريقة طيفية حساسة ودقيقة ومضبوطة للتقدير الآلي لكل من الباراسيتامول (PAR) والكوافينيسين (GUA) وهيدروكلوريد البرومهكسين (BHH) وكلورفينارامين ماليت (CPAM) في أشكالها النقية وفي مسحضرها الصيدلاني رباعي المكونات المستعمل طبيا في علاج نزلات البرد (على شكل أقراص) وبصورة آنية، حيث لم توجد في السابق طريقة تحليلية لتقدير مكونات المزيج الأربعة أنيا. تستند الطريقة المبتكرة على مشتقات طيف الامتصاص الأولى والثانية والثالثة والرابعة، وباستعمال مساحة القمة وارتفاع القمة إلى خط الأساس، ونقطة التقاطع الصفري عند الأطوال الموجية المعنية في هذا التقدير. تم تقييم الطريقة المقترحة استنادا إلى دليل (ICH). وقد كانت القيم الاسترجاعية المئوية %Rec والانحراف القياسي النسبي %RSD وقيم حد الكشف LOD والحد الكمي LOQ حول 100% و (1.8123-1.9876) % و (0.5991-2.7243) و (1.9970-9.0810) على التوالي ولجميع رتب المشتقة. طبقت الطريقة بنجاح لتقدير المكونات الأربعة في مكوناتها النقية وفي مستحضرها الصيدلاني التجاري.

**الكلمات المفتاحية:** مشتقة الطيف، التقدير الطيفي الآلي، الباراسيتامول، الكلورفينارامين ماليت، الكوافينيسين، هيدروكلوريد البرومهكسين.

## Simultaneous spectrophotometric determination of micro amounts of paracetamol, guafenesin, bromhexine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in their quaternary components pharmaceutical form

Khalaf F. AL-Samarrai

Dept. of Chemistry / College of Education /University of Samarra / Republic of Iraq

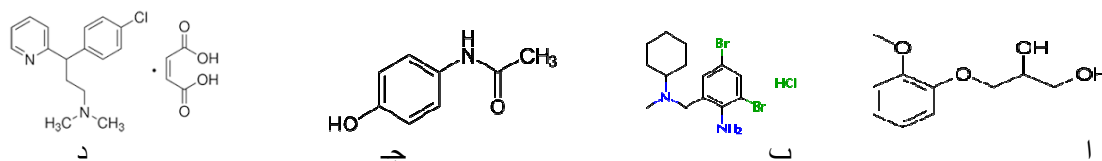
### ABSTRACT

An innovate, sensitive and accurate spectrophotometric method was created for simultaneous determination of micro amounts of Paracetamol (PAR), Guafenesin (GUA), Bromhexine Hydrochloride (BHH) and Chlorpheniramine Maleate (CPAM) in quaternary components of a medicine used in common cold medications (tablets). There had been notice that no analytical method was applied before for determination of these quaternary components simultaneously. The method was based on the first (D1), second (D2), third (D3) and fourth (D4) derivatives of spectra depending on the peak to base line, peak to zero crossing and peak area which are proportioned with the concentration of each component. Rec%, RSD%, LOD and LOQ were closed around (100%), (1.8123-1.9876), (0.5991-2.7243) and (1.9970-9.0810) respectively for all orders of derivatives. The method was successfully applied for determination of four components in pure and marketing forms.

## المقدمة

وهو من مضادات الهستامين الكيميائية. يستعمل كعلاج للعطاس والسعال ودمع العينين والحساسية ونزلات البرد (7-12). كذلك يحتوي على الكوافينيسين الذي هو (RS)-3-(2-methoxy phenoxy) propane-1,2-diol (شكل رقم 1-ج) الذي يستعمل في علاج عسر الطمث الابتدائي (dysmenorrheal) وعلاج الربو (asthma) وعلاج النقرس (gout) وعلاج الألم العضلي الليفي (fibromyalgia)، كما يستعمل لعلاج السعال الجاف وعلاج أعراض البرد والحساسية والتهابات الجهاز التنفسي العلوي (13-18)، بالإضافة إلى هيدروكلوريد البروموكسين فهو 2,4-dibromo-6-[cyclohexyl(methyl) amino] methyl (شكل رقم 1-د) الذي يستعمل كمحلل للمابوسمين وموسع للقصبات الهوائية، وفي علاج اضطرابات الجهاز التنفسي المتزامن مع إفرازات القصبات الهوائية (19-21).

يعد المستحضر الصيدلاني للمكونات الأربعة: الباراسيتامول والكلورفينارامين مألوف والكوافينيسين وهيدروكلوريد البروموكسين من الأدوية التي تستعمل في حالات انسداد الأنف ولمعالجة الصداع وارتفاع درجة حرارة الجسم وآلام تقرح البلعوم والاحتقان والسعال المصاحب لنزلات البرد، وذلك لاحتوائه على الباراسيتامول (PAR) المسمى N-(4-hydroxyphenyle acetamide) (1) (شكل رقم 1-أ)، الذي يستعمل كمسكن للألم وخافض للحرارة (2)، ويستعمل في حالات آلام الظهر والصداع والتهاب المفاصل وآلام ما بعد الجراحة، كما يستعمل للحد من الحمى ذات الأصل الجرثومي والفيروسي (4-6). ويحتوي على الكلورفينارامين مألوف (CPAM) المسمى 3-(4-Chlorophenyl)-N,N-dimethyl-3-pyridin-2-ylpropan-1-amine (شكل رقم 1-ب)،



شكل رقم (1): التركيب الكيميائي للمركبات الأربعة. (أ): PAR (ب): BHH (ج): GUA (د): CPAM

المتوالي للمحلول القياسي في قناني حجمية سعة (100 ml) وإكمال الحجم بنفس المذيب إلى حد العلامة وحسب الحاجة.

**تحضير محاليل المستحضر الصيدلاني:** أخذت 10 أقراص من المستحضر الصيدلاني (ACHEE) المنتج من قبل شركة (BROWN) الهندية المكون من الباراسيتامول (PAR) والكوافينيسين (GUA) وهيدروكلوريد البروموكسين (BHH) والكلورفينارامين مألوف (CPAM) وبالكميات (450 و 200 و 8 و 2 mg/tablet) على التوالي، وأذيت في كمية من المذيب المكون من الإيثانول والماء بنسبة 40:60 (V/V) ووضع المحلول في حمام الأمواج فوق الصوتية المائي لإتمام الإذابة، وأكمل الحجم بنفس المذيب في قنينة حجمية سعة 100 ml. وبالنظر لقلّة كميات كل من BHH و CPAM مقارنة بكمية PAR و GUA في المستحضر المذكور، ومن أجل أن تكون النتائج أكثر قبولاً، فقد تم تعديل كمياتها وذلك بسحب 10 ml من المحلول وأضيفت إليه 12 ml من BHH و 18 ml من CPAM والتي تراكبها 1000 µg/mL، وأكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمية سعة 100 ml بنفس المذيب لتصبح التراكيز (450 و 200 و 200 و 200). µg/mL للمركبات الأربعة على التوالي.

## أطياف الامتصاص

خُصّرت مجموعة من التراكيز (5-60 µg/mL) من كل PAR و GUA و BHH و CPAM كل على انفراد وأجري مسح للأطوال الموجية لها ما بين (190-350 nm) لرسم الطيف الصفري، ثم اشتق الطيف الصفري إلى المشتقة الأولى (D1) والثانية (D2) والثالثة (D3) والرابعة (D4).

## منحنيات المعايرة للمكونات النقية

تم إعادة تسجيل طيف الامتصاص لكل تركيز من تراكيز المكونات الأربعة بأشكالها النقية والتي اعتمدت في رسم أطياف امتصاصها خمسة مرات لغرض بناء منحنيات المعايرة لها عند الأطوال الموجية المعتمدة.

ومن خلال مراجعة الأدبيات، لم يتم العثور على طريقة تحليلية طيفية أو غيرها لتقدير المكونات الأربعة في مزيجها، على أن هناك العديد من الطرق المستعملة في تقديرها كل على حدة أو كمزائج ثنائية أو ثلاثية وبطرق طيفية أو كروماتوغرافية أو كهربائية مقترنة مع تقنيات أخرى (22-24). لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى ابتكار طريقة جديدة لتقدير كل منها في أشكالها النقية وفي مستحضرها الصيدلاني (ACHEE أقراص)، اعتماداً على المشتقات الأولى والثانية والثالثة والرابعة للطيف الصفري لكل منها أنياً.

## المواد وطرق العمل

### الأجهزة المستعملة

تم استعمال العديد من الأجهزة في القياسات: حمام مائي فوق الصوتي (Ultrasonic water bath Sensitive) (LabTec) وميزان حساس (Sartorius Germany Balance) ومطياف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية ثنائي الحزمة (UV-Vis-) (Shimadzu UV-beam Spectrophotometer double Japan - 1650 Visible) مع خلايا قياس مصنوعة من الكوارتز ذات قطر 1 cm.

### المواد الكيميائية المستعملة

تم استعمال مواد كيميائية عالية النقاوة ومجهزة من قبل شركات معتمدة، حيث تم تجهيز كل من مكونات العقار (PAR و CPAM و GUA و BHH) من قبل الشركة العامة لصناعة الأدوية في سامراء، العراق، والإيثانول مجهز من شركة فلوكا وبنقاوة عالية (99.9%).

### المحاليل القياسية

محاليل الباراسيتامول والكوافينيسين وهيدروكلوريد البروموكسين والكلورفينارامين مألوف القياسي (1000 µg/mL): تم تحضيرها للمكونات الأربعة بإذابة (0.1 g) من المادة الفعالة القياسية لكل منها في كمية من المذيب المكون من الإيثانول والماء بنسبة 40:60 (V/V) في قنينة حجمية سعة (100 ml)، ثم أكمل الحجم إلى العلامة من نفس المذيب. تبع ذلك تحضير محاليل العمل بالتخفيف

### أطراف الامتصاص

تم إجراء مسح للأطوال الموجية لكل من PAR و GUA و BHH و CPAM على حدة، وكذلك لمزائجها التحضيرية مختلفة التراكيز (5-60 µg/mL) مقابل المحلول الفارغ عند الأطوال الموجية (190-350nm)، وأظهر طيف امتصاص PAR و GUA و BHH و CPAM تداخلا قويا فيما بينها يصعب معه تقديرها بصورة أنية باستعمال طيف المرتبة الصفري، لذلك تم استعمال طريقة مشتقة الطيف، والتي تعد من الطرق التحليلية المهمة والتي يمكن استعمالها في تقدير تركيز مكون معين في مزيج من العينات، اعتمادا على نمط المشتقة الأولى والثانية والثالثة والرابعة، والتي نجحت في تقدير المركبات الأربعة كل على حدة وفي مزائجها التحضيرية. والشكل رقم (2) يوضح أطراف المرتبة الصفري وأطراف المشتقات الأربعة للمواد النقية.

### بناء منحنيات المعايرة

تم بناء منحنيات المعايرة للمركبات الأربعة في مزائجها وكما يلي:

**الباراسيتامول:** تم بناء منحنيات المعايرة لعقار PAR بالاعتماد على عدة أنواع من القياسات وهي قياس ارتفاع قمة إلى خط الأساس (area under peak)، والتي أجريت على أطراف المشتقة الأولى والثانية والثالثة والرابعة والتي استعملت لأغراض التحليل الكمي لمركب PAR بصورته النقية وفي مزائجها. وأظهرت نتائج قياسات المشتقة الأولى أنه عند تثبيت تراكيز GUA و BHH و CHM وتغيير تركيز PAR، فإن ارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي (238 nm)، ومساحة القمة بين الأطوال الموجية (228-248 nm) يتناسبان مع تركيز PAR. لذلك تم استعمالهما في تقديره، ونفس المزائج تم الاستفادة من طيف المشتقة الثانية اعتمادا على ارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي (310 nm) و (222 nm). والجدول رقم (1) يبين بيانات منحنيات المعايرة للمشتقة الأولى بالتراكيز (20-45 µg/mL) وللمشتقة الثانية بتراكيز (5-45 µg/mL) لمركب PAR في مزائجها بوجود تراكيز ثابتة من CPAM و BHH و GUA (10 µg/mL).

**الكوافنسين:** أظهرت منحنيات المعايرة لتقدير عقار GUA باستعمال أطراف المشتقة الأولى والثانية والثالثة والرابعة وعند الأطوال الموجية المختارة بالاعتماد على قياس ارتفاع القمة إلى خط الأساس إمكانية تقديره في شكله النقي وفي مزائجها. وتبين بيانات منحنيات المعايرة في الجدول رقم (1) إمكانية تقدير مركب GUA بالتراكيز (5-30 µg/mL) في مزائجها عند الطول الموجي (290 nm) باستعمال المشتقة الأولى، اعتمادا على ارتفاع القمة إلى خط الأساس، وبالتراكيز (10-35 µg/mL) عند الطول الموجي (254 nm) باستعمال المشتقة الثانية، ونفس التراكيز عند الطول الموجي (296.4 nm) بالاعتماد على ارتفاع القمة إلى خط الأساس للمشتقة الثالثة، وعند الطول الموجي (284 nm) بالاعتماد على ارتفاع القمة إلى خط الأساس بالتراكيز (10-40 µg/mL) للمشتقة الرابعة (بوجود تراكيز ثابتة PAR 22.5 µg/mL و BHH و CPAM 10 µg/mL) ولجميع المشتقات.

**هيدروكلوريد البروموكسين:** تم بناء منحنيات المعايرة لمركب BHH بالاعتماد على قياس ارتفاع القمة إلى خط الأساس (peak to base line)، وحساب المساحة تحت القمة والتي أجريت على أطراف المشتقة الأولى والثانية والتي استعملت لأغراض التحليل الكمي له بصورته النقية وفي مزيجها. وأظهرت نتائج قياسات المشتقة الأولى للمزيج بأن المساحة تحت القمة للأطوال الموجية كانت (310-356 nm) للتراكيز (10-50 µg/mL) وارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي 296 nm للتراكيز (10-35 µg/mL)، بوجود تراكيز ثابتة من PAR و GUA و CPAM (22.5 و 10 و 10 µg/mL) على التوالي وللحالتين تتناسب مع تراكيز BHH، ولذلك فقد رسمت منحنيات المعايرة لتقدير BHH عند مناطق الطيف المشار إليها، واستعملت في تقديره. كما تمت الاستفادة من أطراف المشتقة الثانية في تقدير BHH بصورته النقية وفي مزائجها، حيث وجد أن المساحة تحت القمة المحصورة ما بين الأطوال الموجية (294-330 nm) وارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي 314 nm وارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي 264 nm للتراكيز (5-50 µg/mL).

### تقدير الباراسيتامول والكوافنسين والبروموكسين والكلورفينرامين مالييت بصورة أنية بمطيافية المشتقة الأولى والثانية والثالثة والرابعة

تم نقل أحجام مختلفة (0.5-6 ml) من المحلول القياسي لكل مكون على حدة إلى أربعة سلاسل من قناني حجمية سعة (10 ml) تحوي أحجاما ثابتة من المكونات الثلاث الأخرى (1, 1.5, 1 ml) لكل من PAR و GUA و BHH و CPAM على التوالي. وكانت تراكيز جميع المكونات (100 µg/mL). ثم خففت محاليل المزائج بالمذيب المعتمد في الدراسة إلى حد العلامة، وسجل طيف الامتصاص لكل منها. بعد ذلك تم اشتقاق الطيف الاعتيادي (طيف المرتبة الصفري) المسجل لكل مزيج للحصول على المشتقة الأولى (D1) والمشتقة الثانية (D2) والمشتقة الثالثة (D3) والمشتقة الرابعة (D4) لتلك المزائج.

### مصادقية الطريقة

تم التحقق من مصادقية الطريقة اعتمادا على دليل المؤتمر الدولي للمجانسات - International conference on Harmonizations (ICH) باستعمال مجموعة من العوامل كالدقة (accuracy) والتوافق (precision) والخطية (linearity) وحد الكشف (limit of detection) والحد الكمي (limit of quantification) (25).

### تطبيق الطريقة

تم تطبيق الطريقة المقترحة بإجراء خمسة تكرارات لكل عملية قياس أجريت لكميتين مختلفتين لكل مكون، اختيرت لتقع ضمن تراكيز منحنيات المعايرة. وهذه التراكيز هي (22.5، 33.7 µg/mL) PAR و (10، 15 µg/mL) لكل من GUA و CPAM و BHH (عند أخذ تراكيز كل مكون يكون بوجود المكونات الأخرى). وبعد ذلك تم اشتقاق طيف المرتبة الصفري المسجل لكل منها للحصول على المشتقة الأولى (D1) والمشتقة الثانية (D2) والمشتقة الثالثة (D3) والمشتقة الرابعة (D4).

### تحليل عينات دوائية لعقار الباراسيتامول والكوافنسين والبروموكسين والكلورفينرامين مالييت بطريقة الإضافات القياسية المتعددة

من أجل اختبار إمكانية تقدير المكونات الأربعة في مستحضرها الصيدلاني باستعمال مطيافية المشتقة الأولى والثانية والثالثة والرابعة بطريقة الإضافات القياسية المتعددة، فقد تم نقل أحجام ثابتة (1 ml) من محلول المستحضر الصيدلاني ذي التراكيز (450 و 200 و 200 و 200 µg/mL) للمركبات PAR و GUA و BHH و CPAM على التوالي إلى أربع مجاميع من القناني الحجمية سعة (10 ml)، تتكون كل مجموعة من (7) قنن، ثم أضيفت إليها أحجام متزايدة من المحاليل القياسية لكل مكون (0-3 ml) ذوات التركيز (100 µg/mL)، وأكمل المحلول بالمذيب إلى حد العلامة (أجريت العملية لكل مكون)، وبعدها تم تسجيل طيف الامتصاص لكل محلول لمدى من الأطوال الموجية تراوحت بين (190-350 nm)، ثم اشتقت الأطراف المسجلة وأجريت عليها القياسات المطلوبة، وبنيت منحنيات المعايرة للإضافات القياسية برسم قيم المشتقات مقابل حجم المحلول القياسي للعقار المضاف بالاعتماد على ارتفاع القمة إلى خط الأساس ومساحة القمة ونقطة التقاطع الصفري.

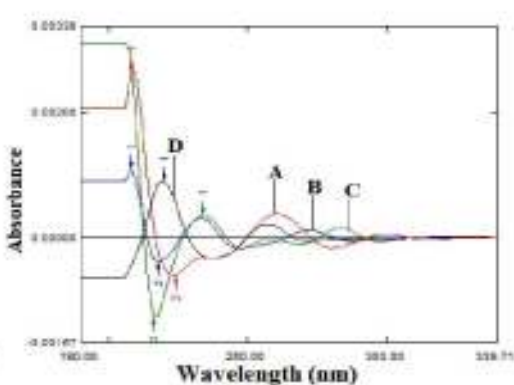
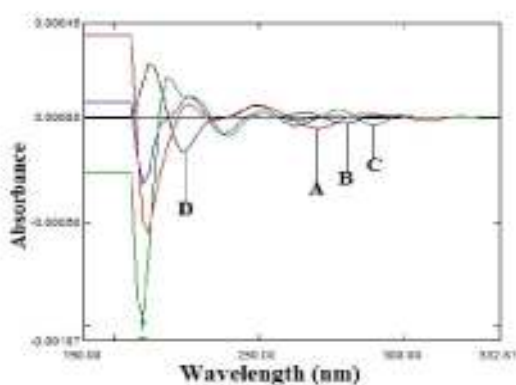
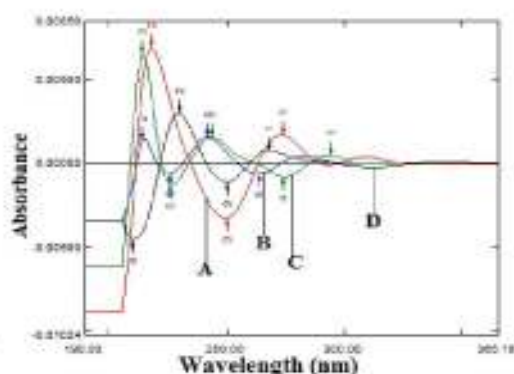
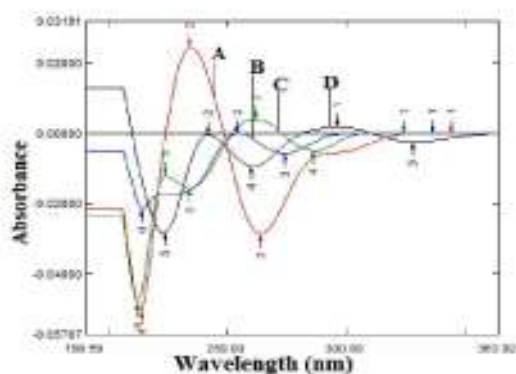
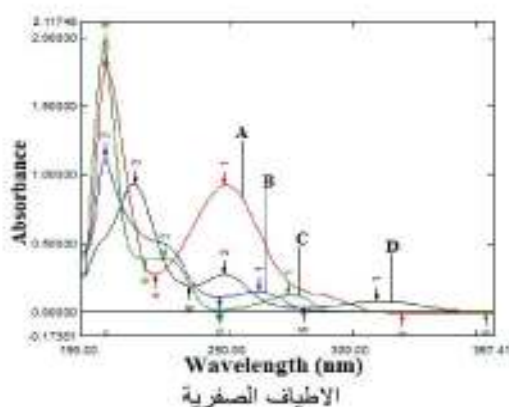
### النتائج والمناقشة

تم تقدير الباراسيتامول والكوافنسين وهيدروكلوريد البروموكسين والكلورفينرامين مالييت بواسطة مطيافية المشتقة في مستحضرها الصيدلاني رباعي المكونات.

نقطة التقاطع الصفري للمركبات الثلاث الأخرى عند الطول الموجي (nm286.5) ، وارتفاع القمة إلى نقطة التقاطع الصفري لكل من GUA and PAR عند الطول الموجي (nm264) والذي يتناسب مع تركيز CPAM ، وكانت الخطية (5-45µg/mL) في الحالتين. كما تمت الاستفادة من أطيف المشتقة الثالثة لإيجاد تركيز CPAM في مزاجه ، إذ وجد أنه بالإمكان الاستفادة من قياس ارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي (nm 255) في تقدير CPAM وقد كانت الخطية (15-40µg/mL) بوجود بقية مكونات المزيج بتركيز ثابتة قدرها (2.5µg/mL) و(10µg/mL) لكل من PAR و GUA و BHH وللمشتقتين.

و (10-40 µg/mL) لارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي 232 nm بوجود نفس تراكيز المكونات الأخرى المستعملة في المشتقة الأولى تتناسب مع تراكيز BHH. ويوضح الجدول رقم (1) بيانات منحنيات معايرة BHH.

**الكورفينارامين مالميت:** تم اشتقاق الطيف الصفري لمركب CPAM إلى المشتقات الأولى والثانية والثالثة والرابعة. وبنيت منحنيات المعايرة لعقار CPAM، والتي أجريت على أطيف المشتقة الثانية والثالثة وأثبتت نجاحها في التحليل الكمي للمركب CPAM وفي مزاجه، في حين لم تنتج المشتقتين الأولى والرابعة في ذلك. وأظهرت نتائج قياسات المشتقة الثانية ارتفاع القمة إلى



شكل رقم (2): اطيف المشتقة الصفرية والمشتقات للمركبات النقية بتركيز (10 PPM) لكل من (A) PAR و (B) CPAM و (C) GUA و (D) BHH

جدول رقم (1): نتائج تحليل المكونات الأربعة باستعمال المشتقات الأولى والثانية والثالثة والرابعة ودقة وتوافق وحساسية الطريقة

Drug	Order of Derivative	Mode of Calculation	Wavelength nm	Linearity $\mu\text{g/mL}$	Regression Equation	R <sup>2</sup>	RSD%	Rec%	LOD $\mu\text{g/mL}$	LOQ $\mu\text{g/mL}$
PAR	D1	Peak to baseline	238	20-45	$Y=0.0022x+0.0404$	0.9971	1.0003	99.1970-102.5065	2.6571	8.8570
		Peak area	228-248	20-40	$Y=0.0162x-0.0228$	0.9841	0.9518	96.5463-104.2536	2.7243	9.0810
	D2	Peak to baseline	310	5-45	$Y=0.00002x-0.0003$	0.9998	0.9926	100.0000-104.7619	0.6266	2.0888
			222	5-45	$Y=0.0002x-0.0002$	0.9994	1.2089	95.0000-99.2500	0.6387	2.1290
GUA	D1	Peak to baseline	290	5-30	$Y=0.0005x-0.0034$	0.9997	0.7832	102.6000-104.8000	0.7254	2.4180
	D2	Peak to baseline	254	10-35	$Y=-0.0003-0.002$	0.9962	0.8501	95.1429-101.8889	1.9843	6.6113
	D3	Peak to baseline	296.4	10-35	$Y=5E-06-3E-05$	0.991	1.0154	95.2000-104.0000	1.8102	6.0340
	D4	Peak to baseline	284	10-40	$Y=-3E-06x-2E-05$	0.9932	1.8257	96.6667-105.0000	2.0112	6.7040
BHH	D1	Peak to baseline	296	10-35	$Y=0.0002x-0.0068$	0.9992	0.3267	95.0000-98.7500	2.1398	7.1327
		Peak area	310-356	10-50	$Y=-0.0069+0.0287$	0.9943	1.0203	95.4428-104.6014	1.7194	5.7313
	D2	Peak to baseline	314	5-50	$Y=-2E-05x+0.0001$	0.9977	1.2011	98.5714-105.0000	0.5991	1.9970
		Peak area	294-330	5-50	$Y=-0.0003x-0.0004$	0.9954	0.0021	95.7667-104.4444	0.8002	2.6673
		Peak to baseline	264	10-50	$Y=-5E-05-0.0005$	0.999	0.9801	102.0000-105.0000	1.997	6.6567
		Peak to baseline	232	10-40	$Y=0.0002+0.0001$	0.9946	1.7520	95.0000-100.0000	2.009	6.6967
CPAM	D2	Peak to zero crossing of another three components	286.5	5-45	$Y=4E-05x+0.0005$	0.9967	0.8291	95.50000-103.3333	0.8851	2.9503
		Peak to zero crossing of PAR and GUA	264	5-45	$Y=-7E-05x+0.003$	0.9971	0.5892	95.2381-104.0000	0.7729	2.5763
	D3	Peak to baseline	255	15-40	$Y=-1E-05x+0.0001$	0.9942	1.0023	100.0000-105.0000	2.3584	7.8613

وللأطوال الموجية ذات العلاقة بالقياس الكمي للمكونات الأربعة (جدول رقم 1).

#### حد الكشف وحد التقدير

تم اختبار حساسية الطريقة من خلال حد الكشف (LOD) وحد التقدير (LOQ)، إذ تراوحت قيمتهما على التوالي ما بين (0.5991 و 2.7243  $\mu\text{g/mL}$ ) و (1.9970 و 9.0810  $\mu\text{g/mL}$ )، مما يدل على أن الطريقة ذات حساسية جيدة (جدول رقم 1).

#### تأثير السواغات

تمت دراسة تأثير السواغات التي تضاف من أجل تحسين المنتج الصيدلاني من نواح عدة على التقدير الكمي لكل من PAR و GUA و BHH و CPAM في مستحضرها الصيدلاني، ووجد أن النشا ليس له تأثير حتى عند وجوده بتركيز يصل إلى عشرة أضعاف تركيز أعلى مكون، في حين كان تأثير بقية المكونات واضحاً عند الحد المذكور. بينما لم يكن لها تأثير عندما كانت تراكيزها خمسة أضعاف تركيز أعلى مكون، وقد وجد أنه بالاستفادة من المشتقة الأولى واعتماداً على ارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الأطوال

#### الدقة والتوافق

تم حساب دقة وتوافق الطريقة. وبينت النتائج أن الطريقة ذات دقة وتوافق جيدين، إذ تراوحت قيمة Rec% و RSD% باستعمال المشتقة الأولى اعتماداً على ارتفاع القمة إلى خط الأساس والمساحة تحت القمة ما بين (96.5463-104.2536) و (0.9518-1.0003) و (104.8000-102.6000) و (0.7832-0.9998) و (95.0000-104.6014) و (0.3267-1.0203) لكل من PAR و GUA و BHH على التوالي، وباستعمال المشتقة الثانية اعتماداً على ارتفاع القمة إلى خط الأساس والمساحة تحت القمة ما بين (98.5714-105.0000) و (0.5991-1.2011) و (95.7667-104.4444) و (0.8002-0.9954) و (102.0000-105.0000) و (0.9801-0.999) و (95.0000-100.0000) و (2.009-6.6967) و (95.50000-103.3333) و (0.8291-0.9967) و (95.2381-104.0000) و (0.7729-1.0023) لكل من CPAM و GUA و BHH على التوالي، وباستعمال المشتقة الثالثة اعتماداً على ارتفاع القمة إلى خط الأساس ما بين (100.0000-105.0000) و (1.0023-0.9942) و (104.0000-105.0000) و (2.3584-7.8613) و (105.000-96.6667) و (1.8257-0.9932) للمركب GUA

واختيرت التراكيز لتقع ضمن تراكيز منحنيات المعايرة، وهذه التراكيز هي (22.5، 33.75 µg/mL) لمركب PAR و (10، 20 µg/mL) لكل من GUA و CPAM و BHH. وأجري مسح للأطوال الموجية بين (200-400 nm) لتسجيل الطيف الصفري، وبعد ذلك تم اشتقاق طيف المرتبة الصفريّة لكل منها للحصول على المشتقات الأولى والثانية والثالثة والرابعة وعند الأطوال الموجية ذات العلاقة. ولوحظ أن الطريقة نجحت في تقدير التراكيز للمكونات الأربعة في المزيج ونسب استرجاعية مئوية Rec% تراوحت ما بين 95-105% وانحراف معياري نسبي RSD% تراوح ما بين 0.0073-1.9345% (جدول رقم 2).

الموجية المذكورة في جدول رقم (1) وللمكونات الأربعة، كانت قيم Rec% تتمركز حول 100% و RSD% أقل من 1%.

### نتائج تحليل عينات دوائية لكل من PAR و GUA و BHH و CPAM

**1- باستخدام الطريقة المباشرة:** من أجل أن تأخذ الدراسة مداها التطبيقي لتكون ذات فائدة علمية وتطبيقية، فقد تم تطبيق الطريقة المقترحة بإجراء خمسة تكرارات لكل عملية قياس أجريت لكميتين مختلفتين لكل مكون من مكونات المستحضر الصيدلاني الأربعة،

جدول رقم (2): تقدير PAR و GUA و BHH و CPAM في مزيجها بالطريقة المباشرة

Drug	Order of Derivative	Mode of Calculation	Wavelength nm	Concentration µg/mL	RSD%	Rec%
PAR	D1	Peak to baseline	238	22.5 33.75	1.0523 1.0869	101.9256 96.4591
		Peak area	228-248	22.5 33.75	0.8284 1.1045	98.7251 105.0000
	D2	Peak to baseline	310	22.5 33.75	0.8987 1.2004	99.6667 100.5387
			222	22.5 33.75	1.9345 0.9989	98.0001 103.3333
GUA	D1	Peak to baseline	290	10 15	0.9052 1.3258	101.1111 95.2392
	D2	Peak to baseline	254	10 15	1.10281 1.3965	100.0287 104.0000
	D3	Peak to baseline	296.4	10 15	0.9936 1.4583	96.5467 103.0034
	D4	Peak to baseline	284	10 15	1.9876 1.2968	104.3334 104.0000
BHH	D1	Peak to baseline	296	10 15	0.8791 0.6945	99.3333- 101.7690
		Peak area	310-356	10 15	1.3928 1.7854	99.6552 98.6667
	D2	Peak to baseline	314	10 15	1.8123 0.5948	95.1254 104.0000
		Peak area	294-330	10 15	0.0678 0.0073	99.2333 101.6666
		Peak to baseline	264	10 15	1.7251 1.7569	100.0000 99.0023
		Peak to baseline	232	10 15	1.54390 1.6008	98.1925 100.56710
	D2	Peak to zero crossing of another three components	286.5	10 15	1.6590 1.9001	99.0055 104.9476
			255	15	1.0001	104.0000
CPAM	D3	Peak to baseline	255	15	1.0001	104.0000

وانحراف معياري نسبي RSD% قدره 0% ، مما يدل على نجاح الطريقة.

وقدر GUA في مزائج باستعمال المشتقة الثالثة اعتماداً على ارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي 296.4 nm ، وكانت معادلة الخط المستقيم  $Y = -0.00008X - 0.00008$  وقيمة  $R^2$  تساوي 0.9944 وباسترجاعية مئوية Rec% قدرها 100% وانحراف معياري نسبي RSD% قدره 0% ، مما يدل على نجاح الطريقة.

وقدر CPAM في مزائج باستعمال المشتقة الثانية اعتماداً على ارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي 264 nm وكانت معادلة الخط المستقيم  $Y = -0.0005X - 0.0005$  وقيمة  $R^2 = 0.9933$  وبنسبة استرجاعية مئوية Rec% وانحراف معياري نسبي RSD% قدرهما 100% و 0.000045% على التوالي. في حين تمت الاستفادة من المشتقة الثالثة اعتماداً على ارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي 255 nm وكانت معادلة الخط المستقيم

**2- طريقة الإضافات القياسية المتعددة:** أظهرت نتائج الإضافات القياسية إمكانية استعمال هذه الطريقة في التقدير الكمي لكل من CPAM و BHH و GUA و PAR في مستحضرها الصيدلاني بالاعتماد على المشتقات الأولى والثانية والثالثة والرابعة لأطياف تلك المكونات في المناطق المختارة من تلك الأطياف. وقد تم تقدير PAR في مزائج باستعمال المشتقة الأولى للطيف اعتماداً على المساحة تحت القمة المحصورة بين الأطوال الموجية (228-248 nm) ، وكانت معادلة الخط المستقيم  $Y = 0.0687X + 0.069$  وقيمة الاسترجاعية المئوية Rec% تساوي 100.4367% ، وقيمة معامل الانحراف القياسي النسبي RSD% تساوي 1.9096%.

وقدر GUA في مزائج باستعمال المشتقة الثالثة اعتماداً على ارتفاع القمة إلى خط الأساس عند الطول الموجي 296.4 nm ، وكانت معادلة الخط المستقيم  $Y = -0.00008X - 0.00008$  وقيمة  $R^2$  تساوي 0.9944 وباسترجاعية مئوية Rec% قدرها 100%

$Y = -0.0005X - 0$  وينسبة استرجاعية مئوية Rec% وانحراف معياري نسبي RSD% قدرهما 100% و 0.00037% على التوالي، وقيمة  $R^2$  تساوي 0.9933 (جدول رقم 3).

جدول رقم (3) : نتائج طريقة الإضافات القياسية لتقدير PAR و GUA و BHH و CPAM في مزيجها

Drug	Order of Derivative	Mode of Calculation	Wavelength nm	concentration $\mu\text{g/mL}$	Regression Equation	$R^2$	Rec%
PAR	D1	Peak area	228-248	10	$Y = 0.0687x + 0.069$	1.9096	100.4367
GUA	D3	Peak to baseline	296.4	10	$Y = 8E-05 - 8E-05$	0.994	100
BHH	D1	Peak to baseline	296	10	$Y = -0.0711x - 0.0711$	0.09843	99.1632
		Peak area	330	10	$Y = -0.0031 - 0.0031$	0.995	100
	D2	Peak to baseline	314	10	$Y = -1E-04x + 1E-04$	1	100
		Peak area	302-330	10	$Y = -0.0003x - 0.0004$	0.9947	100
CPAM	D2	Peak to zero crossing of PAR and GUA	264	10	$Y = -0.0005x - 0.0005$	0.9933	100
	D3	Peak to baseline	256	10	$Y = 9E-05x + 9E-05$	0.999	99.2861

يمثلان الانحراف المعياري للطريقة الدستورية والطريقة المقترحة على التوالي، وتمثل  $\bar{X}$  الوسط الحسابي لمجموعة من القراءات و  $\mu$  تمثل القيمة الحقيقية و  $n$  عدد القراءات و  $X_i$  تمثل كل قراءة من القراءات.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \dots \dots \dots (4)$$

#### الاستنتاجات

من أجل التقدير الكمي الأنفي لكل من PAR و GUA و BHH و CPAM في أشكالها النقية وفي مستحضرها الصيدلاني، تم استعمال طريقة مشتقة الطيف بنجاح دون الحاجة إلى فصل، والحصول على نتائج جيدة بالاعتماد على ارتفاع القمة إلى خط الأساس، ومساحة القمة وارتفاع القمة إلى نقطة التقاطع الصفري، وكانت الطريقة سهلة واقتصادية وحساسة وذات دقة وتوافق جيدين. لذلك يمكن استعمالها في الأعمال الروتينية اليومية لتقدير المركبات موضوع الدراسة.

#### المصادر

1. Martin N. and Hans-Georg S. (2001). Organic-chemistry drugs and their synonyms. 8<sup>th</sup> ed. Vol. 1. Wiley-VCH. New York, USA.
2. Meyeres FH. and Jawetz JA. (1968). Review of Medical Pharmacology. LMP, Los Angeles, California.
3. van Boxel CJ.; Santos B. and Edwards IR. (2008). Drug Benefits and Risks: International Textbook of Clinical Pharmacology-Revised. 2<sup>nd</sup> ed. Los Press.
4. Wang SF.; Xie F. and Hu RF. (2007). Carbon-coated nickel magnetic nanoparticles modified electrodes as a sensor for determination of acetaminophen. Sens. Actuat. B: Chem. 123(1):495-500.
5. Boopathi M.; Won MS. and Shim Y B. (2004). A sensor for acetaminophen in a blood medium using

وللتأكد من مصداقية الطريقة ولعدم وجود طريقة معيارية أو طريقة أخرى لتقدير المكونات الأربعة مع بعض في مزيجها من أجل مقارنة النتائج، تم اللجوء إلى حساب قيمة  $t$  عند مستوى ثقة 95 % والمركبات الأربعة بتطبيق المعادلة التالية (23):

$$\pm t = (x' - \mu) \frac{\sqrt{n}}{s} \dots \dots \dots (1)$$

كما تم مقارنة نتائج الطريقة المباشرة مع نتائج طريقة الإضافات القياسية باستعمال اختبار  $t$  وعند مستوى ثقة 95 % بتطبيق المعادلة التالية:

$$\pm t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s} \sqrt{\frac{n_1 * n_2}{n_1 + n_2}} \dots \dots \dots (2)$$

وتم حساب قيمة الانحراف المعياري المشترك (S) من المعادلة التالية:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^5 (X_{i1} - \bar{X}_1)^2 + \sum_{i=1}^5 (X_{i2} - \bar{X}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}} \dots \dots \dots (3)$$

وكانت قيمة  $t$  الجدولية (2.766) و (2.306) عند (4) و (8) من درجات الحرية أكبر من قيمة  $t$  المحسوبة والتي تراوحت ما بين (2.0136 – 1.8251) و (2.600 – 2.3285) في الحالتين على التوالي، مما يعني أن الطريقة ذات مصداقية، وأن الخطأ فيها خطأ عشوائي.

كما تمت مقارنة نتائج تطبيق الطريقة ولكل مكون في مزيج المستحضر الصيدلاني مع نتائج الطريقة الدستورية لكل مكون على حدة، وذلك باستعمال اختبار  $F$ . وبينت النتائج أن لا وجود لفروق إحصائية بين الطريقتين عند مستوى ثقة 95% ولأربعة من درجات الحرية، إذ كانت قيمة  $F$  الجدولية (6.39) أكبر من قيمة  $F$  المحسوبة التي تراوحت ما بين (5.97-6.26) للمكونات الأربعة اعتماداً على المعادلة رقم 4. وبذلك على أن الطريقة المقترحة لا تختلف من حيث الدقة عن الطريقة الدستورية، وأن الفرق في الانحراف المعياري في كلا الطريقتين ناتج عن أخطاء عشوائية، إذ إن  $S_1$  و  $S_2$

oxtriphylline and bromhexine hydrochloride in tablet dosage form by RP-HPLC. Asian J. Chem. 29(7): 1103-1109.

23. Araujo P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. J. Chromatog. B. 877(23):2224-2234.

a Cu (II)-conducting polymer complex modified electrode. Analytica. Chimica. Acta. 512(2):191-197.

6. Goicoechea HC. and Olivieri AC. (1999). Simultaneous multivariate spectrophotometric analysis of paracetamol and minor components (diphenhydramine or phenylpropanolamine) in tablet preparations. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 20(1):255-261.

7. Shama SA. (2002). Spectrophotometric determination of phenylephrine HCl and orphenadrine citrate in pure and in dosage forms. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 30(4): 1385-1392.

8. Pharmacopoeia (1996). Published by the controller of publication, New Delhi.

9. United State Pharmacopoeia. (2002). United State Pharmacopoeial Convention. P.: 1263.

10. Current Index of Medical Specialties. (2006). Medimedia Health Private Ltd.: Bangalore. P.: 253.

11. United States Pharmacopeia XXVII. (2004). The National Formulary, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD. P.: 886.

12. Marsden JS.; Strickland CD. and Clements TL. (2004). Guaifenesin as a treatment for primary dysmenorrhea. J. Am. Board. Family. Pract. 17(4):240-246.

13. Suneetha G.; Venkateswarlu P. and Prasad PSS. (2012). Determination of Guaifenesin and Dextromethorphan by UPLC. Der Pharma Chem. 4(3): 1019-1025.

14. Tapsoba I.; Belgaied JE. and Boujlel K. (2005). Voltammetric assay of Guaifenesin in pharmaceutical formulation. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 38(1):162-165.

15. Abdelkawy M.; Metwally F.; El- Raghy N.; Hegazy M. and Fayek N. (2011). Simultaneous determination of ambroxol hydrochloride and guaifenesin by HPLC, TLC-spectrodensitometric and multivariate calibration methods in pure form and in cough cold formulations. J Chromatograph. Separat. Techn. 2(112):2-8.

16. Kibbe AH. (2000). Handbook of Pharmaceutical Experiments. 3<sup>rd</sup> ed. Pharmaceutical Press, NewYork. P.: 98.

17. Martindale W. (2007). The Extra Pharmacopoeia. 35<sup>th</sup> ed. London, The Complete Drug Reference, Edited by Sean C Sweetman, Pharmaceutical Press, UK.

18. The Stationery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA). (2010). British Pharmacopoeia on CD-Rom. 6<sup>th</sup> ed. London.

19. Martindale W. (1993). The Extra Pharmacopoeia. 30<sup>th</sup> ed. The Pharmaceutical Press, London.

20. Pawar PY.; Sandip H.; Megha S. and Arti A. (2017). Spectrophotometric estimation and validation of paracetamol and domperidone by different method from pure and tablet dosage form. Int. J. Drug. Res. Technol. 3(2): 7-12.

21. Shetti N. and Nayak D. (2017). Electrochemical detection of chlorpheniramine maleate in the presence of an anionic surfactant and its analytical applications. Canad. J. Chem. (999):1-7.

22. Chakravarthi K. and Devanna N. (2017). Simultaneous estimation of salbutamol,

**N.B** The views expressed in this issue are of the authors and do not necessarily reflect the views of the Editorial Board or the policies of the International Centre.

**Copyright © 2017** by the International Centre for Advancement of Sciences and Technology.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or copied in any form or by any means without prior written permission from the Editor-in-Chief of the Journal.