# The Role of Chitinase and Cellulase Enzymes on Antagonism Process between some of Biocontrol Fungi and Isolated Pathogenic Fungifrom Rice Soil in AL-Najaf governorate

# دور إنزيمي الكايتينيزوالسيليوليزفي عملية التضاد بين بعض فطريات المقاومة الاحيائية وبعض الفطريات المعزولة من ترب الرز في محافظة النجف

م.د. نهاد حبيب مطلك الازيرجاوي
كلية الزراعة – جامعة الكوفة

أ.د. مجيد متعب ديوان
كلية الزراعة – جامعة الكوفة

أ. د. جواد كاظم الجنابي
كلية العلوم –جامعة بابل

**الخلاصة**

أجريت دراسة مختبرية لعملية التضاد بين بعض فطريات المكافحة الاحيائية *Trichodermaharzianum* بعزلتيه الاسترالية والتحدي والفطر *Chaetomiumelatum* وبين بعض الفطريات الممرضة المعزولة من ترب الرز في محافظة النجف وقد تضمنت الدراسة تأثير آليات التضاد antagonisim بين تلك الفطريات ودراسة افرازها للانزيمات المحللة للجدار الخلوي وقدرة تلك الفطريات على إنتاج إنزيمي الكايتنيزوالسيليوليز وأثرهما في تثبيط نمو الفطريات المرضية.

ولغرض الحصول على نتائج جيدة توضح دور إنزيمي الكايتنيزوالسيليوليز اللذان ينتجان من فطريات المكافحة الاحيائية اثناء عملية التضاد مع بعض الفطريات المرضية التي تحتوي على الكايتين والسيليلوز في جدرانها الخلوية ، ولأهمية هذين الإنزيمين خلال عملية التطفل والتنافس أجريت دراسة مختبرية لتحديد إنتاجهما باستعمال الوسط السائل MSM (Minimal Syntheti Medium ) وCMC( Carboxylmethylecellulose).

يمكن إيجاز أهم نتائج هذه الدراسة بما يأتي:-

1 - كان أكثر أجناس الفطريات ترددا" قبل الزراعة الجنس *Aspergillus* اذ بلغت نسبة تردده 23.53% في حين تفوق الجنس *Trichoderma* في نهاية الموسم إذ بلغت نسب تردده 39.00% كما تفوق النوع *nigerAspergillus* . في نسبة التردد قبل الزراعة في حين ازدادت نسبة تردد النوع *harzianum.Trichoderma* نهاية الموسم.

2 – كان أفضل فطريات المقاومة الاحيائية في التضاد الفطر *austuralianharzianumTrichoderma* ، إذ بلغت مسافات التثبيط مع الفطريات المرضيه *Fusarium.oxysporum* و *Rhizoctoniasolan*و *Fusariumpseudograme niarum*.,2.552.412.11, سم على التوالي.

3- وجد أن العزلة *austuralianharzianumTrichoderma* قد حققت أعلى فعالية انزيمية للكايتينيز عند إستخدام الغزل الفطري الجاف للفطريات الممرضة *F.o* ،*R.s* ، *F. pg* كمصدر كربوني (1%) في الوسط MSM ،اذ بلغت 0.287,0.304,0.326 وحدة / مل على التوالي.

4 - تفوقت العزلة *austuralianharzianumTrichoderma* في إفراز أنزيمالسيليوليز في الوسط Vogel وبوجود CMC كمصدر للكاربون اذ بلغ تركيزه 0.0953 جزءا" بالمليون.

## Abstract

Laboratory experiment were achieved on antagonism process between some of Biocontrol F *Trichodermaharzianum*(Rifai and Australian Isolates) and *Chaetomiumelatum*and Pathogenic F (*Fusarium.oxysporumRhizoctonia.solan,Fusarium.pseudo.grameniarum* that Isolated from Soils in AL-Najaf governorate

The mechanism of antagonism involve the secretion cell wall degradation enzymes. Prelim experiments revealed that this fungus has the ability to produce cellulase and chitinase which c play an important role in the inhibition of these funji.

In order to gain a better understanding of chitinase enzyme produced by Biocontrol Fungi du antagonism on a some of pathogenic fungi that contained chitin and cellulose in their cell walls laboratory experiment was achieved to determine the appropriate condition for productio enzyme using liquid medium (MSM, Carboxylmethylecellulose CMC).

**Results of this study can be summarized as follows :-**

1 -The genus *Aspergillus* showed the frequency 23.53% at the start of growing , while *Trichoderma* reached the highest frequency 39.00% at the end of growing , *Aspergillusniger* also were the most frequency 12.31% before growing season , wherase*Trichodermaharazianum* attain the highest frequency 19.50%. Results also revealed that all tested fungi have not abilities to secrete aflatoxins .

2- T.h.a was the best fungus antagonistic. which showed inhibition destances 3.15,2.91,2.11 Cm against the pathogenic fungi *Fusarium.oxysporum, Rhizoctonia.solani* and *Fusarium.pseudograminearum* respectively.

3- T.h.a attained the highest activity of Chitinase when used adry mycelium of the pathogenic fungi *F. oxysporium, R. solani, F. pseudograminearum* as the only source of carbon in (MSM) growth medium , which reached 0.326, 0.304,0.287 unit/ml respectively.

4- The Australian isolate of *T. harzianum* was superior in cellulase production in vogels medium (supplemented with CMC) which reached 0.0953 ppm ..

## المقدمة Introduction

تعد المكافحة الاحيائية من الطرق القديمة في مقاومة الافات الا انها تعد حالياً من أعقد الطرائق وأكثرها تقدما في مجال السيطرة على الآفات ، لأن الاستفادة القصوى منها تعتمد على الالمام الجيد بالمعلومات الحياتية و البيئية لكل من الآفة والكائنات المصاحبة لها ضمن النظام البيئي الزراعي (حافظ، 2001) ،ولذلك اتجهت في الآونة الأخيرة الكثير من المؤسسات الزراعية والبحثية نحو إيجاد وسائل بديلة للمكافحة الكيمياوية غير ضارة بالنبات وذات كفاءة عالية في القضاء على المسببات المرضية للنبات ولتلافي الأضرار الجانبية التي تتركها المبيدات الكيمياوية في البيئة وصحة الإنسان، فضلاً عن ظهور سلالات من المسببات المرضية مقاومة لتأثير بعض المبيدات الكيمياوية (Montealegre*et al*., 2003).

ولكي تكون المقاومة الاحيائية فعالة لابد من ان تتوافر جميع مقومات نجاحها فهي تعرف على أنها فعل المفترسات Predators والمتطفلات Parasites والممرضات Pathogens ، والعوامل المضافة لتعزيز آليات عملها في المحافظة على الكثافة العددية للآفة في أوطأ معدل لها ، وبأقل مستوى من الضرر تحت ظروف بيئية محددة لكل من عامل المقاومة الاحيائية والآفة(ديوان ،2004) .

لقد أحدث استعمال فطريات المكافحة الاحيائية خفضاً معنوياً في شدة اصابة النباتات بأمراض تعفن البذور وسقوط البادرات والذبول المتسبب عن أنواع من فطريات التربة الممرضة مثل *Fusarium* و *Pythium* و *Phytophthora* و *Rhizoctonia* (الخزرجي ، 2004 ؛ حسون ، 2005 ؛ علوان ، 2005 و ديوان وآخرون ، 2007) ويعد الفطر *Trichoderma*من أكثر الفطريات شيوعاً وإستعمالاً في هذا المجال بسبب سهولة عزله وسرعة نموه على الأوساط الزرعية الطبيعية وعدم حاجته إلى متطلبات غذائية خاصة (Howell,2000 ;Hunt,1999 ) .

أشارت الدراسات إلى كفاءة أنواع مختلفة من الجنس *Trichoderma* في مكافحة العديد من المسببات الممرضة للنبات بآليات من أهمها التطفل المباشر وإفراز الإنزيمات(Harman *et al*, ) والتنافس(Alabouvette *et al*,1996 ) والتضاد(Harman *et al*,2000) فضلاً عن إنتاج الإنزيمات المحللة للبروتينات مثل Chitinase و Cellulase و Protease و β-1,3gluconase (Kuguk and Kivang ,2002). كما ان المقاومة المستحثة المقاومة التي تستحث أو تحدث بعد التلقيح بمسبب مرضي او مسبب غير مرضي أذ ادى إلى حدوث زيادة في فعالية إنزيم الـ Chitinase وb-1,3-glucanase وperoxidase وcellulase عند المعاملة بالفطر (Harman *et al*., 2004).

ذكر(Hermosa*etal*,2002)ان الفطر *T. harzianum* يأتي في مقدمة أنواع*Trichoderma*المستعملة في تطبيقات المكافحة الإحيائية فهو ينتج العديد من الأنزيمات الا ان أكثرها أهمية في تطبيقات المكافحة الإحيائية هي Chitinase وglucannases وCellulase لقابليتها العالية على تحليل جدران خلايا المسببات المرضية( Lorito,1998 ), وقد اثبتت قدرتها على تحليل المعقد القوي كايتين – كلوكان (glucan – chitin ) في جدران الخلايا المكتملة النمو في الخيوط الفطرية مما يؤدي الى الحد من انتشار المسبب المرضي ويقلل من حدوث الإصابة .

.يعتبر إنزيم الكايتنيز عامل محدد لما يفرزه الفطر *Trichoderma* في أثناء تطفله على الفطريات المرضية للنبات ولوجود مركب الكايتين في جدرانها الذي يكسبها قوة وصلابة تجاه الكثير من المؤثرات الميكانيكية والكيماوية الخارجية( Mercedes *etal* ,2000) يعد إنزيم الكايتنيز من الإنزيمات المستحثة إذ يتوقف إنتاج الإنزيم أو ينخفض مستواه عند عدم وجود المصدر الكاربوني المناسب أو عند وجود الكلوكوز أو النواتج النهائية لتحلل الكايتين (El-Katatny *et al*,2000).

كما إن العديد من الفطريات المشجعة للنمو لها القابلية على افراز انزيم السيليليز بكميات عالية مثل*T.harzianum* و*C.elatum* بينما يفرز الفطر*A.niger*السيليليز ولكن بكميات اقل(Bergquist*etal*,2002؛ Amori and Gargori 2006)، اذ تعتبر الانزيمات التي تنتج بواسطة الفطر*T.harzianum* هي الاكفأ بسبب قابليتهاوكفائتها العالية على التحليل المائي الكامل للمادة الخاضعة ( السيليلوز) الى سكر الكلوكوز وهو سكر قابل للتخمر(Ahmad*etal*,2005 )، حيث يستخدم كمصدر للكاربون كما ويستخدم

CMC )Carboxylmethylecellulose ) كمصدر مهم للكاربون في انتاج انزيم السيليليز، يقوم انزيم السيليليز بتحطيم السيليلوز وتحويله الى ايثانول من خلال تحويل الكتلة الحيةlignocellulosic وبعض المواد الكيمياوية ( *etal*,2008Ahmed ) .

ويتحلل السليلوز مائيا بوساطة انزيم Cellulase وهذا يؤدي في النهاية الى تكوين سكريات احادية تؤكسد الى $Co_2$ بوساطة المايكروبات الهوائية والى احماض عضوية وكحولات وغازات بوساطة المايكروبات اللاهوائية .

ولغرض إجراء دراسة واسعة عن آلية التضاد فقد هدفت الدراسة الى تقدير الفعالية الانزيمية للكايتنيزوالسيليوليز لفطريات المقاومة الاحيائية على الاوساط (MSM و CMC ).

وكانت المحاور الرئيسية للدراسة:-

1. عزل وتشخيص الفطريات المرضية من ترب الرز.
2. اختبار القدرة التثبيطية لفطريات المقاومة الاحيائية ضد الفطريات المرضية.
3. اختبار بعض فطريات المقاومة الاحيائية على افراز إنزيمي الكايتينزوالسيليوليز تقدير الفعالية الانزيمية (وحدة /مل) للكايتنيز وكمية السيليوليز في أثناء تطفلها على الفطريات المرضية .

## المواد وطرق العمل

**الاوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص الفطريات**

1- الوسط Potato Dextrose Broth (P.D.B.)و Potato Dextrose Agar (P.D.A.) وWaterAgar (W.A.) .

2- الوسط((MSM( Minimal Synthetic Medium El-Katatny *et al*,2000 ) لقياس فعالية الكايتينيز.

3- الوسط Vogel . حضر وسط Vogel حسبAhmed (2000, ) لتقدير كمية السيليليز .

**إختبار القدرة التضادية بين الفطريات المشجعة للنمو المستخدمة في البحث والفطريات المعزولة .**

استعملت تقنية الزرع المزدوج في إطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي .P.D.A المعقم لاختبار القدرة التضادية لفطريات المقاومه الحيوية*T. harazianum* (عزلتي التحدي و الاسترالية ) والفطر *C.elatum* مع الفطريات المعزولة *A. niger* و *A. terreus* و , , *A.oryzaeP. oxalicum, P. griseofulvum* ضد الفطريات الممرضة R. solan*i* و *F. pseudogrameniarum* و *F. oxysporum* وتم حساب مسافة التثبيط وفق معادلة (Aghighi *et al* ,2004 ):

## إختبار قدرة فطريات المقاومة الأحيائية على إنتاجإنزيمالكايتينيز .

أضيف الغزل الفطري الجاف(El-Katatny *et al*,2000) لكل من الفطريات الممرضة *R solani* و*F. pseudogrameniarum* و *F. oxysporium*والمحضر حسب الفقرة السابقة كمصدر كاربوني مناسب مباشرة الى وسط انتاج الكايتينيزMSM وبنسبة1% (1 gm/100 ml) و اضيفت أقراص فطريات المقاومة الاحيائية*T. harazianum* (عزلتي التحدي و الاسترالية ) والفطر *C.elatum*كل على حده الى الوسط MSM المعقم والمضاف اليه الغزل الفطري الجاف للفطريات المرضية ، فصل الغزل الفطري وبقايا المصادر الكاربونية والمواد غير المتحللة باستعمال النبذ المركزي بدرجة حرارة 4 م0 وبسرعة 5000xg ولمدة عشر دقائق، مرر الرائق خلال Milipore filter 0.45 واستعمل الرائق مستخلصاً خاماً وقدرت الفعالية الإنزيمية كل 24 ساعة حتى نهاية مدة الحضن بدلالة وحدة/مل من مقدار السكريات المختزلة في المحاليل والمنحنى القياسي لسكر الكلوكوز بعد قياس الامتصاصية على طول موجي )(500 nmSomogyi,1952.يعتمد مبدأ قياس الفعالية الإنزيمية للكايتنيز على مقدار سكر N-acely glucosamine وباقي السكريات المختزلة الناتجة من التحلل الإنزيميللكايتين(Tweddell ,1994).

## إختبار قدرة الفطريات المعزولة على تحليل السيليلوز .

وضعت 3 اقراص بقطر 0.5 سم الفطريات*T. harazianum* (عزلتي التحدي و الاسترالية ) والفطر *C.elatum* كل على حده في دوارق مخروطية سعة 500 ml تحتوي على الوسط الغذائي Vogel اضيف 1 mlمن CMC كمصدر للكاربون للوسط الزرعي ، نميت اللقاحات ولمدة خمسة ايام ووضع في هزاز ثانية rpm (150). نقل بعدئذ الى جهاز الطرد المركزي 10000 rpm حيث يمثل الراسب انزيم السيليليز الخام. اضيف محلول كبريتات الامونيوم 25% لغرض تنقية الانزيم الخام بدرجةحرارةC4 وتم ترشيحه بطريقة Filteration Gel بواسطة جهاز(HPLC ) حيث قيس تركيز انزيم السيليليز(Ahmed2002 ).

## النتائج والمناقشة

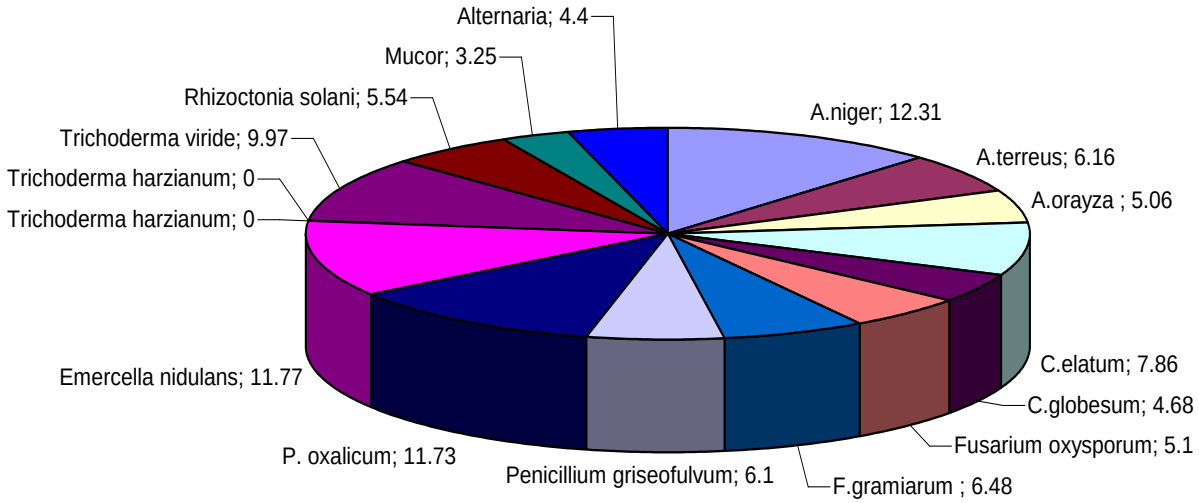
**عزل وتشخيص الفطريـات في الترب المزروعة بالرز**

**أجناس وأنواع الفطريات ومعدل عدد المستعمرات لانواع الفطريات**

أظهرت نتائج العزل من التربة المحيطة بالجذور Rhizospher لنباتات الرز عزل وتشخيص 14 نوعا من الفطريات تقع ضمن 9 اجناس وقد توافقت هذه النتائج مع دراسات سابقة تم فيها عزل عدد من الفطريات من الترب المزروعة بالنباتات الاقتصادية (ديوان، 1994و الحلو، 1995و الموسوي 2003) .كما اظهر النوع *A. niger* اكثر عدد من المستعمرات بلغ 2.110 مقارنة مع الانواع الفطرية الاخرى المعزولة من ترب الدراسة .

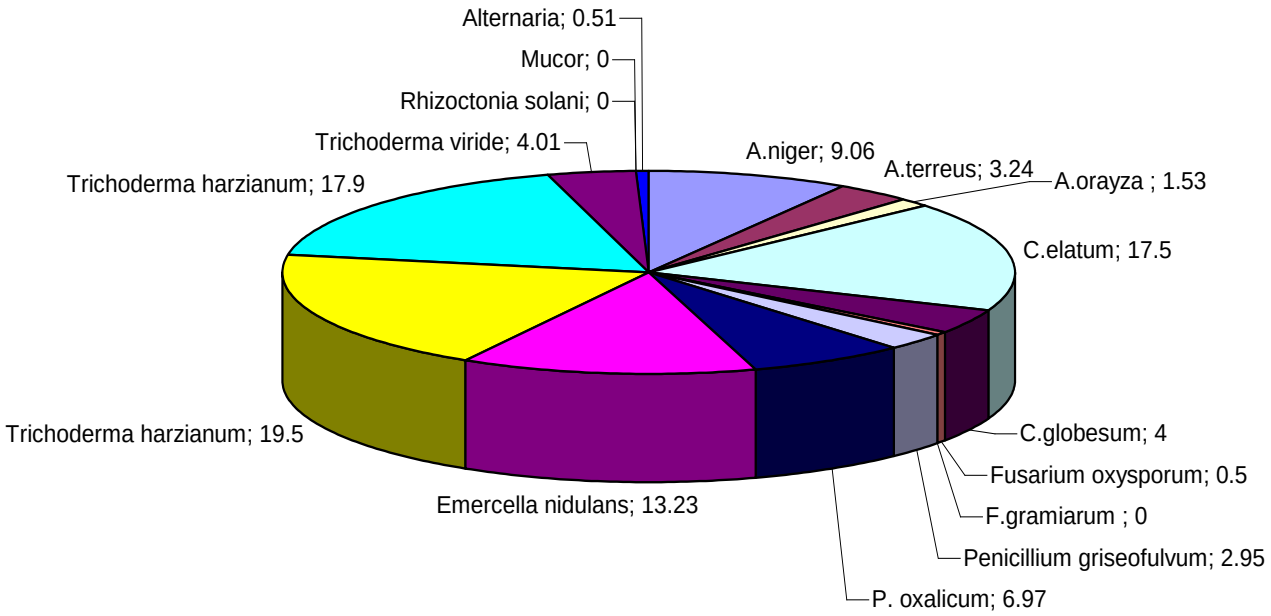
## النسبة المئوية لتردد الأنواع

اشارت نتائج الشكل (1و2) قبل الزراعة الى سيادة انواع الفطر *Aspergillus* على بقية الانواع الاخرى اذ كان تردد النوع *A. niger* هو 12.31 % وهذا ما أكده Abdullah و Al-Bader(1990) اللذان قاما بجمع عينات مختلفة من ترب العراق وأظهرت النتائج أن الأنواع العائدة إلى الجنس *Aspergillus* وهي *A. niger* كانت الأعلى تردداً كثافة وتوزيعاً وظهوراً من بين الأنواع المسجلة ، ثم النوع *P. oxalicum* حيث بلغت نسبت تردده 11.73% وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه (صالح ، 2004), من ان الفطر *Penicillium* يظهر سيادة في أنواع مختلفة من الترب الزراعية في وسط العراق وكذلك ذكر حمد (1998)ان الفطر *Penicillium* شكل نسبة 33.8% من المجموع الكلي للأنواع محتلاًَََََُ المرتبة الثانية وقد يعود السبب إلى ظهور هذا الجنس في عينات الدراسة بنسبة عالية إلى تحمله درجات حرارة متفاوتة ولكلا الفطرين *Aspergillus* و*Penicillium*
( Pugh,1980), كماأظهرت النتائج أيضا إن العزلة الاسترالية للفطر *T.harazianum* وعزلة التحدي والفطر *C.elatum* كانوا الأعلى ترددا في نهاية الموسم اذ بلغ ترددهما 19.5 و17.9و 17.5 % على التوالي ، ويعود السبب إلى منافستهما العالية للفطريات الأخرى من خلال اليات المقاومة الحيوية كافرازاتهما المضادة أو الانزيمات ( Dewan*et al.*1990 ) , أما الأنواع الفطرية التي لم تظهر في نهاية الموسم فكانت *F. oxalicum* . ،*R.solani* و *Mucor sp.* و*F. psedugraminiarum.* ويعود السبب من وراء ذلك إلى التأثر بالأفرازات الجذرية أو إلى نشاط وفعالية الفطر *T.h.* وأنواع الفطريات *Chaetomium* و *Aspergillus* و *Penicillium*(علوان، 2005؛ والحيدري 2007).






**شكل (1)النسب المئوية (%) لتردد أنواع الفطريات المعزولة في 1 غم تربة جافة من ترب الرز قبل الزراعة.**



**شكل (2)النسب المئوية (%) لتردد أنواع الفطريات المعزولة في 1 غم تربة جافة من ترب الرزبعد الزراعة.**

## إختبارالكفاءة التضادية لبعض الفطريات المعزولة على الوسط الغذائي.P.D.A ضد الفطريات الممرضة.*F.oxysporium* و*F*

## *.pseudogrameniarum* و*R.solani*

تبين نتائج الجدول (2) الى ان فطريات المقاومة الإحيائية *T. harazianum* العزلة الاسترالية و*T. harazianum* عزلة التحدي قد حققت قدرة تضادية عالية تجاه الفطر الممرض *oxysporiumF* إذ بلغت مسافات التثبيط 2.55 و 2.37 سم على التوالي، بينما حقق الفطر *.C.elatum* قدرة تضادية بلغ 1.20 سم ، كما اشارت النتائج ايضا الى وجود قدرة تضادية بين الفطريات*T. harazianum* العزلة الاسترالية و*T. harazianum* عزلة التحدي والفطر الممرض*pseudogrameniarumF* أذ بلغت مسافات التثبيط 2.11 و2.05 سم على التوالي ، بينما حقق الفطر*C elatum*قدرة تضادية بلغت 1.12سم ، وجاءت نتائج هذه التجربة متوافقة مع ما توصلت إليه نتائج العديد من الباحثين (Kivance و2003،Kucuk و الرفاعي،2004 و Attitalla ، 2004) والتي أشاروا فيها إلى كفاءة الفطر*T. harazianum* في تثبيط النمو القطري للفطر *oxysporiumF* ، كما إن الفطر *.T. harazianum* له القدرة على إنتاج العديد من الإنزيمات مثل Cellulase و β-(1-3)-glucanase و Chitinase والتي لها القدرة على تحطيم الـ glucans في جدر خلايا الفطر الممرض( Limon 1999 *et al,*) ، وقد ويرجع ذلك الى افراز عدد من السموم مثل FumitermoginB ، Pencillicacid ، Verruculogen ، Viridicatumtoxin ، Ethyleacetate ، Citrinine ، Patulin ، Ochratoxin ( Cook and Baker, 1983;Pitt ,1989).

واشارت النتائج وكما هو موضح في الجدول(2) الى امتلاك الفطريات*T. harazianum* العزلة الاسترالية و*T. harazianum* قدرة تضادية عالية ضد الفطر الممرض*R.solani*بصورة واضحة إذا بلغت مسافة التثبيط2.41و2.25 سم على التوالي ، بينما اظهرالفطر. *C elatum* قدرة تضادية قليلة اذ بلغت 0.71 سم على ، ان هذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه (شريف وآخرون 1988، والعيساوي 2006 ).

إن سيادة فطر المقاومة الأحيائيه في المزرعة المزدوجة يعود إلى قدرته الكبيرة في إنتاج الإنزيمات التي تساعد على تحليل خلايا العائل و إمكانية استخدامها كمصدر للغذاء وكذلك قدرته على احتلال مواقع الممرضات و يعمل على إزالتها بتكوين المستعمرات الثانوية (Cook and Baker, 1983) ، ذكر Benhamon وChet ( 1993) إن الآلية التي يسلكها فطر المقاومة الأحيائية.*T. harazianum* من خلال المشاهدات المجهريه في المزارع المزدوجة تكمن في إن الغزل الفطر له يلتف بشكل حلزوني Coiling حول غزل الفطر الممرض. *R solani* ويقوم الفطر الممرض. بإفراز مواد غنية بسكر الكالكتوز الذي يتغذى

عليها الفطر فضلاعن احتواء جدران الفطر على الكايتين وبشكل N-Aectyl glucosamine والذي يعد حافزا لفطر المقاومة الأحيائية علىإفراز إنزيم Chitianse مما يؤدي إلى تحليل جدران الخيوط الفطرية للفطر الممرض لتحليل هذا السكر المعقد بعدها يبدأ سايتوبلازم الفطر الممرض بالتحبب بفعل نشاط الإنزيمات والمضادات الحياتية الأخرى ( Lewis *etal;* Papavizas1987 1998) وجاء متفقا مع ما توصل أليه مطلوب ،(2007) أن الفطر *T.harazianum* كان فعالاً من الناحية التضادية ضد عزلات الفطر .*R solani* جميعها مختبريا ، وقد أشار (Scarselletti and full, 1994) إلى وجود علاقة بين إنتاج الPyrone من قبل الفطر*T. harazianum* وقدرته على التضاد مع*R solani* و *oxysporiumF* خارج الخلية، لوحظ أيضا تلون المنطقة المحيطة بالجذور باللون الأحمر وقد يعزى سبب ذلك إلى إفرازات الفطر الممرض بوصفها وسيلة دفاعية يلجأ إليها الفطر وهذا يتفق مع ما توصل إليه الحلو (1995) والموسوي (1998) ، أو عن طريق تكوين أعضاء التصاق أو التثبيت (Antal*et al* ,2000) بالنسبة للفطرين الممرضين وكذلك إنتاج مركبات متطايرة وغير متطايرة (Kucuk and Kivance ,2002) .

**جدول (2) التاثيرالتثبيطي لفطريات المقاومة الأحيائية وبعض الفطريات المعزولة على النمو القطري (سم) للفطريات الممرضة . *R.s* و*F.o*و*F.pg* بعد سبعة أيام من زراعتها على وسط P.D.A. في درجة حرارة (25±2)°م**

| مسافة التثبيط مع الفطر المرضي(سم) | | | الفطريات |
|---|---|---|---|
| ***R.solani*** | ***F. pseudo-grameniarum*** | ***F.oxysporum*** | |
| 0.43 | 1.12 | 1.20 | *C.elatum* |
| 2.41 | 2.11 | 2.55 | *T. harzianum .a.* |
| 2.25 | 2.05 | 2.37 | *T. harzianum .t.* |
| | | | |

## إختبار قدرة فطريات المقاومة الأحيائية على إنتاجإنزيمالكايتينيز .

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (3) بان *T. harazianum* العزلة الاسترالية قد حققت اعلى فعالية انزيمية للكايتينيز عند استخدام الغزل الفطري الجاف للفطريات الممرضة*oxysporiumF, R solani.,pseudograme niarumF* كمصدر كربوني بنسبة 1% في وسط الـ MSM وفي درجة حرارة 30م0 وعند الرقم الهيدروجيني 5 ومدة حضن 24 ساعة ،أذ بلغت 0.326 و 0.304و0.287 وحدة/مل على التوالي، بينما حققت عزلة *T. harazianum* التحديفعالية انزيمية بلغت 0.254 و 0.225 و 0.198 وحدة/مل على التوالي ، اما الفطر*C elatum* فكان اقل العزلات انتاجا اذ حقق 0.185 و 0.153 و 0.092 وحدة/مل على التوالي ، لقد ذكر الكثير من الباحثين أن فعالية إنزيم الكايتنيز(chitinase) المنتج من الفطر *Trichoderma* تفوق فعالية الإنزيم لباقي الفطريات المقاس تحت الظروف نفسها(Benhamou and Chet, 1993 ؛ Loritoet *al*,1993 ؛ Rousseau *et al* 1996 )..

**جدول(3) قيم الفعالية الانزيمية (وحدة/ مل) لانزيمالكايتينيز المنتج من فطريات المقاومة الأحيائية على الوسط MSM الحاوي على الغزل الفطري الجاف للفطريات المرضية**

| *R.solani* | *F. pseudo gramiarum* | *F.oxysporum* | الفطريات |
|---|---|---|---|
| الفعالية الانزيمية وحدة/مل | | | |
| 0.092 | 0.153 | 0.185 | *C. elatum* |
| 0.304 | 0.287 | 0.326 | *T. harzianum.a.* |
| 0.225 | 0.189 | 0.245 | *T. harzianum.t.* |
| للتداخل= 0.0129 | للفطريات الممرضة=0.0065 | للفطريات المعزولة=00047 | **L.S.D.0.05** |

## قابلية فطريات المقاومة الأحيائية على إفرازإنزيمالسيليوليز

اظهرت فطريات المقاومة الاحيائية *T. harazianum* العزلة الاسترالية و*T. harazianum* عزلة التحدي والفطر*C.elatum*. حققت قدرة عالية على افراز انزيم السيليوليز ، فقد بينت نتائج الجدول(4) بان العزلة *T. harazianum* الاسترالية قد تفوقت في افرازه للانزيم اذ بلغ تركيزه 0.0953 جزء بالمليون مقارنة بكمية الانزيم الذي افرزته كل من الفطريات *T. harazianum* عزلة التحدي. و*C.elatum* والتي بلغت 0.0821 و 0.0766 جزء بالمليون على التوالي ،وهذا يتفق مع مأشار اليه كل من .(Ahamed&Vermette, 2008) بان الفطر *T.harzianum* يمتاز بتفوقه على افراز انزيم السيليليز . كما ذكر (Omar *et al*,2000) ان جميع الفطريات المحفزة لنمو النبات لها القدرة على إنتاج مجموعة من الانزيمات اهمها Cellulase.

**جدول(4) تركيز انزيم السيليوليزجزء بالمليون الذي تفرزه فطريات المقاومة الاحيائية في الوسط Vogel بوجود CMC**

| تركيز السيليليزجزء بالمليون | الفطريات |
|---|---|
| بوجود CMC | |
| 0.0766 | *C. elatum* |
| 0.0953 | *T. harzianum.a.* |
| 0.0821 | *T. harzianum.t.* |

## المصادر العربية

**الحلو , يحيى عاشور . 1995.** بعض الفطريات المرافقة لجذور الطماطة وعلاقتها بنمو العائل وموتالبادرات المتسبب عن الفطر Fusariumoxysporiumfs.p . lycopersici . رسالة ماجستير . كلية الزراعة – جامعة البصرة . 62 صفحة

**حافظ ، حميد زايد علي.2001**. المكافحة المتكاملة لمرض التعفن الفحمي على السمسم المتسبب عن الفطر Microphominaphaseolina. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد .

**حسون،ابراهيم خليل ،2005**. المكافحة البايولوجية والكيميائية لمسبب مرض تقرح ساق البطاطا.KuhnRhizoctoniasolaniاطروحة دكتوراه. جامعة بغداد

**حمد , نداء شهاب. 1998**. مجتمع الفطريات الدقيقة في ترب مناطق العراق الصحراوية. أطروحة دكتوراه - كلية العلوم – جامعة بابل.

**حميد , فاخر رحيم . 2002** . دراسة كفاءة عزلات من Trichodermaspp في استحثاث المقاومة ضد الفطر Rhizactoniasolani في اربعة اصناف من القطن . رسالة ماجستير . كلية الزراعة – جامعة بغداد . 86 صفحه .

**الخزرجي،ياسر عيدان باني محمود .2004**. دراسة انماط مختلفة لمكافحة مرض تعفن جذور الخيار المتسبب عن الفطر Phytophthoradrechsler Tucker. رسالة ماجستير .كلية الزراعة .جامعة بغداد .

**ديوان , مجيد متعب وعلي حسين البهادلي. 1984**. أمراض النبات. مؤسسة المعاهد الفنية – بغداد. 344 صفحة.

**ديوان ، مجيد متعب (1994)** الكثافة العددية للفطريات المرضية وغير المرضية المرافقة لجذور الطماطه وعلاقتها بمرض الذبول .مجلة البصرة للعلوم الزراعية، 7(2):87-100 .

**ديوان , مجيد متعب ، جمال حسين كاظم وهدى جميل باقر . 2007** . أ. تأثير بعض الفطريات المحيطة بجذور الأدغال في الفطر Rhizoctoniasolani Kuhn وإنبات حاصل الحنطة . ( مقبول للنشر في مجلة جامعة كربلاء ) .

**الرفاعي،فيصل عبد الرحمن محمد، 2004**.المكافحة المتكاملة لمرض موت بادراتالطماطه Lycopersiconesculantum Mill. المتسبب عن الفطر Rhizoctoniasolani Kuhnرسالة ماجستير،كليةالزراعة–جامعة البصرة

**شريف ، فياض محمد ، فضل عبد الحسين واحمد عكاشة ، 1988** . المقاومة الحيوية للفطر Pythiumaphanidermatum (Edson ) Fitz. على الخيار وفي البيت البلاستيكي . مجلة البحوث الزراعية والموارد المائية .7 :99-109

**العيساوي ، ذياب عبد الواحد فرحان . 2006**. عزل وتشخيص بعض الفطريات المرافقة لمرض موت بادرات وتعفن جذور الرقي ومقاومتها بالطرق الأحيائية والكيميائية. رسالة ماجستير ، الكلية التقنية / المسيب ، 66 صفحة .

**علوان ، صباح لطيف . 2005** . تصنيع مستحضر لمبيد إحيائي جديد من الفطر TrichodermaharzianumRafai لمكافحة مرض تعفن البذور وموت البادرات المتسبب عن الفطرين Rhizoctoniasolani وPythiumaphanidermatum . أطروحة دكتوراه ، كلية التربية – جامعة الكوفة .

**الموسوي , كريم عبد ياسين . 1998** . تاثير بعض الادغال ومستخلصاتها والفطريات المعزولة من جذورها في انبات بذور ونمونباتاتالطماطة والفطر الممرضFusariumoxsporumf.sp. lycopersici(Sacc) Synder& Hansen . رسالة ماجستير –كلية الزراعة – جامعة البصرة .71 صفحه .

**مطلوب ، عدنان ناصر . عز الدين سلطان محمد وكريم صالح عبدول . 1989** . إنتاج الخضروات ، ج 2 مطبعة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل .

## المصادر الأنكليزية

**Abdullah , S.K. and ALBader , S.M. 1990** . On the thermophillicThermotolerandMycoflora of Iraqi soils . Sydowia42:17.

**Agrios, G.N. 2005**. Plant pathology .5th ed. Academic Press .PP.952

**Ahmed**, S., N. Aslam, F. Latif, M.I. Rajoka and A. Jamil. 2005. Molecular cloning of cellulasegenes from Trichodermaharzianum. In: Proceedings of the 9th International Symposium onNatural Product Chemistry, Frontiers in Natural Product Chemistry. Vol 1, (Eds.): Atta-ur.

**Ahamed,** A and P. Vermette. 2008. Culture-based strategies to enhance cellulaseenzymeproduction from Trichodermareesei RUT-C30 in bioreactor culture conditions. Biochem.Eng. J., 40: 399-407.

**Amouri**, B and A. Gargouri. 2006. Characterization of a novel β-glucosidase from a Stachybotrysstrain. Biochem. Eng. J., 32: 191-197.

**Antal ,** Z.; Manczinger, L.; Szakacs, G.; Tengerdy, R.P. and Ferenczy, L. (2000). Colony growth, in vitro antagonism antagonsim and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant srains of Trichoderma species. Mycol. Res., 104: 545-549.

**Attitalla,** I. H. 2004. Biological and molecular characteristics of microorganism-stimulated defence response in lycopersiconesculentum-L.Ph.D.thesis, Unive . Uppsala ,Sweden.82

**Benhamou**, N. and Chet, I. (1993). Hyphal interactions between Trichodermaharzianum and Rhizoctoniasolani; Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathol., 83: 1062-1071.

**Bergquist**, P., V. Teo'O and M. Gibbs. 2002. Expression of xylanase enzymes from thermophilicmicroorganisms in fungal host. Extermophiles., 6: 177-184.

**Burgess**, L.W.; Liddell, C.M. and Summeran, B.A. 1988. Laboratory manual for Fusarium research: Inoorproation a key and description of common species found in Australia. 2nd Edition. Dept. of Plant Pathology and Agricultural Entomology. University of Sydney.

**Cook** , R.J. and Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathol. Soci. St. Paul. Mn. 539 pp.

**Dewan**, M.M. 1989 . Identity and frequency of occurrence of fungi in root of wheat and rye grass and their effect on take-all and host growth . Ph.D. thesis Univ. Western Austral.

**Dewan,** M.M., Ghisalberti, E.L., Rowland, C. and Sivasithamparam, K. 1990. Reduction of symptoms of take-all of wheat and Rye-grass seedlings by the soil-borne fungus Sordariafenicola . Applied soil Ecolog. 1:45-51. 13-138

**Domsch,** K.H.; Gams, W. and Anderson, T.H. 2003. Compendium of soil fungi. Academic Press, London, 894 pp.

**El-Katatny,** M.H.; Somitsch, W; Robra, K.H.; El-Katatny, M.S. and Gubitz, G.M. 2000. Production of chitinase and B-1,3-glucanase by Trichodermaharzianum for control of the phytopathodenic fungus Sclerotiumrolfsii. Food Technol. Biotechnol., 38: 173-180.

**Ghisalberti**, E.L.; Narbey, M.J.; Dewan, M.M. and Sivasithmparam, K. 1990. Viability among strains of Trichodermaharzianum in their ability and reduce take-all to produce pyrones. Plant & Soil., 121:291.

**Harman,** G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I. and Lorito, M.(2004). Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Microbiol., 2: 43-56.

**Hayatsu**M. 1993.The lowest limit of pH for nitrification in tea soil and isolation of ammonia oxiding bacteria .39(2):219-226.

**Hermosa,** M.R., I. Grondona, E.A. Iturriaga, J.M. Diaz- Minguez, C. Castro, E. Monte, I. Garcia-Acha. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of Trichodermaspp .Appl,Environ Micobiol.66;1890-1898. USA.

**Howard,** M.B.; Ekbory, N.A.; Weiner, R.M. and Hutcheson, S.W. 2003. Detection and characterization of chitinase and other chitin-modifying enzymes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 627-635.

**Howell,** C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D &Puckhaber. 2000. Induction of Terpenoid Synthesis in cotton roots and control of Rhizoctoniasolani by seed treatment with Trichodermavirens . Phytopathology 90 : 248-252 .

**Hunt,** J. 1999. Trichoderema News 8. Australian Horticulture. 97:21, 43-4

**Kuguk,** C. and Kivang, M. 2002.Isolation of Trichodermaspp.and determination of their antifungal ,biochemical and physiological featurd. Turky, J.Biol.27:247-253.

**Lewis,** J.A .; Larkin, R.P. & Rogers, D.L. 1998. Aformulation of Trichoderma&Gliocladium to reduce damping – off caused by R. solani& saprophytic growth of pathogen in soilless mix . Plant Dis . 82 :501-506 .

**Lo,** C.T.; Nelson, E.B. and Harman, G.E. 1996. Biological control of turfgrass diseases with arhizopherecompeten strain of Trichodermaharzianum. Plant Dis. 80:73 6-741.

**Lorito**, M.; Harman, G.E.; Hayes, C.K.; Broadway, R.M.; Tronsmo, A.; Woo, S.L. and Dipietro, A. 1993Chitinolytic enzymes produced by Trichodermaharzianum: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathol., 83: 302-307.

**Mercedes**dela, M.; Limon, C.M.; Meijas, R.; Mach, R.L.; Pintor-Toro, J.A. and Kubicek, C.P. 2000, Regulation of chitinase 33 (chit 33) gene expression in Trichodernumharzianum. Curr. Gen. 30: 126-130.

**Montealegre**, J.R.; Reyes, R.; Perez, L.M.; Herrera, R.; Silva, P. and Besoain, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of Rhizoctoniasolani in tomato. Environ. Biotchnol., 6: 1-8.

**Papavizas,** G.C. 1987. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol. Phytopathol., 23: 23-

**Pitt**, J.I. 1989. Toxigenic Penicillium species in mycotoxins and animal feeding stuff. 1. The toxigenic fungi (Ed. J.E. Smith) CRC Press. Baton Roca, Florida. 352 pp.

**Robert,** M. S., and N. Robyn. 1982. Salt tolerance in crop plant. Monitored by chlorophyll fluorescence in vivo. Plant Physiol., 70: 1049-1054.

**Rousseau**, A.; Benhamou, N.; Chet, I. and Piche, Y. 1996. Mycoparasitism of the extramatrical phase of Glomusintraradics by Trichodermaharzianum. Phytopathol., 86: 434-443.

**Scarselletti** , R. and Faull J. 1994 . Invitro activity of 6 – penty – alpha – pyroneametabolite of T.harzianum in the inhibition of R. solani and Fusariumoxysporumlycopersici . Mycological , Research . 98 (10): 1207 – 1209 .

**Somogyi**, M. (1952). Notes on sugars determination. J. Biol. Chem. 1952: 19-23.

**Tweddell,** R.J.; Jabaji-Hare, S.H. and Charest, P.M. 1994. Production of chitinase and B-1,3-glucanase by Stachybotryselegans, a mycoparasite of Rhizoctoniasolani. Appl. and Environ. Microbiol., 60: 489-495.

**Vazquez,** S., Leal, C. A. and Herrera, A. 1998.Analysis of the B-1,3-glucanolytis system of the biocontrol agent Trichodermaharzianum Applied and Environmental Microbiology 64(2):1442-1446.

**Yedida ,** I . ; Benhamau , N . , and Chet , I . 1998 . Induction of defense responses in cucumber plant (cucumissativus L .) by the biocontrol agent Trichodermaharzianum . Appl . Environ . Microbid . 65(3) : 1061 – 1070 .