Comparative study of some chemical and physical properties of fungi filterates isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)de Bary and Trichoderma harzianum.

دراسة مقارنة لبعض الخصائص الكيميائية و الفيزيائية لرواشح الفطريات المعزولة من الأجسام الحجرية للفطر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary و راشح الفطر **Trichoderma harzianum*

بان طه محمد ميثم ناصر نعمة
قسم علوم الحياة كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء

- مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المستخلص :

أجريت سلسلة من التجارب المختبرية في مختبرات قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء , في مختبرات الدراسات العليا. تم دراسة بعض الخصائص الكيميائية و الفيزيائية لرواشح الفطريات المعزولة من الاجسام الحجرية والتي تمثلت بـ *Aspergillus niger* ، *A. terreus* ، *Penicillium sp.* و راشح الفطر *Trichoderma harzianum*. بينت النتائج وجود اعداد متباينة من قيم التحرك النسبي R_f تراوحت بين 0.06 الى 0.91 أضافة الى تباين في عدد البقع على صفائح TLC ، كما تم دراسة الرقم الهيدروجيني للمستخلصات و الذي أتجه نحو الحامضية ، و اوضحت الدراسة وجود بعض المكونات الكيميائية الفعالة مثل القلويدات و غياب بعض المكونات الكيميائية مثل الفلافونيدات .

Abstract:

Series of lab. Experiments were conducted in the laboratories of Biol. Dept.College of Education for pure Science ,Kerbala University . Some Chemical and physical properties of fungi filtrates isolated from sclerotia represented by *Aspergillus niger* , *A. terreus* and *Penicillium* sp. and *Trichoderma. harzianum* filtrate were studied . Results revealed variated numbers of Rf ranged between 0.06 and 0.91 in addition to the variation in the number of spots on TLC plates.Extracts pH which tend to the acidity was also studied . The study showed a presence of some active chemicals compounds as alkaloids and the absence of some chemical compounds such as Flavonoids

المقدمة:

ان الاجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* مقاومة للجفاف و الحرارة و المبيدات الفطرية و يمكن ان تبقى حية و فعالة في التربة لسنوات عديدة (1) . يعد محتوى التربة الحيوي احد اكثر العوامل اهمية في تحديد بقاء الجسم الحجري حيا، إذ ان بعض الاحياء المجهرية المعروفة هي مضادات او طفيليات فطرية لأنواع الجنس *Sclerotinia* ، فالتغاير الموجود في طول مدة بقاء الفطر على قيد الحياة في الاقل يعود جزئيا الى تنوع مجتمع الاحياء الدقيقة المتواجدة في التربة (2) . تستعمل بعض الفطريات و البكتريا و احياء التربة الأخرى الجسم الحجري كمصدر للكاربون بالتطفل عليه ، و تنشط مثل تلك الأحياء خلال الدورة الزراعية و بهذا يعد لها دور في تقليل كفاءة الأجسام الحجرية ، و يوجد عدد من الفطريات المشخصة على أنها تتطفل على الأجسام الحجرية Mycoparasitic Fungi او Antagonistic Fungi التي تشمل انواع تعود للفطر *Trichoderma* و الفطر *Glliocladium* و ايضا فطريات متطفلة اخرى تعود للأجناس : *Acrostalagmus* و *Fusarium* و *Hormodendrum* و *Mucor* و *Penicillium* و *Aspergillus* و *Stachybotrys* و *Verticillium* حيث وصفت هذه الاجناس الفطرية كطفيليات على الاجسام الحجرية . وقد تم استخدام الفطر *Coniothyrium minitans* في أختزال عدد و حيوية الأجسام الحجرية للفطر *S. sclerotiorum* في التربة (3) .

يستخدم مصطلح المقاومةالاحيائية Biological Control او المختصر Biocontrol في مجالات مختلفة من علم الاحياء ، اذ يدل في علم امراض النبات على استخدام الاحياء المجهرية و كذلك النواتج الطبيعية على شكل مستخلصات او خمائر من مصادر متنوعة كمضادات لكبح الامراض ، و جميع اشكال المقاومة الاحيائية يمكن ان تكون مركبات بسيطة من مكونات طبيعية مع فعاليات متخصصة باتجاه ممرض معين او مركبات معقدة تمتلك تأثيرات متعددة على العائل و الممرض و على هذا

الاساس تم تعريف المقاومة الاحيائية بأنها استخدام الاحياء المتوطنة او التي تم ادخالها باستثناء النبات العائل المقاوم للمرض بغية ايقاف النشاطات و عمليات الاجتياح الخاصة بواحد او اكثر من الممرضات النباتية (4) .

يمتلك الفطر *A. niger* القدرة الكافية لإيقاف الممرضات النباتية و زيادة حاصل النباتات التي يتواجد عليها كما يعمل على تحويل الفوسفات الموجود في جميع انواع التربة الى شكل جاهز للامتصاص من النبات (5) . وقد عدّ (6) الفطر *A. niger* احد عوامل المقاومة الاحيائية . يعد انتاج انزيم Chitinase بوساطة الفطر *A. niger* من اهم الوسائل التي مكنت الفطر من تثبيط الفطريات الاخرى ، اذ يعمل الانزيم على تحلل الكايتين الى Oligomer و Monomers و من ثمّ تحطيم الجدار الخلوي للعديد من الفطريات الممرضة للنبات .

كما يمتلك الفطر *A. terreus* امكانية انتاج عالية للمركبات الايضية الثانوية المهمة في التقنيات الحيوية و خصوصا في المجال الزراعي ، اذ تم تحديد ثلاث مركبات مضادة للفطريات سجل اثنان منها تثبيطا عاليا ضد الفطر *A. fumigatus* (7) . يمكن عزل الفطر *A. terreus* من التربة باستخدام تقنية Sclerotial Bait Technique و اختبار فعاليته التضادية بطريقة الزرع المزدوج ضد الفطر *S. sclerotiorum* ، اذ سجل درجة عالية من التضاد و النمو على الفطر الممرض ، كما اثر على قابلية نمو الاجسام الحجرية بنسبة 100%عندما تم معاملتها بالعالق الكونيدي للفطر *A. terreus* ، إذ تمكن الفطر *A. tereeus* من تكوين مستعمرة على الاجسام الحجرية الداخلية و اختراق الطبقة الداخلية للجسم الحجري ، و ايضا تم ملاحظة انحلال الغشاء البلازمي في بعض الخلايا المصابة بالفطر *A. terreus* (1) تحتوي رواشح الفطر *A. terreus* على مضادات حيوية ثبطت نمو البكتريا *Bacillus mycoides* (8) .

وجد ان للفطر .*Penicillium* sp دوراً مهما في عملية تحطيم الجسم الحجري للفطر *S. sclerotiorum* (9). اوضح (10) بأن الخلاصة الخام للفطر .*Penicillium* sp اعطت تثبيطا عاليا ضد الفطر *A. flavus* . بين (11) ان الفطر .*Penicillium* sp و الذي عزل من جذور نبات الملفوف قد اختزل النمو الشعاعي للفطر *F. oxysporum f. sp. lycopersici* المسبب لأمراض الذبول في نباتات الطماطم و الملفوف عند استخدام تقنية الزرع المزدوج بدون حدوث تلامس بين الخيوط الفطرية بسبب انتاج الفطر .*Penicillium* sp لبعض المركبات المضادة للفطريات ، كما سجل العالق الكونيدي بتركيز 10^6 عند مزجه في الاصص انخفاضا ملحوظا في شدة المرض ، و قد ادى الفطر .*Penicillium* sp الى زيادة انبات البذور و نمو البادرات .

ذكر (12) دور الفطر *T. harzianum* في تثبيط نمو الفطر *S. sclerotiorum* و انتاج الاجسام الحجرية في الحبوب و الطماطم و الخس ، كما اصابت بادرات الخيار و الخس بالفطر . اوضح (13) اهمية المركبات الايضية التي ينتجها الفطر *T. harzianum* في تثبيط النمو الشعاعي لعدد من الفطريات الممرضة مثل *S. rolfsii* و *C. capsici* و *H. oryzae* و *A. alternata* ، كما ذكر (14) ان الفطر *T. harzianum* ثبط نمو غزل الفطر *Ascochyta rabiei* الذي يصيب الحمص بعد سبعة ايام من اجراء اختبار التضاد ، و ايضا تمكن راشح الفطر *T. harzianum* عند اضافته بتراكيزه الثلاثة 10 و 20 و 30% الى انخفاض معنوي في النمو و الوزن الجاف *للفطر Macrophomina phaseolina* و الفطر *F. solani* المسببة لموت بادرات الحمص.

و في ما يخص الرقم الهيدروجيني pH لوسط النمو فقد تبين انه مهم جدا للفطر *S. sclerotiorum* ، اذ بامكان الفطر تحمل مدى واسع من pH إلا ان افضل pH للنمو و تكوين الاجسام الحجرية يتراوح بين 4 – 5.5 ، كما وجد ان pH الوسط الزرعي منظم قوي لإنتاج حامض الاوكزاليك حيث يزداد انتاج الحامض في البيئة الحامضية و اوضحت بعض الدراسات أنّ انتاج حامض الاوكزاليك في الفطر *S. sclerotiorum* يتم تحفيزه بوساطة انزيم Oxaloacetate Acetylhydrolase و ان نشاط الانزيم يزداد مع زيادة pH البيئة المحيطة (15) .

المواد و طرائق العمل:

تم الحصول على عزلة الفطر الممرض *S. sclerotiorum* من مختبر الدراسات العليا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء و المشخص من قبل محمد و المظفر، (2013) وفقا لتقانة الـ PCR و التي تعود للسلالة MCG Mycelia Compatibility Groupings و عند التتابع 475 bp و للمنطقة (ERIC) Entrobacterial Repetitive Intergenic . وتم الحصول على عزلة الفطر *Trichoderma harzianum* من مختبرات قسم علوم الحياة كلية العلوم جامعة بابل .

نميت الاجسام الحجرية من خلال نقل قرص قطره 5 ملم بوساطة الثاقب الفليني Cork Borer من حافة مستعمرة نقية للفطر *S. sclerotiorum* بعمر 5 ايام الى اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA ، ثم حضنت الاطباق بدرجة 20 ± 2 ^{o}م لمدة 15 يوم حتى اكتمال تكوين الاجسام الحجرية(16) .

عزل و تشخيص بعض الفطريات المرافقة للأجسام الحجرية:

تم عزل الفطريات المرافقة للجسم الحجري للفطر *S. sclerotiorum* بأستخدام تقانة مصيدة الأجسام الحجرية Sclerotia-Trap Technique وهي طريقة معتمدة للحصول على الفطريات التي تمتلك قابلية تضادية اتجاه الفطر *S. sclerotiorum* ، .

استخلاص الرواشح الخام للفطريات:

استخلصت الرواشح الخام للفطريات المعزولة وللفطر *T. harzianum* من خلال تهيئة اربعة دوارق زجاجية سعة 250 مل يحتوي كل منها 150 مل من الوسط الغذائي السائل Potato dextrose broth PDB . لقح كل دورق بثلاثة اقراص قطرها 5 مل اخذت بوساطة ثاقب الفلين Cork Borer من حافات مستعمرات الفطريات النامية في الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة ايام و بواقع اربعة دوارق لكل فطر حضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 ± 2 لمدة 14 يوم مع مراعاة رج الدوارق يوميا . و بعد انتهاء مدة الحضن فصل الغزل الفطري باستخدام اوراق الترشيح Whatman No. 1 ، و بعد ذلك تم امرار راشح كل فطر على حدة من خلال اوراق التعقيم Millipore (0.045 مايكروميتر) مجهزة من شركة Sartorius Stedim Biotech - Germany إذ جمع راشح كل فطر في دورق زجاجي معقم سعة 500 مل و تحت ظروف معقمة ، بعدها وضعت رواشح الفطريات في قمع الفصل كل منها على حدة و اضيف اليه الكلوروفورم بحجم مساوي لحجم الراشح (1 : 1) ثم رج قمع الفصل جيدا لحين تكون طبقتين ، بعدها جمع المستخلص المتبقي و جفف بدرجة حرارة 40 ^{o}م لغرض الحصول على حجم 5 مل من الحجم الاصلي للمستخلص ثم حفظ المستخلص في اوعية زجاجية محكمة الاغلاق نظيفة و معقمة و مغلفة بطبقة من الالمنيوم ثم وضعت في الثلاجة لحين الاستعمال (1) .

قياس مقدار التحرك النسبي R_f

للتأكد من وجود تشابه و اختلاف في مكونات المستخلصات الفطرية استخدمت تقانة صفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) (17). اتبعت طريقة(18) باستعمال صفائح TLC رقيقة مغطاة بهلام السليكا Silica Gel بأبعاد 20 × 20 سم و سمك 2 ملم مجهزة من شركة Whatman – USA اذ تم تنشيط الصفائح بوضعها في فرن كهربائي Oven بدرجة حرارة 105 ^{o}م لمدة 30 دقيقة ، تركت مسافة 1.5 سم من حافة الصفيحة السفلى ثم تم وضع بقع صغيرة من محلول المستخلصات الفطرية التي ركزت الى 5 مل و بمقدار 10 مايكروليتر بوساطة انبوبة شعرية Capillary Tube من كل مستخلص فطري على ان تكون المسافة بين بقعة و اخرى 2 – 3 سم ، بعدها تركت لتجف ، ثم وضعت صفيحة TLC في حوض الفصل المشبع بنظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (Chloroform : Methanol) (5 : 95) و ترك المذيب لينتشر مسافة 17 سم من موضع البقعة باتجاه الأعلى ، بعدها اخرجت الصفائح لتجف بدرجة حرارة المختبر ثم فحصت المركبات المفصولة في جهاز الاشعة فوق البنفسجية و بطول موجي 365 نانوميتر ثم حسبت قيم التحرك النسبي للبقع المفصولة Relative Flow (R_f) بحسب المعادلة الاتية :

$$\text{قيمة } R_f = \frac{\text{المسافة التي قطعتها العينة المفصولة}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}}$$

قياس الرقم الهيدروجيني للمستخلصات الفطرية:

تم قياس الرقم الهيدروجيني pH للمستخلصات بوساطة جهاز قياس الرقم الهيدروجيني pH Meter (19 و 20)

الكشف عن بعض المجاميع الفعالة للمستخلصات الفطرية:

اجريت مجموعة من الكشوفات النوعية و ذلك للتعرف على المكونات الكيميائية الاساسية او المركبات الفعالة الموجودة في هذه المستخلصات ، إذ تم الكشف عن وجود القلويدات (21) ، التانينات (22 و 23) ، الصابونينات ، (24) ، الكلايكوسيدات (25 و26) ، الفلافونيدات (27) ، الكاربوهيدرات (28) و الفينولات (29 و 30) و كالآتي :

أ. الكشف عن القلويدات Alkaloids

- **كاشف ماير Mayer Reagent**

حضر هذا الكاشف على النحو الاتي :

1 – اضافة 1.36 غم من كلوريد الزئبقوز Hg_2Cl_2 الى 60 مل من الماء المقطر .

2 – اذابة 5 غم من يوديد البوتاسيوم في 10 مل من الماء المقطر .

تم مزج المحلول (1) و (2) و اكمل الحجم الى 100 مل بإضافة الماء المقطر ، ثم اضيفت قطرات من هذا الكاشف الى المستخلصات الفطرية . ان ظهور راسب ابيض او عكورة يدل على وجود القلويدات .

ب. الكشف عن التانينات Tannins

- **كشف خلات الرصاص Lead Acetate Test**

حضر المحلول بإذابة 1 غم من خلات الرصاص في 100 مل من الماء المقطر ، ثم اضيفت عدة قطرات منه الى انبوبة اختبار تحوي 0.5 مل من المستخلص الفطري . ان تكون راسب ابيض هلامي القوام يدل على وجود التانينات.

ج. الكشف عن الصابونينات Saponins

- **الرغوة الكثيفة**

تم تحضير محلول مائي من المستخلصات الجافة للفطريات و وضعت في انبوبة اختبار و رجت بشدة ، ان تكون رغوة كثيفة تبقى لمدة طويلة دليل على وجود الصابونينات .

د. الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides

● كاشف موليش Molish Reagent

تم الكشف عن وجود الكلايكوسيدات باستخدام كاشف موليش من خلال اخذ 2 مل من المستخلص المراد اختباره و اضيفت اليه قطرتان من محلول α - naphthol و رج المحلول جيدا ، ثم مسكت الانبوبة بشكل مائل و اضيفت 2 مل من حامض الكبريتيك المركز بشكل قطرات على جدار الانبوبة لحين ظهور طبقتين و طبقة بنفسجية اللون تفصل بين الطبقتين دليل على وجود المواد الكلايكوسيدية .

ه . الكشف عن الفلافونيدات Flavonoids

● كشف حامض الكبريتيك المركز

اضيف 1 مل من المستخلص الى 1 مل من حامض الكبريتيك المركز ، فظهور اللون الاصفر الداكن دليل على ان الكشف ايجابي

و. الكشف عن الكربوهيدرات Carbohydrates

● كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز

حضر كاشف الفينول باذابة 25 غم من بلورات الفينول في 500 مل من الماء المقطر ، ثم اضيف 0.5 مل من هذا الكاشف الى 0.5 مل من المستخلص في انبوبة اختبار و رجت جيدا ثم اضيف 2.5 مل من حامض الكبريتيك المركز الى المحلول ، فكان ظهور اللون الاحمر البني دليلا على وجود الكربوهيدرات.

ز .الكشف عن الفينولات Phenols

● كاشف كلوريد الحديديك Ferric Chloride Reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة 1 غم من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ في 100 مل من الماء المقطر ، رطبت ورقة ترشيح بالمستخلص ، ثم اضيفت قطرات من كاشف كلوريد الحديديك و تم تعريض الورقة الى بخار الامونيا ، ان ظهور اللون الازرق دليل على وجود الفينولات.

النتائج و المناقشة :

بعد ان تم عزل الفطريات من الاجسام الحجرية حددت عزلات *A. niger* ، *A. terreus* و*Penicillium sp* و شخصت استنادا الى المفاتيح التصنيفية (31) و (32)

بينت نتائج فصل المستخلصات الفطرية باستعمال تقانة صفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وبعد فحص الصفائح تحت الاشعة فوق البنفسجية بطول موجي 365 نانوميتر أنّ المستخلصات الفطرية قد تباينت في عدد البقع وقيم التحرك النسبي R_f و كما هو واضح في الجدول (1) الشكل(1)، إذ سجل الفطر *T. harzianum* أعلى عدد للبقع هو 23 بقعة، و جاء بعده الفطر *A. terreus* اذ احتوى على 21 بقعة ، ثم الفطر *A. niger* 20 بقعة ، و اخيرا سجل الفطر *Penicillium sp.* اقل عدداً من البقع هو 16 بقعة.

اما فيما يخص قيم التحرك النسبي R_f فقد ظهرت اعلى قيمة عند الفطر *A. terreus* و هي 0.91 ، و ادنى قيمة عند الفطرين *Penicillium sp.* و *T. harzianum* و هي 0.06 ، و مما تجدر الاشارة اليه ان المستخلصات قد تشابهت مع بعضها في عدد من قيم التحرك النسبي R_f ، اذ اشترك الفطر *Penicillium sp.* مع الفطر *T. harzianum* في القيم 0.06 ، 0.30 ، 0.32 ، و اشترك الفطر *A. niger* مع الفطر *Penicillium sp.* في القيم 0.11 ، 0.13 ، 0.39 ، و ايضا اشترك الفطر *A. niger* مع الفطر *A. terreus* في القيم 0.19 ، 0.25 ، 0.34 ، اما الفطر *A. terreus* فقد اشترك مع الفطر *T. harzianum* في القيم 0.48 ، 0.55 ، 0.58 ، 0.86 . كما اشتركت الفطريات *A. niger* ، *Penicillium sp.* و *T. harzianum* في القيم 0.17 ، 0.18 ، 0.26 ، 0.33 ، 0.42 ، و كذلك اشتركت الفطريات *A. terreus* ، *Penicillium sp.* و *T. harzianum* في قيمة واحدة هي 0.29 .

تمكن (33) من الحصول على قيمة R_f من راشح الفطر *A. niger* تطابق قيمة R_f القياسية للسم الفطري Malformin و هي 0.54 و باستخدام تقانة TLC . بين (34) وجود سموم فطرية من نوع Territrem A (TRA) و Territrem B (TRB) تم عزلها من راشح الفطر *A. terreus* النامي على وسط الرز و بأستخدام تقانة TLC ، إذ وجدت قيم R_f مختلفة بسبب اختلاف المذيب ، فقد سجلت قيمة R_f 0.10 للسم TRA و 0.07 للسم TRB عند استخدام Chloroform كمذيب بينما سجلت القيم 0 ، 0.66 ، 0.88 ، 0.90 للسم TRA و القيم 0 ، 0.43 ، 0.81 ، 0.89 للسم TRB عند استخدام المذيبات Benzene ، Diethyl Ether ، Ethyl Acetate ، Acetone على التوالي ، كما اختلفت قيم R_f ايضاً عند استخدام انظمة فصل مختلفة إذ بلغت 0.33 للسم TRA و 0.23 للسم TRB عند استخدام نظام الفصل (7:3) (Benzene : Ethyl Acetate) في حين بلغت قيمة R_f 0.37 للسم TRA و 0.30 للسم TRB عند استخدام نظام الفصل (Chloroform : Acetone) (93:7) . أوضح (35) بأن الفطر *P. radicum* النامي على وسط خلاصة الشعير السائل يمتلك القابلية على انتاج الأوكسين Auxin و منها Indol Acetic Acid (IAA) من خلال تطابق قيم R_f و التي بلغت 0.6 بعد استخلاص الراشح بوساطة الميثانول و استخدام نظام الفصل (Chloroform : Ethanol) (80 : 20) .

يمتلك راشح الفطر *T. harzianum* المستخلص بوساطة الميثانول و بأستخدام نظام الفصل (70:30) (Chloroform : Methanol) فاعلية تثبيطية كاملة عند قيمة R_f 0.53 ضد الفطريات *S. rolfsii* ، *R. solani* ، *F. oxysporum* في حين لم تسجل قيمة R_f 0.17 و 0.82 تثبيط كامل ضد الفطريات الثلاثة السابقة (36) ، يعود السبب في قابلية التثبيط العالية لراشح الفطر *T. harzianum* الى وجود مركبات مثل Butenolide و Azaphilone (37) .

قياس الرقم الهيدروجيني

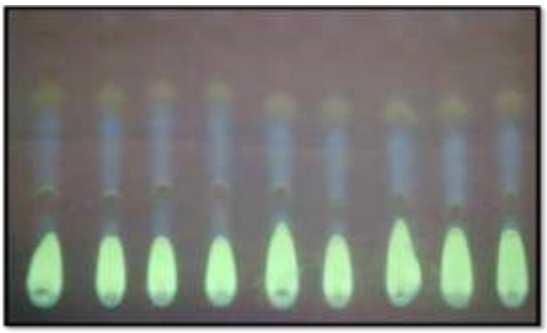
اوضحت نتائج قياس الرقم الهيدروجيني و كما هو واضح في الجدول (2) ان اقل دالة حامضية قد سجلها مستخلص الفطر *A. niger* أذ بلغت 3 وفي مستخلص الفطر *Penicillium sp.* بلغت 2.92 وفي مستخلص الفطر *T. harzianum* 2.45 ، اما مستخلص الفطر *A. terreus* فقد سجل اعلى دالة حامضية 2 .

الجدول (1) عدد البقع و قيم التحرك النسبي R_f للمستخلصات الفطرية .

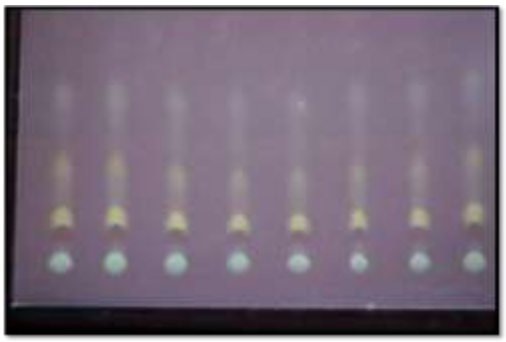
عينة المستخلص	عدد البقع	قيم R_f					
A . niger	**20**	**0.11**	**0.13**	**0.17**	**0.18**	**0.19**	**0.20**
		0.23	**0.24**	**0.25**	**0.26**	**0.27**	**0.28**
		0.33	**0.34**	**0.35**	**0.36**	**0.39**	**0.40**
		0.41	**0.42**				
A . terreus	**21**	**0.15**	**0.16**	**0.17**	**0.18**	**0.19**	**0.29**
		0.47	**0.48**	**0.49**	**0.50**	**0.51**	**0.54**
		0.55	**0.56**	**0.57**	**0.58**	**0.86**	**0.88**
		0.89	**0.90**	**0.91**			
Penicillium sp.	**16**	**0.06**	**0.10**	**0.11**	**0.13**	**0.14**	**0.15**
		0.17	**0.18**	**0.26**	**0.29**	**0.30**	**0.31**
		0.32	**0.33**	**0.39**	**0.42**		
T . harzianum	**23**	**0.06**	**0.16**	**0.25**	**0.26**	**0.29**	**0.30**
		0.32	**0.33**	**0.34**	**0.38**	**0.42**	**0.48**
		0.55	**0.58**	**0.66**	**0.71**	**0.73**	**0.74**
		0.76	**0.81**	**0.82**	**0.85**	**0.86**	

الجدول (2) الرقم الهيدروجيني للمستخلصات الفطرية

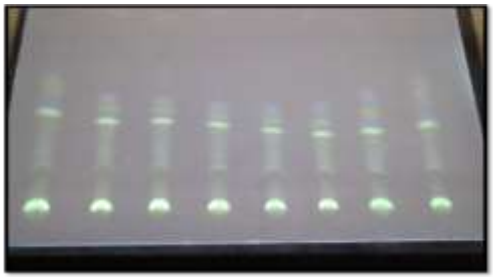
مستخلص الفطر	الدالة الحامضية
A . niger	**3**
A . terreus	**2**
Penicillium sp.	**2.92**
T . harzianum	**2.45**



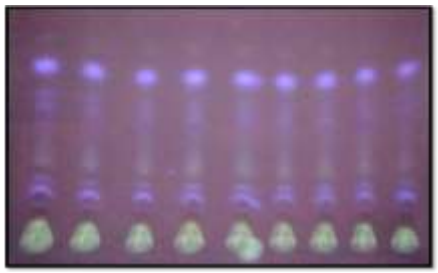
A. terreus



A. niger



T. harzianum



Penicillium sp.

الشكل (1) : المستخلصات الفطرية المفصولة باستخدام تقنية TLC .

المجاميع الفعالة للمستخلصات الفطرية :

في ضوء نتائج الدراسة الحالية عن الفعالية التثبيطية للمستخلصات الفطرية باستخدام الكلوروفورم للفطريات المشمولة بالدراسة فقد جرى التحري عن محتواها من المركبات الفعالة باستعمال بعض الكواشف الكيميائية المختلفة ، اذ اظهرت الكشوفات الكيميائية ان الفطريات المدروسة تحتوي عددا من المكونات الفعالة و ايضا اشتركت جميعها في عدم احتوائها على الفينولات كما في الجدول (3) ، إذ احتوى مستخلص الفطر *A. niger* على القلويدات و التانينات و الفلافونيدات و الكاربوهيدرات بينما لم يحتوي على الصابونينات و الكلايكوسيدات ، اما مستخلص الفطر *A. terreus* فقد احتوى على جميع المكونات الفعالة ، في حين ان مستخلص الفطر *Penicillium sp.* احتوى على القلويدات و التانينات و الصابونينات و الكلايكوسيدات و الكاربوهيدرات و لم يحتوي على الفلافونيدات ، و احتوى مستخلص الفطر *T. harzianum* على القلويدات و التانينات و الكلايكوسيدات و الكاربوهيدرات مع عدم وجود الصابونينات و الفلافونيدات .

أكدّ (38) وجود القلويدات في رواشح 102 عزلة من الفطر *Aspergillus* بضمنها النوع *niger* ، أذ تم استخدام تقانة TLC لفصل القلويدات من بقية النواتج الأيضية الثانوية ، (39) الى احتواء راشح الفطر *Aspergillus sp.* على القلويدات إضافة الى مركبين جديدين من Phenyl Ether . ذكر (40) احتواء الفطر *A. terreus* النامي في وسط PDA على القلويدات . اوضح (41) الى ان راشح الفطر *Penicillium aurantiogriseum* و النامي على وسط ABE المكون من Mannitol و Succinic Acid و $MgSO_4.7H_2O$ و KH_2PO_4 يحتوي على ثلاث انواع من القلويدات هي Anacine و Aurantine و Aurantiamine . و فيما يخص الصابونينات فأن النتيجة تتفق مع ما ذكره (42) في وجود الكلايكوسيدات من نوع Peniciside في راشح الفطر *Penicillium sp.* اما وجود الفلافونيدات في الفطر *A. niger* فهذه النتيجة تتفق مع (43) كما اختبر الفعالية الاحيائية للفلافونيدات ضد بعض الاحياء المجهرية مثل *A. flavus* .

بينت الدراسة التي قام بها (44) الى وجود الكاربوهيدرات بشكل مانيتول و ارابيتول بكميات كبيرة في راشح الفطر *A. clavatus* في حين احتوى ايضاً على كميات قليلة من الكلوكوز و مايواينوسيتول و تريهالوز . اما محتوى راشح الفطر *T. viride* من الكاربوهيدرات فقد كان الأعلى بين المركبات الأخرى اذ بلغ 66.6 % و ذلك بعد تنميته على وسط نخالة الحنطة السائل (45) . و فيما يخص الفينولات فقد اشار (46) الى تنقية الفينولات من النواتج الأيضية للفطر *P. brevicompactum* باستخدام تقانة High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .

الجدول (3) نتائج الكشوفات النوعية للمستخلصات الفطرية

الكشوفات النوعية	*A . Niger*	*A . terreus*	*Penicillium sp.*	*T. harzianum*
الكشف عن القلويدات **● كاشف ماير**	+	+	+	+
الكشف عن التانينات **● كشف خلات الرصاص**	+	+	+	+
الكشف عن الصابونينات **● كشف الرغوة الكثيفة**	-	+	+	-
الكشف عن الكلايكوسيدات **● كاشف موليش**	-	+	+	+
الكشف عن الفلافونيدات **● كشف حامض الكبريتيك المركز**	+	+	-	-
الكشف عن الكاربوهيدرات **● كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز**	+	+	+	+
الكشف عن الفينولات **● كشف كلوريد الحديديك**	-	-	-	-

+ كشف موجب - كشف سالب

المصادر:

1- **Melo, I. S. ; Moretini, A. ; Cassiolato, A. M. R. & Faull, J. L. (2011).** Development of mutants of *Coniothyrium minitans* improved efficiency for control of *Sclerotinia sclerotiorum*, Journal of Plant Protection Research, 51(2) :179 – 183.

2- **Saharan, G. S. & Mehta, N. (2008)**. *Sclerotinia* diseases of crop plants : biology, ecology and disease management, Department of Scientific and Industrial Research, New Zealand, :531 pp.

3- **Dhliwayo, T. (2008).** Alternative products in the inhibition of the plant pathogen Sclerotinia sclerotiorum on potato production. M. Sc. Thesis. Nelson Mandela Metropolitan University.pp. 80.

4- **Pal, K. K. & Gardener, B. M. (2006).** Biological control of plant pathogens, The Plant Health Instructor. pp. 25.

5- **Reshu & Khan, M. M. (2012).** Role of different microbial - origin bioactive antifungal compounds against *Alternaria spp*. causing leaf blight of mustard, Plant Pathology Journal, 11(1): 1 – 9.

6- **Choubey, P. (2012).** Isolation and characterization of fungal strains as Biocontrol agents, World Journal of Science and Technology, 2(6): 66 – 68.

7- **Awaad, A. S. ; Nabilah, A. A. & Zain, M. E. (2012).** New antifungal compounds from *Aspergillus terreus* isolated from desert soil, Phytother. Res.pp. 5.

8- **Grossbard, E. (1952).** Antibiotic production by fungi on organic manures and in soil, J. gen. Microbiol., 6: 295 – 310.

9- **Willetts, H. J. & Wong, J. A. L. (1980).** The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature, *The Botanical Review*,46: 101 – 165.

10- **Thanaboripat, D. ; Thawai, C. , Jindaporn, N. , Mathurot, O. & Kongniam, O. (2011).** Growth inhibition of *Aspergillus flavus* IMI 242684 by crude extract of *Penicillium sp*., KMITL Sci. Tech. J., 11(2): 79 – 84.

11- **Alam, S. S. ; Sakamoto, K. , Amemiya, y. & Inubushi, K. (2010).** Biocntrol of soil-born *Fusarium* wilts of tomato and cabbge with a root-colonizing fungus, *Penicillium sp*. EU0013. World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. Pp. 3.

12- **Rabeendran, N. ; Jones, E. E. & Stewart, A. (1998).** Isolation and in vitro screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, Microbial Control of Plant Pathogens, :102 – 106.

13- **Amin, F. ; Razdan, V. K. , Mohiddin, F. A. , Bhat, K. A. & Sheikh, P. A. (2010).** Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens in –vitro, J. Phytol., 2(10): 34 – 37.

14- **Benzohra, I. E. ; Bendahmane, B. S. , Labdi, M. & Bnekada, M. Y. (2011).** In vitro biocontrol using the antagonist *Trichoderma harzianum* against the algerian isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of *Ascochyta* blight in chickpea (*Cicer arietinum*)

15- **Mwangi, E. S. K. ; Gatebe, E. G. & Ndung'u, M. W. (2012).** Impact of nutritional (C:N ratio and source) on growth, oxalate accumulation, and culture pH by *Sclerotinia sclerotiorum*, Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 2(10): 2224 – 3208.

16- **Ibarra-Medina, V. A. ; Ferrera-Cerrato, R. , Alarcon, A. , Lara- Hernandez, M. A. & Valdez-Carrasco, J. M. (2010).** Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*, Revista Mexicana De Micologia, 31: 53 – 63.

17- **Medic-Saric, M. ; Jasprica, I. , Smolcic-Bubalo, A. & Mornar, A. (2004).** Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids, CCACAA., 7(1-2): 361 – 366. .

18- **Mabrouk, A. M. ; Kheiralla, Z. H. , Hamed, E. R. , Youssry, A. A. & Abd El Aty, A. A. (2008).** Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Varicosporina ramulosa*, Mal. J. Microbiol., 4(1): 14 – 24.

19- **Vinokurova, N. G. ; Boichenko, L. V. & Arinbasarov, M. U. (2003).** Production of alkaloids by fungi of the genus *Penicillium* grown on wheat grain, Applied Biochemistry and Microbiology, 39(4): 403 – 406.

20- **Murugan, K. ; Saravanababu, S. & Arunachalam, M. (2007).** Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process, Bioresource Technology, 98: 946 – 949.

21- **Lal, D. ; Shrivastava, D. , Verma, H. N. & Gardner, J. J. (2012).** production of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) from *Aspergillus niger* isolated from bark of *Acacia milotica*, J. Microbiol. Biotech. Res., 2(4): 566 – 572.

22- **Li, Y. ; Wu, H. , Yang, H. & You, X. (2012).** Isolation and characterization of saponin-producing fungal endophytes from *Aralia elata* in northeast china, Int. J. Mol. Sci., 13: 16255 – 16266.

23- **Clardy, J. ; Freinkman, E. , Oh, DC. , Scott, J. J. & Currie C. R. (2009).** Bionectriol A, a polyketide glycoside from the fungus *Bionectria sp*. associated with the fungus-growing ant, *Apterostigma dentigerum*, Tetrahedron let., 50(49): 6834 – 6837.

24- **Lu, C. & Mei, X. (2003).** Improvement of phenylethanoid glycosides production by fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*, Biotechnology Letters, 25: 1437 – 1439.

25- **Koffas, M. A. G. ; Fowler, Z. L. , Baron, C. M. & Panepinto, J. C. (2010).** Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases, Yeast, 28: 181 – 188.

26- **Khachatourians, G. G. ; Bidochka, M. J. & Low, N. H. (1990).** Carbohydrate storage in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, Applied and Enviromental Microbiology, 56(10): 3186 – 3190.

27- **Packter, N. M. (1969).** Studies on the biosynthesis of phenols in fungi, Biochem. J., 114: 369 – 377.

28- **Bollag, J. M. ; Sjoblad, R. D. & Minard, R. D. (1977).** Polymerization of phenolic intermediates of pesticides by a fungal enzyme, Experientia, 33(12): 1564 – 1566.

29- Harborne, J. B. (1984). Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. Chapman and Hall, London , NewYork. pp. 288.

30- Adedayo, O. ; Anderson, W. , Younge, M. , Sncickus, V. , Patil, P. & Kolawole, D. (2001). Phytochemistry and antibacterial activity of *Senna alata* flower, Pharmacut . Biol . 39 : 1 – 5.

31- Thom, C. & Raper, K. B. (1945). A manual of the *Aspergilli*. The Williams & Wilkins Company. U. S. A. pp. 373.

32- Neill, J. C. (1937). The mould of fungi of new Zealand. pp. 15.

33- Padmini, P. P. & Praveena, Y. (2011) . Antibacterial activities of mycotoxins from newly isolated filamentous fungi. International Journal of Plant , Animal and Environmental Sciences.1(1): 8 – 12.

34- Ling, K. H. ; Yang, C. K. ; Kuo, C. A. & Kuo, M. D. (1982). Solvent systems for improved isolation and separation of Territrems A and B . Applied and Environmental Microbiology. 44(4): 860 – 863

35- Anstis, S. (2004). *Penicillium radicum* : studies on the mechanisms of growth promotion in wheat . Ph. D. Thesis. School of Earth and Environmental Sciences. The University of Adelaide, Australia.

36- Choudary, K. A. ; Reddy, K. R. N. & Reddy, M. S. (2007). Antifungal activity and genetic variability of *Trichoderma harzianum* isolates . J. Mycol. P1 Pathol. 37(2): 1 – 6.

37- Vinale, F. ; Marra, R. ; Scala, F. ; Ghisalberti, E. L. ; Lorito, M. & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters Appl. Microbiol. 43(2): 143 – 148.

38- Vinokurova, N. G. ; Khmel'nitskaya, I. I. Baskunov, B. P. & Arinbasarov, M. U. (2003). Occurrence of indole alkaloids among secondary metabolites of soil *Aspergillus spp.* Applied Biochemistry and Microbiology. 39(2): 192 – 196.

39- Chen, M. ; Shao, C. ; Zhang, J. ; Zhao, D. ; She, Z. & Wang, C. (2013). Bioactive indole alkaloids and phenyl ether derivatives from marine – derived *Aspergillus sp*. fungus . J. Nat. Prod. 76(4): 547 – 53.

40- Zhang, G. L. ; Guo-You, L. ; Bo-Gang, L. ; Yang, T. ; Yin, J. H. ; Hua-Yi, Q. & Liu, G. Y. (2005). Sesterterpenoids, terretonins A-D, and an alkaloid, asterrelenin, from *Aspergillus terreus*. Journal of natural products. 68(8): 1243 – 1246.

41- Vinokurova, N. G. ; Baskunov, B. P. ; Zelenkova, N. F. & Arinbasarov, M. U.(2004). The alkaloids of *Penicillium aurantiogriseum* dierckx (1901) *var*. *aurantiogriseum* VKM F-1298. Microbiology. 73(4) : 414 – 419.

42- Yuan, X. H. ; Guo-Bo, X. ; Wei-Lin, W. ; Yang, T. & Guo-You, L. (2012). Peniciside, a new triterpenoid glycoside , from the fungus *Penicillium sp*. 169. Archives Pharmacal Research. 35(2): 311 – 314.

43- Mahmoud, Y. A. G. ; Assawah, S. W. ; EL-sharkawy, S. H. & Abdel-salam, A. (2008). Flavone biotransformation by *Aspergillus niger* and the characterization of two newly formed metabolites. Mycobiology. 36(2): 121 – 133.

44- Holligan, P. M. & Lewis, D. H. (1973). The soluble carbohydrates of *Aspergillus clavatus* . Journal of General Microbiology. 75: 155 – 159.

45- Uma, M. N. & Aiswarya, K. (2012). Conversion of natural wastes into sugar by *Trichoderma viride* . International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. 3(2): 8 – 12.

46- Andersen, B. (1991). Consistent production of phenolic compounds by *Penicillium brevicompactum* for chemotaxonomic characterization . Antonie Van Leeuwenhoek. 60(2) : 115 – 23.