Effect of Chitinase Enzyme on Antagonism Process between *Trichoderma harzianum* Rifai and *Rhizoctonia solani* Kuhn under Laboratory Condition

A Thesis
Submitted to the Council of the College of Science
University of Babylon
In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biology – Botany / Plant Pathology

By

Zena Hadi Obead

March - ٢٠٠٦ **Soofer -**

١٤٢٧

دراسة مختبرية لتأثير إنزيم الكايتنيز في عملية التضاد بين الفطرين *Trichoderma harzianum* Rifai و *Rhizoctonia solani* Kuhn

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية العلوم - جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم
في علوم الحياة

من
زينة هادي عبيد

آذار - ٢٠٠٦ صفر - ١٤٢٧

قائمة المحتويات

ت	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة باللغة العربية	I
	قائمة المحتويات	III
	المختصرات	VI
	قائمة الجداول	VII
	قائمة الأشكال	VIII
	قائمة الصور	X
١	**الفصل الأول: المقدمـــة**	١
٢	**الفصل الثـــاني: استعراض المـــراجع**	٣
٢-١	الخصائص التشخيصية والتصنيفية للفطر *Rhizoctonia*	٣
٢-١-١	تشخيص الفطر *R. solani*	٣
٢-١-٢	تصنيف الفطر *R. solani*	٤
٢-٢	المدى العائلي للفطر *Rhizoctonia solani*	٥
٢-٣	تأثير العوامل البيئية في نمو الفطر *Rhizoctonia solani*	٦
٢-٣-١	درجة الحرارة	٦
٢-٣-٢	الرقم الهيدروجيني	٨
٢-٤	الخصائص التشخيصية والتصنيفية للفطر *Trichoderma*	٩
٢-٤-١	تشخيص الفطر *Trichoderma*	٩
٢-٤-٢	تصنيف الفطر *Trichoderma*	١٠
٢-٥	دور الفطر *Trichoderma* في المكافحة الاحيائية	١١
٢-٦	تأثير بعض العوامل البيئية في نمو وفعالية الفطر *Trichoderma*	١٣
٢-٦-١	درجة الحرارة	١٣
٢-٦-٢	الرقم الهيدروجيني	١٤
٢-٧	آليات التضاد	١٥
٢-٧-١	التنافس	١٦
٢-٧-٢	التضاد الحيوي	١٧
٢-٧-٣	المقاومة المستحثة	١٩
٢-٧-٤	التطفل	٢٠
٢-٨	الأنزيمات	٢٤
٢-٨-١	انزيم الكايتينيز	٢٥
٢-٨-٢	العوامل المؤثرة في إنتاج أنزيم الكايتنيز	٣٠
٢-٨-٢-١	نوع المصدر الكاربوني	٣٠
٢-٨-٢-٢	الرقم الهيدروجيني	٣١
٢-٨-٢-٣	مدة الحضن	٣٢
٢-٨-٢-٤	درجة الحرارة	٣٢
٢-٨-٣	تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية انزيم الكايتنيز وثباتيته	٣٣
٣	**الفصل الثـالث/ المـواد وطرائـق العمل**	٣٥
٣-١	المواد والأجهزة المستعملة	٣٥
٣-١-١	المواد الكيمياوية	٣٥
٣-١-٢	الأجهزة المستعملة	٣٧

ت	الموضوع	رقم الصفحة
٣-١-٣	الأوساط الغذائية	٣٨
٣-١-٤	المحاليل	٤٠
٣-١-٥	الكواشف	٤١
٣-٢	طرائق العمل	٤٢
٣-٢-١	مصدر اللقاح الفطري	٤٢
٣-٢-١-١	الفطر *Rhizoctonia solani*	٤٢
٣-٢-١-٢	الفطر *Trichoderma harzianum*	٤٢
٣-٢-٢	حفظ اللقاح الفطري	٤٣
٣-٢-٣	تحضير اللقاح الفطري	٤٣
٣-٢-٤	تأثير الفطر *R. solani* في نسبة انبات بذور الطماطة	٤٣
٣-٢-٥	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *R. solani*	٤٤
٣-٢-٦	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *T. harzianum*	٤٤
٣-٢-٧	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *R. solani*	٤٥
٣-٢-٨	استخلاص الكايتين	٤٦
٣-٢-٩	تحضير الكايتين الغروي	٤٧
٣-٢-١٠	تحضير الغزل الفطري الطري والجاف للفطر الممرض *R. solani*	٤٧
٣-٢-١١	الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لأنزيم الكايتنيز	٤٨
٣-٢-١٢	الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لأنزيم البروتييز	٤٩
٣-٢-١٣	تقدير السكريات المختزلة والمنحنى القياسي لـ سكر D-glucose	٤٩
٣-٢-١٤	قياس الفعالية الأنزيمية للكايتنيز	٥١
٣-٢-١٥	تحديد الظروف المثلى لإنتاج انزيم الكايتنيز	٥١
٣-٢-١٥-١	المصدر الكاربوني ومدة الحضن	٥٢
٣-٢-١٥-٢	الرقم الهيدروجيني	٥٢
٣-٢-١٥-٣	درجة الحرارة	٥٣
٣-٢-١٥-٤	التهوية	٥٣
٣-٢-١٦	تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم الخام	٥٣
٣-٢-١٧	تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم الخام	٥٤
٣-٢-١٨	تأثير الراشح الأنزيمي الخام للفطر *T harzianum* في نمو الفطر الممرض *R. solani*	٥٤
٣-٣	التحليل الإحصائي	٥٥
٤	**الفصل الرابــع/ النتائــج**	٥٦
٤-١	تأثير الفطر *R. solani* في نسبة انبات بذور الطماطة	٥٦
٤-٢	تأثير بعض العوامل البيئية على نمو الفطر *R. solani*	٥٦
٤-٢-١	درجة الحرارة	٥٦
٤-٢-٢	الرقم الهيدروجيني	٥٧
٤-٣	تأثير بعض العوامل البيئية على نمو الفطر *T. harzianum*	٦٢
٤-٣-١	درجة الحرارة	٦٢
٤-٣-٢	الرقم الهيدروجيني	٦٣
٤-٤	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني على الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *R. solani*	٦٧

ت	الموضوع	رقم الصفحة
٤-٥	استخلاص الكايتين	٧٠
٤-٦	الكشف عن انتاج أنزيم الكايتينيز	٧٠
٤-٧	الكشف عن انتاج أنزيم البروتيز	٧٠
٤-٨	تحديد الظروف البيئية المثلى لانتاج انزيم الكاتينيز	٧٢
٤-٨-١	نوع المصدر الكربوني	٧٢
٤-٨-٢	مدة الحضن	٧٢
٤-٨-٣	الرقم الهيدروجيني	٧٣
٤-٨-٤	درجة الحرارة	٧٥
٤-٨-٥	التهوية	٧٥
٤-٩	الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم الخام	٧٦
٤-١٠	الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الانزيم الخام	٧٧
٤-١١	تأثير معاملات الراشح الأنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في معدلات نمو الفطر *R. solani*	٧٧
٥	**الفصل الخامس/ المناقشة**	٨١
	الاستنتاجات	٩٩
	التوصيات	١٠٠
	المصادر	١٠١
	الخلاصة باللغة الإنكليزية	A

المختصرات

الرمز	الوصف
MSM	Minimal Synthetic Medium
PDA	Potato Dextrose Agar
PSB	Potato Sucrose Broth

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
١	يوضح المواد الكيمياوية المستعملة في التجارب المختبرية فضلاً عن الشركات المصنعة لها	٣٥
٢	يوضح الأجهزة المستعملة في التجارب المختبرية فضلاً عن الشركات المصنعة لها	٣٧
٣	يوضح الكشف عن مستوى تحلل الكايتن باستعمال وسط الكايتن الغروي	٤٩
٤	تأثير درجات الحرارة والأرقام الهايدروجينية على الكفاءة التضادية للفطر *T. harzinum* ضد الفطر *R. solani* في وسط الـ PDA بعد مدة حضانة سبعة أيام	٦٨

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
١	يوضح تركيب الجدار الخلوي لمعظم الفطريات	٢٣
٢	آلية عمل انزيم الكايتينيز	٢٨
٣	يوضح عملية التأزر بين الأنزيمات والمضادات الحيوية المفرزة من قبل الفطر *Trichoderma* اثناء عملية تطفله على الفطريات الأخرى	٢٩
٤	المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز	٥٠
٥	تأثير درجات الحرارة في معدلات نمو الفطر *Rhizoctonia solani* النامي في وسط PDA عند الأرقام الهيدروجينية (أ) pH ٤ و (ب) pH ٦ و (ج) pH ٨ وبواقع ثلاثة مكررات	٥٩
٦	تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر *Rhizoctonia solani* النامي في وسط PDA عند درجات حرارة (أ) ١٥م و(ب) ٢٥م و(ج) ٣٥م وبواقع ثلاثة مكررات	٦٠
٧	تأثير درجات الحرارة في معدلات نمو الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط PDA عند الأرقام الهيدروجينية (أ) pH ٤ و (ب) pH ٦ و (ج) pH ٨ وبواقع ثلاثة مكررات	٦٥
٨	تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط PDA عند درجات حرارة (أ) ١٥ م و(ب) ٢٥ م و(ج) ٣٥ م وبواقع ثلاث مكررات	٦٦
٩	تأثير مدة الحضن ونوع المصدر الكربوني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM (برقم هيدروجيني ٦) وبدرجة حرارة ٣٠ م مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاث مكررات	٧٣
١٠	تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١٪ كمصدر وحيد للكربون وبدرجة حرارة ٣٠ م بعد مدة حضانة ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاث مكررات	٧٤
١١	تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM برقم هيدروجيني ٤ الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١٪ كمصدر وحيد للكربون بعد مدة حضن ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاث مكررات	٧٤
١٢	تأثير عامل التهوية والمزج في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط MSM بدرجة حرارة ٢٠م لمدة ٢٤ ساعة وبواقع ثلاث	٧٦

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
	مكررات	
١٣	تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الراشح الإنزيمي الخام للكايتنيز	٧٧
١٤	تأثير المعاملات للراشح الإنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في معدلات نمو الفطر *R. solani* النامي في وسط الـ PDA بدرجة حرارة ٢٥م (أ): برقم هيدروجيني ٤ (ب): برقم هيدروجيني ٧ وبواقع ثلاث مكررات	٧٩
١٥	التركيب الكيميائي لكل من (أ) الكايتين، (ب) الكيتو زان، (ج) السليلوز	٨٨

قائمة الصور

رقم الصورة	عنوان الصورة	الصفحة
١	تأثير الفطر *R. solani* في نسبة أنبات بذور الطماطة على وسط PDA بعد مدة حضن سبعة ايام بدرجة حرارة ٢٥ م (أ) سيطرة، (ب) بذور الطماطة المعاملة بالفطر الممرض	٦١
٢	تأثير الفطر *T. harzianum* في نمو الفطر *R. solani* بعد مدة حضن سبعة ايام على وسط PDA عند : أ- ٤ pH و ١٥ م°، ب- ٤ pH و ٢٥ م°، ت- ٤ pH و ٣٥ م°، ج- ٦ pH و ١٥ م°، د- ٦ pH و ٢٥ م°، ر- ٦ pH و ٣٥ م°، هـ - ٨ pH و ١٥ م°، و- ٨ pH و ٢٥ م°، ي- ٨ pH و ٣٥ م°	٩٦
٣	تحلل الكايتين بفعل الفطر *T. harzianum* على وسط الكايتين الغروي بدرجة حرارة ٢٨ م لمدة ١٤ يوم	٧١
٤	تحلل البروتين بفعل الفطر *T. harzianum* على وسط Skim milk في درجة حرارة ٢٥ م لمدة ٤٨ ساعة	٧١
٥	تأثير الراشح الخام لأنزيم الكايتينيز المفصول والمركز بالأستون للفطر *T. harzianum* في نمو الفطر *R. solani* بعد مدة حضن ثلاثة ايام على وسط PDA برقم هيدروجيني ٤ ودرجة حرارة ٢٠ م	٨٠
٦	تأثير الفطر المضاد *T. harzianum* في الصفات المظهرية لخيوط الفطر الممرض *R. solani* : أ- خيوط الفطر الممرض في معاملة السيطرة . ب- التفاف خيوط الفطر المضاد حول خيوط الفطر الممرض. ج- تشوه مظهر الخيوط الفطرية للفطر الممرض وتجمع ابواغ الفطر المضاد على خيوط الفطر الممرض، قوة التكبير ٤٠٠x	٨٦

قائمة المحتويات

ت	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة باللغة العربية	I
	قائمة المحتويات	III
	المختصرات	VI
	قائمة الجداول	VII
	قائمة الأشكال	VIII
	قائمة الصور	X
١	**الفصل الأول: المقدمـــة**	١
٢	**الفصل الثـــاني: استعراض المـــراجع**	٣
٢-١	الخصائص التشخيصية والتصنيفية للفطر *Rhizoctonia*	٣
٢-١-١	تشخيص الفطر *R. solani*	٣
٢-١-٢	تصنيف الفطر *R. solani*	٤
٢-٢	المدى العائلي للفطر *Rhizoctonia solani*	٥
٢-٣	تأثير العوامل البيئية في نمو الفطر *Rhizoctonia solani*	٦
٢-٣-١	درجة الحرارة	٦
٢-٣-٢	الرقم الهيدروجيني	٨
٢-٤	الخصائص التشخيصية والتصنيفية للفطر *Trichoderma*	٩
٢-٤-١	تشخيص الفطر *Trichoderma*	٩
٢-٤-٢	تصنيف الفطر *Trichoderma*	١٠
٢-٥	دور الفطر *Trichoderma* في المكافحة الاحيائية	١١
٢-٦	تأثير بعض العوامل البيئية في نمو وفعالية الفطر *Trichoderma*	١٣
٢-٦-١	درجة الحرارة	١٣
٢-٦-٢	الرقم الهيدروجيني	١٤
٢-٧	آليات التضاد	١٥
٢-٧-١	التنافس	١٦
٢-٧-٢	التضاد الحيوي	١٧
٢-٧-٣	المقاومة المستحثة	١٩
٢-٧-٤	التطفل	٢٠
٢-٨	الأنزيمات	٢٤
٢-٨-١	انزيم الكايتينيز	٢٥
٢-٨-٢	العوامل المؤثرة في إنتاج أنزيم الكايتنيز	٣٠
٢-٨-٢-١	نوع المصدر الكاربوني	٣٠
٢-٨-٢-٢	الرقم الهيدروجيني	٣١
٢-٨-٢-٣	مدة الحضن	٣٢
٢-٨-٢-٤	درجة الحرارة	٣٢
٢-٨-٣	تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية انزيم الكايتنيز وثباتيته	٣٣
٣	**الفصل الثـالث/ المـواد وطرائـق العمل**	٣٥
٣-١	المواد والأجهزة المستعملة	٣٥
٣-١-١	المواد الكيمياوية	٣٥
٣-١-٢	الأجهزة المستعملة	٣٧

ت	الموضوع	رقم الصفحة
٣-١-٣	الأوساط الغذائية	٣٨
٣-١-٤	المحاليل	٤٠
٣-١-٥	الكواشف	٤١
٣-٢	طرائق العمل	٤٢
٣-٢-١	مصدر اللقاح الفطري	٤٢
٣-٢-١-١	الفطر *Rhizoctonia solani*	٤٢
٣-٢-١-٢	الفطر *Trichoderma harzianum*	٤٢
٣-٢-٢	حفظ اللقاح الفطري	٤٣
٣-٢-٣	تحضير اللقاح الفطري	٤٣
٣-٢-٤	تأثير الفطر *R. solani* في نسبة انبات بذور الطماطة	٤٣
٣-٢-٥	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *R. solani*	٤٤
٣-٢-٦	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *T. harzianum*	٤٤
٣-٢-٧	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *R. solani*	٤٥
٣-٢-٨	استخلاص الكايتين	٤٦
٣-٢-٩	تحضير الكايتين الغروي	٤٧
٣-٢-١٠	تحضير الغزل الفطري الطري والجاف للفطر الممرض *R. solani*	٤٧
٣-٢-١١	الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لأنزيم الكايتنيز	٤٨
٣-٢-١٢	الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لأنزيم البروتييز	٤٩
٣-٢-١٣	تقدير السكريات المختزلة والمنحنى القياسي لـ سكر D-glucose	٤٩
٣-٢-١٤	قياس الفعالية الأنزيمية للكايتنيز	٥١
٣-٢-١٥	تحديد الظروف المثلى لإنتاج انزيم الكايتنيز	٥١
٣-٢-١٥-١	المصدر الكاربوني ومدة الحضن	٥٢
٣-٢-١٥-٢	الرقم الهيدروجيني	٥٢
٣-٢-١٥-٣	درجة الحرارة	٥٣
٣-٢-١٥-٤	التهوية	٥٣
٣-٢-١٦	تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم الخام	٥٣
٣-٢-١٧	تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم الخام	٥٤
٣-٢-١٨	تأثير الراشح الأنزيمي الخام للفطر *T harzianum* في نمو الفطر الممرض *R. solani*	٥٤
٣-٣	التحليل الإحصائي	٥٥
٤	**الفصل الرابــع/ النتائــج**	٥٦
٤-١	تأثير الفطر *R. solani* في نسبة انبات بذور الطماطة	٥٦
٤-٢	تأثير بعض العوامل البيئية على نمو الفطر *R. solani*	٥٦
٤-٢-١	درجة الحرارة	٥٦
٤-٢-٢	الرقم الهيدروجيني	٥٧
٤-٣	تأثير بعض العوامل البيئية على نمو الفطر *T. harzianum*	٦٢
٤-٣-١	درجة الحرارة	٦٢
٤-٣-٢	الرقم الهيدروجيني	٦٣
٤-٤	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني على الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *R. solani*	٦٧

ت	الموضوع	رقم الصفحة
٤-٥	استخلاص الكايتين	٧٠
٤-٦	الكشف عن انتاج أنزيم الكايتينيز	٧٠
٤-٧	الكشف عن انتاج أنزيم البروتيز	٧٠
٤-٨	تحديد الظروف البيئية المثلى لانتاج انزيم الكاتينيز	٧٢
٤-٨-١	نوع المصدر الكربوني	٧٢
٤-٨-٢	مدة الحضن	٧٢
٤-٨-٣	الرقم الهيدروجيني	٧٣
٤-٨-٤	درجة الحرارة	٧٥
٤-٨-٥	التهوية	٧٥
٤-٩	الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم الخام	٧٦
٤-١٠	الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الانزيم الخام	٧٧
٤-١١	تأثير معاملات الراشح الأنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في معدلات نمو الفطر *R. solani*	٧٧
٥	**الفصل الخامس/ المناقشة**	٨١
	الاستنتاجات	٩٩
	التوصيات	١٠٠
	المصادر	١٠١
	الخلاصة باللغة الإنكليزية	A

المختصرات

الرمز	الوصف
MSM	Minimal Synthetic Medium
PDA	Potato Dextrose Agar
PSB	Potato Sucrose Broth

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
١	يوضح المواد الكيمياوية المستعملة في التجارب المختبرية فضلاً عن الشركات المصنعة لها	٣٥
٢	يوضح الأجهزة المستعملة في التجارب المختبرية فضلاً عن الشركات المصنعة لها	٣٧
٣	يوضح الكشف عن مستوى تحلل الكايتن باستعمال وسط الكايتن الغروي	٤٩
٤	تأثير درجات الحرارة والأرقام الهايدروجينية على الكفاءة التضادية للفطر *T. harzinum* ضد الفطر *R. solani* في وسط الـ PDA بعد مدة حضانة سبعة أيام	٦٨

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
١	يوضح تركيب الجدار الخلوي لمعظم الفطريات	٢٣
٢	آلية عمل انزيم الكايتينيز	٢٨
٣	يوضح عملية التأزر بين الأنزيمات والمضادات الحيوية المفرزة من قبل الفطر *Trichoderma* اثناء عملية تطفله على الفطريات الأخرى	٢٩
٤	المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز	٥٠
٥	تأثير درجات الحرارة في معدلات نمو الفطر *Rhizoctonia solani* النامي في وسط PDA عند الأرقام الهيدروجينية (أ) pH ٤ و (ب) pH ٦ و (ج) pH ٨ وبواقع ثلاثة مكررات	٥٩
٦	تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر *Rhizoctonia solani* النامي في وسط PDA عند درجات حرارة (أ) ١٥م و(ب) ٢٥م و(ج) ٣٥م وبواقع ثلاثة مكررات	٦٠
٧	تأثير درجات الحرارة في معدلات نمو الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط PDA عند الأرقام الهيدروجينية (أ) pH ٤ و (ب) pH ٦ و (ج) pH ٨ وبواقع ثلاثة مكررات	٦٥
٨	تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط PDA عند درجات حرارة (أ) ١٥ م و(ب) ٢٥ م و(ج) ٣٥ م وبواقع ثلاث مكررات	٦٦
٩	تأثير مدة الحضن ونوع المصدر الكربوني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM (برقم هيدروجيني ٦) وبدرجة حرارة ٣٠ م مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاث مكررات	٧٣
١٠	تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١٪ كمصدر وحيد للكربون وبدرجة حرارة ٣٠ م بعد مدة حضانة ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاث مكررات	٧٤
١١	تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM برقم هيدروجيني ٤ الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١٪ كمصدر وحيد للكربون بعد مدة حضن ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاث مكررات	٧٤
١٢	تأثير عامل التهوية والمزج في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط MSM بدرجة حرارة ٢٠م لمدة ٢٤ ساعة وبواقع ثلاث	٧٦

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
	مكررات	
١٣	تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الراشح الإنزيمي الخام للكايتنيز	٧٧
١٤	تأثير المعاملات للراشح الإنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في معدلات نمو الفطر *R. solani* النامي في وسط الـ PDA بدرجة حرارة ٢٥م (أ): برقم هيدروجيني ٤ (ب): برقم هيدروجيني ٧ وبواقع ثلاث مكررات	٧٩
١٥	التركيب الكيميائي لكل من (أ) الكايتين، (ب) الكيتو زان، (ج) السليلوز	٨٨

قائمة الصور

رقم الصورة	عنوان الصورة	الصفحة
١	تأثير الفطر *R. solani* في نسبة أنبات بذور الطماطة على وسط PDA بعد مدة حضن سبعة ايام بدرجة حرارة ٢٥ م (أ) سيطرة، (ب) بذور الطماطة المعاملة بالفطر الممرض	٦١
٢	تأثير الفطر *T. harzianum* في نمو الفطر *R. solani* بعد مدة حضن سبعة ايام على وسط PDA عند : أ- ٤ pH و ١٥ م°، ب- ٤ pH و ٢٥ م°، ت- ٤ pH و ٣٥ م°، ج- ٦ pH و ١٥ م°، د- ٦ pH و ٢٥ م°، ر- ٦ pH و ٣٥ م°، هـ - ٨ pH و ١٥ م°، و- ٨ pH و ٢٥ م°، ي- ٨ pH و ٣٥ م°	٩٦
٣	تحلل الكايتين بفعل الفطر *T. harzianum* على وسط الكايتين الغروي بدرجة حرارة ٢٨ م لمدة ١٤ يوم	٧١
٤	تحلل البروتين بفعل الفطر *T. harzianum* على وسط Skim milk في درجة حرارة ٢٥ م لمدة ٤٨ ساعة	٧١
٥	تأثير الراشح الخام لأنزيم الكايتينيز المفصول والمركز بالأستون للفطر *T. harzianum* في نمو الفطر *R. solani* بعد مدة حضن ثلاثة ايام على وسط PDA برقم هيدروجيني ٤ ودرجة حرارة ٢٠ م	٨٠
٦	تأثير الفطر المضاد *T. harzianum* في الصفات المظهرية لخيوط الفطر الممرض *R. solani* : أ- خيوط الفطر الممرض في معاملة السيطرة . ب- التفاف خيوط الفطر المضاد حول خيوط الفطر الممرض. ج- تشوه مظهر الخيوط الفطرية للفطر الممرض وتجمع ابواغ الفطر المضاد على خيوط الفطر الممرض، قوة التكبير ٤٠٠x	٨٦

بسم الله الرحمن الرحيم

توصية الأستاذين المشرفين

نشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (**دراسة مختبرية لتأثير إنزيم الكايتنيز في عملية التضاد بين الفطرين *Trichoderma harzianum* Rifai و *Rhizoctonia solani* Kuhn**) قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة (أمراض نبات).

التوقيع:
المشرف: د. جواد كاظم الجنابي
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع
المشرف: د. رباب عمران راضي
المرتبة العلمية: مدرس
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى توصية الأستاذين المشرفين أعلاه، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الاسم: د. علي شعلان الأعرجي
المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

بسم الله الرحمن الرحيم

قرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة، بأننا اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة زينة هادي عبيد في محتوياتها، وفيما له علاقة بها، ووجدنا أنها جديرة لنيل درجة ماجستير في علوم الحياة – أمراض نبات.

رئيس اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. فائز صاحب غالي
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية العلوم / جامعة القادسية
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. جبار محسن جابر
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية الزراعة / جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. ضياء سالم الوائلي
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية الزراعة / جامعة البصرة
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:
المشرف: د. جواد كاظم الجنابي
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع
المشرف: د. رباب عمران راضي
المرتبة العلمية: مدرس
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

مصادقة عمادة كلية العلوم

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه.

التوقيع:
الاسم: د. عوده مزعل ياسر
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية العلوم / جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وَعَلَّمَكَ مَا لَمْ تَكُن تَعْلَمُ وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا ﴾ (١١٣)

صدق الله العلي العظيم

سورة النساء

الآية (١١٣)

الفصل الأول
المقدمة

الفصل الثاني
استعراض المراجع

الفصل الثالث
المواد وطرائق العمل

الفصل الرابع
النتائج

الفصل الخامس
المناقشة

الإهداء

غمضت على شوك الدموع محاجري

وغفت على وهج اللظى آلامي

وأفقت واللهب المقدس نغمة

ضمدت جراحي بالهدى البسام

فكر يهدم كل عرش زائف

ويضع القواعد لكل نبع صاف

تنمو على فكر يفجر نبعه

فيها علي مصدر الإلهام

بالعلم والتوحيد غذيت العقول

وبحب آل المصطفى المختار

أهديتها لكنها لم تكتمل

إلا بذكر إسمك الوضاء

إلى سماحة آية الله العظمى

السيد كمال الحيدري (دام ضله)

أهدي رسالتي

شكر وتقدير

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خير خلقه أجمعين محمد وآله الطيبين الطاهرين.

لايسعني وأنا أشارف على نهاية دراسة الماجستير إلا أن أتقدم بالشكر والعرفان الجميل إلى كل من مد يد المساعدة لي سواء بالقول أو بالفعل مبتدئة بشكر الباري عز وجل ورحمته المهداة إلى العالمين محمد وآله الطيبين الطاهرين ووالدي العزيزين وأخوتي وأخواتي والعزيزة الغالية خالتي وإلى رمز الأبوة والعلم أستاذي الفاضل الدكتور جواد الجنابي المحترم والأستاذة الفاضلة الدكتورة رباب عمران داعية لهم بطيب الحياة.

ولا يسعني إلا أن أتقدم بشكري وتقديري إلى رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لاتاحتهم الفرصة لي لاكمال دراسة الماجستير.

ولايمكنني نسيان فضل من لم يبخلوا علي بتوجيهاتهم العلمية وهم كل من

1. **الدكتور عصام الجميلي (معهد الهندسة الوراثية/ جامعة بغداد).**
2. **الدكتور غازي منعم عزيز (قسم التقانة الإحيائية في كلية العلوم/جامعة بغداد).**
3. **الدكتور مؤمن الكتاتني (كلية العلوم جامعة المنيا /جمهورية مصر العربية).**
4. **الدكتورة شذى سلمان حسن (قسم علوم الحياة/ جامعة بغداد).**
5. **الدكتور هادي مزعل (كلية العلوم للبنات/ جامعة بابل).**
6. **الدكتور علاء هاني الجراخ (كلية الطب/ جامعة بابل).**
7. **الدكتور زيدان خلف (كلية العلوم للبنات/ جامعة بابل).**
8. **الدكتور مالك حسن (مركز علوم البحار/ جامعة البصرة)**

وشكر خاص إلى الدكتور عوده مزعل/ عميد كلية العلوم والدكتور قاسم حسن كاظم/ رئيس قسم الكيمياء وإلى الأستاذ عدي جاسم عبد الرزاق والأستاذ أياد محمد جبر والأخ محمود حسين والأخوات آمال حسين ورغد هادي وإلى المعيدين في قسم علوم الحياة وقسم الكيمياء كافة لمساعدتهم إياي في اتمام متطلبات البحث.

وأتقدم بالشكر الجزيل إلى جميع العاملين في المكتبة المركزية بجامعة بابل وأخص منهم بالذكر العاملين في شعبة الأطاريح وفي مقدمتهم السيد محمد هادي جاسم وشكري وتقديري إلى مديرة شعبة الأطاريح في المكتبة المركزية بجامعة بغداد الست ميسون.

وأخيراً لم يتبق لي إلا أن أتقدم بأسمى آيات العرفان إلى عقد الياسمين زميلاتي في الدراسة ندى سعد وإسراء عدنان وذكرى عبد العال وأنوار علي ونهى فالح وفادية حميد وآمال فيصل وأميرة عمران ولبنى عبد المطلب والوردة البيضاء الست سهى طه متعهن الله بالصحة والسلامة والموفقية والنجاح.

زينة

Abstract

Laboratory experiment were achieved on antagonism process between *Trichoderma harzianum* Rifai and *Rhizoctonia solani* Kuhn. The effect of environmental factors on growth of both fungi were involved in addition to the mechanism of bio-agent *Trichoderma harzianum*, the production of chitinase and it effect on growth of pathogens.

Environmental factors (temp. & pH) which can modify the morphological characteristics as well as physiological functions of target and bio-agent fungi were conducted under laboratory condition to investigate their effects on fungal growth at a regular intervals, interactions of both fungi and on bioactivity of *T. harzianum* towards *R. solani*.

Fungal growth of *R. solani* was significantly higher at ٢٥ ˚C and ٣٥ ˚C compared with that at ١٥ ˚C under all levels of pH used (٤, ٦ and ٨). pH at levels ٤ & ٦ have substantial influence on growth of this fungus but the latter was reduced sharply at ١٥ ˚C on growth medium adjusted to pH ٨.

Growth of *T. harzianum* was markedly increased at ٢٥ ˚C and pH ٤ but clearly reduced at ١٥ & ٣٥ ˚C and pH ٨ while the growth at pH ٦ was varied with degree of temperature used. Difference in response of fungus towards environmental parameter greatly affected the antagonism behavior of *T. harzianum* which categorized on competition of growth, rate of sporulation that relied upon capability of bio-agent fungus to utilize food in growth medium whether the fungi grow together or alone.

The mechanism of antagonism involve the adherence or convolution of *T. harzianum* mycelium around tissues of *R. solani* in addition to the secretion cell wall degradation enzymes. Preliminary experiments revealed that this fungus has the ability to produce protease and chitinase which could play an important role in antagonism.

In order to gain a better understanding of chitinase enzyme produced by *T. harzianum* during antagonism on a number of pathogenic fungi that

contained chitin in their cell walls, the laboratory experiment was achieved to determine the appropriate condition for production of enzyme using liquid medium (MSM).

Dry, fresh mycelium and chitin as the only source of carbon in growth medium were used to investigate the efficiency of *T. harzianum* for chitinase production. The results of this experiments showed that the enzyme production was greatly higher when MSM medium supplemented with dried mycelium at ٢٠ ˚C, pH ٤, with aeration and agitation (١٥٠ rpm) after ٢٤ h.

The activity and stability of raw Chitinase were studied, the experiment revealed that the highest activity of this enzyme was obtained at pH ٤ while the stability was around ٤-٧ as the enzyme maintained about ٩٠٪ of its activity.

The result suggested that the enzyme secretion which decanted by iced acetone (-٢٠ ˚C) at pH ٤ has high potential to inhibit growth of pathogen (٦٤٪ compared with other treatments).

الخلاصة

أجريت دراسة مختبرية لعملية التضاد بين فطر المكافحة الاحيائية *Trichoderma harzianum* Rifai والفطر الممرض *Rhizoctonia solani* Kuhn وقد تضمنت الدراسة تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطرين ودراسة آليات التضاد للفطر *T. harzianum* ودراسة إنتاجه للإنزيم الكايتنيز وأثره في نمو الفطر الممرض.

تضمنت الدراسة الحالية بيان تأثير تداخل عاملين هما درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر الممرض وكذلك في معدلات نمو فطر السيطرة الحيوية ومستوى كفاءته التضادية ضمن ثلاث درجات حرارية هي ١٥ و٢٥ و٣٥م وثلاثة أرقام هيدروجينية هي ٤ و٦ و٨ ولمدة سبعة أيام وقد بينت النتائج أن أعلى زيادة معنوية في معدلات النمو للفطر *R. solani* كانت عند درجتي الحرارة ٢٥ و٣٥م بينما أظهرت درجة الحرارة ١٥م تأثيراً واضحاً في خفض معدلات النمو عند الأرقام الهيدروجينية كافة وكان الانخفاض أكثر وضوحاً عند الرقم الهيدروجيني ٨ وعند الدرجات الحرارية كافة مقارنة ببقية الأرقام الهيدروجينية وفي المقابل ازدادت معدلات النمو بصورة كبيرة عند الرقم الهيدروجيني ٦ وتلاه الرقم الهيدروجيني ٤.

أما بالنسبة للفطر *T. harzianum* فقد أظهرت النتائج حصول زيادة معنوية كبيرة في معدلات النمو عند درجة الحرارة ٢٥م وانخفضت عند درجتي الحرارة ١٥ و٣٥م وفي الأرقام الهيدروجينية كافة باستثناء الرقم الهيدروجيني ٤ الذي كان له تأثير واضح في زيادة معدلات النمو عند الدرجات الحرارية كافة وتباين تأثير الرقم الهيدروجيني ٦ في معدلات النمو باختلاف درجات الحرارة في حين أظهر الرقم الهيدروجيني ٨ تأثيراً كبيراً في خفض معدلات النمو. إن هذا التباين في معدلات النمو باختلاف درجات الحرارة والأرقام الهيدروجينية لفطر المكافحة الاحيائية قد انعكس بصورة كبيرة على معدل كفاءته التضادية فقد لوحظ بأن الفطر بلغ أعلى مستوى له في التضاد عند الرقم الهيدروجيني ٤ وفي جميع درجات الحرارة بينما تباين تأثير الرقم الهيدروجيني ٦ في التأثير في درجة التضاد باختلاف درجات الحرارة وأظهر الرقم الهيدروجيني ٨ تأثيراً واضحاً في خفض الكفاءة التضادية للفطر عند الدرجات الحرارية كافة.

كما تضمنت الدراسة بيان دور آليتي التنافس والتطفل للفطر *T. harzinum* كإحدى الآليات المهمة في السيطرة الحيوية ضد الفطر *R. solani* وقد ظهر دور آلية التنافس جلياً من خلال سرعة نمو فطر المكافحة الاحيائية في وسط الـ Potato Dextrose Agar (PDA) مقارنة بالفطر الممرض فيما أوضحت الصور المجهرية لمنطقة التضاد التفاف خيوط الفطر *T. harzinum* على الغزل الفطري للمضيف وحصول تشوهات في جدران خلايا المضيف نتيجة لإفراز الفطر المسيطر للعديد من الإنزيمات والمركبات الايضية الأخرى ومن خلال الكشوفات التي أجريت تبين بأن للفطر المسيطر القدرة على إنتاج إنزيمي الكايتنيز والبروتييز. ولأهمية إنزيم الكايتنيز خلال عملية التطفل أجريت دراسة مختبرية لتحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاجه باستعمال الوسط السائل Minimal Synthetic Medium (MSM).

وقد تبين من النتائج بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان باستعمال الغزل الفطري الجاف للفطر *R. solani* كمصدر وحيد للكربون وعند درجة حرارة ٢٠م ورقم هيدروجيني ٤ بوجود التهوية والمزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة بعد مدة حضن ٢٤ ساعة.

كما أجريت دراسة لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتنيز الخام وثباته وقد تبين من النتائج بأن أعلى فعالية لإنزيم الكايتنيز الخام كانت عند الرقم الهيدروجيني ٤ وبلغت الفعالية الإنزيمية عنده ٠.٨٧٥ وحدة/مل. أما أعلى ثباتية له فقد كانت مابين ٤-٧ إذ احتفظ الإنزيم بـ ٩٠% من فعاليته.

استكملت الدراسة بتوضيح دور الآلية الإنزيمية في تثبيط نمو الفطر *R. solani* باستعمال الراشح الخام لإنزيم الكايتنيز وعند الرقمين الهيدروجينيين ٤ و٧. وقد تبين من النتائج بأن الراشح الإنزيمي الخام المفصول والمركز بالاسيتون المبرد بدرجة ٢٠-م عند الرقم الهيدروجيني ٤ أظهر أعلى نسبة في تثبيط نمو الفطر الممرض مقارنة ببقية المعاملات إذ بلغت نسبة التثبيط ٦٤%.

١ المقدمة Introduction

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.*, ٢٠٠٣).

تتضمن السيطرة الحيوية استعمال وسائل حياتية في مكافحة الآفات الزراعية، كاستعمال المستخلصات النباتية أو الكائنات الحية التي تعمل على تخفيض كمية لقاح الكائن الممرض بتقليل كفاءته في النمو والتكاثر بصورة مباشرة أو غير مباشرة وفي الوقت نفسه يكون لها تأثير إيجابي على نمو النبات وتحسين إنتاجه (Howell *et al.*, ٢٠٠٠). يطلق على الكائنات الحية المستعملة في هذه المكافحة بعامل السيطرة الحيوية (Biocontrol agent) أو عامل التضاد (Antagonistic agent) والعملية تعرف بالتضاد (Antagonism) (Elad, ١٩٩٦; Cook and Baker, ١٩٨٣) ولكي يتكامل عمل هذه المبيدات الحيوية في القضاء على العوامل الممرضة يتطلب تحقيق ظروف بيئية ملائمة لنمو وتطور كل من هذه الكائنات والنبات وفي الوقت نفسه مثبطة لنمو الكائن الممرض وفعاليته (Harman *et al.*, ٢٠٠٤).

ومن بين أكثر الكائنات استعمالاً في السيطرة الحيوية هو الفطر *Trichoderma harzianum* بسبب سهولة عزله وسرعة تكاثره وعدم احتياجه إلى متطلبات غذائية خاصة وتأثيره الإيجابي في نمو الكثير من النباتات فضلاً عن تأثيره التثبيطي لنمو الكثير من المسببات المرضية للنبات ومنها على وجه الخصوص الفطر *Rhizoctonia solani* الذي يعد أحد أهم المسببات لأمراض الذبول وموت البادرات وعلى مدى واسع من النباتات ذات الأهمية الاقتصادية العالية كنباتات العائلة الباذنجانية والفرعية وغيرها (Agrios, ١٩٩٧). يستعمل الفطر *Trichoderma harzianum* كمبيد حيوي على نطاق واسع في العالم ويتواجد في الأسواق المحلية باسم المبيد الحيوي البيوكونت Biocont ومبيد التحدي.

يتجسد عمل الفطر *T. harzianum* في القضاء على الفطر الممرض *R. solani* من خلال العديد من الآليات المعروفة بآليات التضاد التي تشمل التطفل والتنافس وإفراز مواد مثبطة وإنزيمات وأخيراً استحثاث المقاومة الكامنة في النبات ضد الفطر الممرض (Perez, Roco & ٢٠٠١; حميد، ٢٠٠٢; Makherjee *et al.*,٢٠٠٣; Harman *et al.*, ٢٠٠٤).

ولغرض إجراء دراسة واسعة عن آلية التضاد نفذت التجارب الآتية مختبرياً

١. دراسة تأثير العوامل البيئية في نمو الفطر الممرض *R. solani* وكذلك في نمو فطر المكافحة الاحيائية *T. harzianm* وكفاءته التضادية.

٢. بيان دور آليتي التنافس والتطفل للفطر *T. harzianum* في تثبيط نمو الفطر المرض.

٣. الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لإنزيمي الكايتنيز والبروتييز في أثناء تطفله على الفطر *R. solani*.

٤. تحديد الظروف البيئة المثلى لإنتاج أنزيم الكايتنيز.

٥. بيان دور إنزيم الكايتنيز الخام في تثبيط نمو الفطر الممرض.

٢-١ الخصائص التشخيصية والتصنيفية لفطر *Rhizoctonia solani*

٢-١-١ تشخيص الفطر *Rhizoctonia solani*

أشارت عدة دراسات إلى أن مستعمرات الفطر النامية على الوسط Potato dextrose agar بدرجة حرارة ٢٥ م تكون ذات لون شاحب أو عديمة اللون في بداية نموها على الطبق غير أنها تتحول إلى لون بني بتقدم عمر المستعمرة، وإن معدل نمو الفطر سريع جداً مقارنة بغيره من الفطريات، (Agrios, ١٩٩٧).

يتكون الغزل الفطري من هايفات مقسمة بحواجز مستعرضة سميكة الجدران تحوي بداخلها ثقوب dolipore septa، تسمح هذه الثقوب بحركة السايتوبلازم والمايتوكوندريا والانوية من خلية لأخرى، وتحوي كل خلية بداخلها على أكثر من ثلاث أنوية لاسيما في الخلايا النشطة. وقد استعمل التشريح الداخلي للحواجز المستعرضة وعدد الأنوية (CNN) Cellular nuclear number بصورة مكثفة من قبل الكثير من الباحثين في تمييز مستعمرات الفطر *R. solani* عن بقية الأنواع العائدة للجنس نفسه (Agrios, ١٩٩٧; Carling and Leiner, ١٩٨٦).

ونظراً لكون مستعمرات الفطر لا تكون كويندیات ونادراً ما تكون أبواغ بازيدية فمن الصعوبة تمييز النوع *R. solani* عن بقية الأنواع التابعة للجنس نفسه من خلال الصفات المظهرية للمستعمرات لذا استعمل مفهوم جديد لوصف وتشخيص الأنواع التابعة الفطر *Rhizoctonia* أطلق عليه بمعيار التوافق الوراثي للعزلات (hyphal anastomosis criteria) الذي يتضمن بأن عزلات الفطر التي لها القدرة على التمييز والاندماج مع بعضها البعض تمتلك علاقة وراثية فيما بينها أو متوافقة وراثياً، بينما لا توجد علاقة وراثية بين العزلات غير القادرة على الاندماج. وعلى هذا الأساس تم تقسيم الفطر *Rhizoctonia* إلى ثلاث عشرة مجموعة كل مجموعة تضم بداخلها مجاميع أخرى اعتماداً على شكل الأجسام الحجرية ويتماثل تعاقب القواعد في الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA فضلاً عن شكل مستعمرات الفطر (Carling *et al*, ٢٠٠٢; Cubeta and Vilgalys, ١٩٩٧)

تتفرع خيوط الفطر *R. solani* بزوايا حادة وتوجد تخصرات أو خلايا بيضوية الشكل في مناطق التفرع يطلق عليها بالخلايا المسبحية (Monilioid) التي تكون جدرانها أسمك من باقي جدران العزل الفطري، تكون تجمعات هذه الخلايا ما يسمى بالأجسام الحجرية (Sclerotia bodies) والتي تكون غير منتظمة الشكل وذات لون بني قاتم أو براق وغير متميزة إلى قشرة ولب وتتراوح أبعادها مابين 1– 3 ملم (Agrios, ١٩٩٧)

٢-١-٢ تصنيف الفطر *Rhizoctonia solani*

يصنف الفطر *Rhizoctonia solani* ضمن مجموعة الفطريات الناقصة العقيمة Agonomycetes (Mycelia sterilia) إذ يتميز بعدم تكوينه لأي نوع من الأبواغ إلا أنه يكون أجساماً حجرية صغيرة وغير منتظمة الشكل (Parameter, ١٩٧٠).

شخص النوع *R. solani* Kuhn من قبل الباحث Julius Kuhn في عام ١٨٥٨ على نبات البطاطا. يعرف الطور الجنسي الكامل للفطر باسم *Thanatephorus cucumeris* وقد وصف لأول مرة من قبل الباحثين Delacroiz وPrilieux في عام ١٨٩١ (Carling *et al.*, ٢٠٠٢) والذي يعود إلى مجموعة الفطريات البازيدية Basidiomycota، رتبة Ceratobasidiales عائلة Ceratobasidiaceae ويمتاز هذا الطور بتكوينه للأبواغ البازيدية basidiospore في الخلايا النباتية المصابة (Cubeta and Vilgalys, ١٩٩٧; Parameter, ١٩٧٠).

٢-٢ المدى العائلي للفطر *Rhizoctonia solani* ودورة الحياة

يعد الفطر *Rhizoctonia solani* أحد أهم فطريات التربة المرضية، يمتاز الفطر بمداه العائلي الواسع إذ يصيب الكثير من نباتات المحاصيل الاقتصادية المهمة كنباتات العائلة الباذنجانية، والقرعية والحنطة والرز والبزاليا وقصب السكر والقطن وغيرها من النباتات (Montealegre *et al.*, ٢٠٠٣; Agrios, ١٩٩٧). أشار (Hine, ١٩٩٩) إلى أن الفطر يصيب ٥٣٠ جنساً نباتياً سواء من ذوات الفلقة الوحدة أو من ذوات الفلقتين في منطقة اريزونا.

يسبب الفطر الكثير من الأمراض للنبات مثل مرض سقوط البادرات وتعفن الجذور واللفحة والقرحة وتعفن الثمار والمواد المخزونة وذلك تبعاً لنوع النبات وتشير المصادر إلى أن عدداً كبيراً من الخضروات معرضة للإصابة بمرض سقوط البادرات Damping-off فقد أمكن عزل الفطر من نباتات كثيرة كالطماطة والباذنجان والخيار والفلفل وغيرها وتختلف أعراض المرض حسب نوع العائل ومرحلة نموه والظروف البيئية المحيطة (Agrios, ١٩٩٧; Asaka and Shoda, ١٩٩٦ ; الوائلي، ٢٠٠٤).

أما أهم أعراض المرض فتتمثل بضعف سيقان البادرات المصابة مما يؤدي إلى سقوط النبات وموته ولكن إذا ما تمكن النبات من تكوين أنسجة الخشب فإن الفطر يهاجم الأجزاء المحيطة بالاسطوانة المركزية، ويتباين حجم منطقة الإصابة وقد تكون صغيرة بحجم رأس الدبوس أو كبيرة تمتد بما يزيد على ٢ سم على الساق وتحيط به، كما أن منطقة الإصابة تكون منخفضة وذات لون رمادي أو بني (Schwartz, ٢٠٠٤; Agrios, ١٩٩٧).

يعيش الفطر أما بصورة مترممة Saprophytic على المواد العضوية المتحللة الموجودة في التربة أو متطفلاً على الأنسجة النباتية الحية ويتواجد في التربة أما بهيئة غزل

فطري أو أجسام حجرية تنبت عند توفر الظروف الملائمة لها لتكون غزلاً فطرياً جديداً (Schwartz, ٢٠٠٤; Hodges, ٢٠٠٣; Agrios, ١٩٩٧).

ينجذب الفطر *R. solani* نحو العائل النباتي نتيجة لبعض المواد الكيماوية المفرزة من قبل النبات ويخترق الفطر منطقة البشرة ويستقر في الأنسجة الرخوة للأوراق الفلقية والسويقة والجذر وتظهر الأنسجة المصابة منخفضة قليلاً ويكون لونها بنياً فاتحاً أو بنياً محمراً مغطاة بخيوط فطرية صفراء أو بنية ملتصقة بالبشرة وتنمو من هذه المناطق الكثير من الخيوط الفطرية إلى الداخل بشكل مباشر أو بواسطة الضغط وتستقر بعد تحطيم الأنسجة الطرية من البادرة. يفرز الفطر حامض الاوكزاليك الذي يسبب قتل الخلايا النباتية وتحفيزها على إنتاج سكريات وحوامض أمينية، كما يفرز الفطر أيضاً إنزيمات محللة للسيليلوز والبكتين مما يؤدي إلى تحطيم الجدران المحيطة بالخلايا وانفصالها ثم موت الخلايا. ويكوّن الفطر في أنسجة النبات أجساماً حجرية تبقى حية لفترة طويلة (Hine, ١٩٩٩; Agrios, ١٩٩٧).

٢-٣ تأثير العوامل البيئية في نمو الفطر *Rhizoctonia solani*

٢-٣-١ درجة الحرارة

تعد درجة الحرارة من العوامل البيئية المهمة المؤثرة في مستوى نمو الفطر *R. solani* ونشاطه وفعاليته المرضية ويمتلك الفطر مدى واسع من درجات الحرارة يتراوح مابين 15 – 40 مْ في حين تتراوح أفضل درجة حرارة للنمو مابين 25 – 35 مْ (عباس، ١٩٩٨).

وتختلف الدراسات فيما بينها في تحديد الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر *R. solani* باختلاف نوعية العزلات فضلاً عن الاختلافات في طريقة حساب معدل النمو ونوع الوسط الزرعي المستعمل. فقد أشار (تكسانة، ١٩٨٣) إلى أن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر *R. solani* في وسط Czapek dox liquid medium هي ٣٠ م لكل من العزلات الممرضة وغير الممرضة وأبدت العزلة غير الممرضة قدرة على النمو في درجات الحرارة ١٠ و١٥ م. وأوضح (عباس، ١٩٩٨) إلى أن العزلات الممرضة من الفطر *R. solani* استطاعت النمو في درجات حرارية مرتفعة تراوحت مابين (35 – 40)م على وسط الـ PDA وقد تفوقت بذلك على العزلات غير الممرضة التي أظهرت قدرة على النمو في الدرجات الحرارية المنخفضة.

أشارت دراسة أجراها (Dorrance *et al.*, ٢٠٠٣) لاختبار تأثير درجات الحرارة ٢٠, ٢٤, ٢٨, ٣٢ م على قدرة ٤١ عزلة من الفطر *R. solani* في إصابة نبات فول الصويا وجد بأن خمسة من هذه العزلات قادرة على إحداث الإصابة في السويق تحت الفلقية ومنطقة الجذور لنبات فول الصويا عند جميع الدرجات الحرارية السابقة الذكر.

وفي المقابل يعتقد بعض الباحثين بأن الدرجات الحرارية المنخفضة والرطوبة العالية هي من أهم العوامل المشجعة على زيادة نسبة إصابة البادرات الحديثة لنباتات المحاصيل

الحقلية بالفطر *R. solani* إذ تعيق درجات الحرارة المنخفضة قدرة النبات على النمو وتضعف مقاومته ضد الكثير من المسببات المرضية وتزيد من الإفرازات الجذرية للنبات التي يستفيد منها الفطر الممرض كمواد غذائية تساعده على النمو والتكاثر وتزيد من فعاليته المرضية لذلك ينصح الكثير من الباحثين بتأخير زراعة مثل هذه النباتات حتى تصبح درجة حرارة التربة كحد أدنى ٣٦ م عند عمق أربعة إنجات تحت سطح التربة (Hodges, ٢٠٠٣; Frank and Leach, ١٩٨٠).

٢-٣-٢ الرقم الهيدروجيني pH

يمتاز الفطر *R. solani* بقدرته على النمو في مديات معينة من الرقم الهيدروجيني تختلف باختلاف نوع العزلة والمنطقة التي أخذت منها غير أن أغلب الدراسات تشير إلى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو الفطر *R. solani* يتراوح مابين ٥ – ٦ (Johnson and Leach, ٢٠٠٤; Agrios, ١٩٩٧; Nelson *et al.*, ١٩٩٦). وذكر (تكسانة، ١٩٨٣) إلى أن أفضل رقم هيدروجيني لنمو كل من العزلتين المرضية وغير المرضية والعزلة المأخوذة من الخيار للفطر *R. solani* على وسط Czapek dox medium بدرجة حرارة ٢٨ م يتراوح مابين 6 – 7 ولم يسجل أي نمو لجميع العزلات عند الرقم الهيدروجيني ٢ و١٠ عدا عزلة الفول التي استطاعت النمو عند الرقم الهيدروجيني ١٠.

ينمو الفطر *R. solani* ويتكاثر بصورة جيدة عندما تكون قيمة الرقم الهيدروجيني للتربة أو الوسط الزرعي النامي عليه الفطر بحدود 5.2 – 5.8 وإن ارتفاع قيمة الرقم الهيدروجيني للتربة مع انخفاض درجة حرارتها فضلاً عن التصريف السيئ للمياه يؤثر بصورة كبيرة في نمو البادرات النباتية ويعزز إصابتها بالفطر الممرض *R. solani* (James and David, ١٩٨٤).

وأوضح (Johnson and Leach, ٢٠٠٤) بأن العامل البيئي للتربة له دور مهم في التأثير في نسبة إصابة سيقان نبات البطاطا بالفطر الممرض *R. solani* مشيراً إلى أن التربة الحامضية إلى المتعادلة تعد وسطاً جيداً لنمو الفطر ولتكوين الأجسام الحجرية. وذكر (Nelson *et al.*, ١٩٩٦) بأن الرقم الهيدروجيني ٦.٤ للتربة يجعل النبات أقل حساسية للإصابة بمرض تعفن الجذور الذي يسببه الفطر المرض *R. solani* مقارنة بالرقم الهيدروجيني ٧.٥.

تعمل مركبات الكبريت العضوية واللاعضوية المضافة للتربة على خفض قيمة الرقم الهيدروجيني للتربة ومن ثم تقلل من نسبة تواجد الفطر وعلى العكس من ذلك وجد بأن قلة مركبات الكبريت في التربة تسبب رفع قيمة الرقم الهيدروجيني لها (Specht and Leach, ١٩٨٧).

٢-٤ الخصائص التشخيصية والتصنيفية لفطر *Trichoderma*

٢-٤-١ تشخيص الفطر *Trichoderma*

تتصف مستعمرات الفطر *Trichoderma harzianum* النامية على الوسط Malt extract Agar بأنها سريعة النمو وذات شكل غير منتظم وتتراوح ألوانها بين الأبيض والأصفر البراق إلى الأخضر المصفر أو الغامق عند تكوين الأبواغ (Papavizas, ١٩٨٥; Domsch *et al.*, ١٩٨٠). تتميز المستعمرات النامية على الوسط Potato dextrose agar بدرجة حرارة ٢٥م بكونها ذات مظهر صوفي Wooly أبيض اللون في بداية نموها ما تلبث أن تتحول إلى خضراء متراصة عند اكتمال نموها وتكوينها للأبواغ إذ تغطي الطبق

الزرعي بالكامل بعد ثلاثة أيام، وقد تكون مستعمرات الفطر حلقات مركزية مقارنة بنموها على الوسط Czapek's agar الذي يمتاز بكونه ضعيفاً أو مشتتاً (Harman *et al*, ٢٠٠٤) أما بالنسبة للتشخيص المجهري للفطر فقد أشارت عدة دراسات إلى أن الغزل الفطري مكون من هايفات مقسمة، والحامل الكونيدي منتصب ويتفرع بزوايا قائمة ليكون شكلاً شبيهاً بالهرم وكل فرع يحمل فياليد (phialide) صغيرة التي بدورها تحمل الكونيديا، والكونيديا هي عبارة عن بوغ بيضوي أحادي الخلية ينتج بصورة متعاقبة من قمة الفياليدات ويتجمع بشكل كتل لزجة، ويتراوح قطرها ما بين 2.5 – 3.5 مايكرومتر أما ارتفاعها فيتراوح ما بين 25 – 70 مايكرومتر (Harman *et al.*, ٢٠٠٤; Moubasher, ١٩٩٣).

٢-٤-٢ تصنيف الفطر *Trichoderma*

صنف الجنس Trichoderma ضمن مجموعة الفطريات الناقصة Deutromycotina إذ لا يعرف له طور جنسي ووضع ضمن صف الـ Hyphomycetes وتحت رتبة Moniliales (Harman *et al.*, ٢٠٠٤; Agrios, ١٩٩٧; Harman, ١٩٩٥) ذكر بعض الباحثين بأن للفطر طور جنسي خلال دورة حياته إلا أنه غير معروف الأهمية في السيطرة الحيوية وقد وضع ضمن الصنف Ascomycetes وتحت رتبة Hypocreales ويعد الجنس *Hypocrea* بمثابة الطور الجنسي الكامل Teleomorph للفطر *Trichoderma* (Lieckfeldt *et al.*, ١٩٩٩; Agrios, ١٩٩٧; Samuels, ١٩٩٦; Harman, ١٩٩٥). صنف الباحث (Rifail, ١٩٦٩) الجنس *Trichoderma* إلى تسعة أنواع اعتمادا على نظام التفرع للحامل الكونيدي وترتيب الفياليدات Phialides على الحامل والصفات المظهرية للكونيديا والفياليدات وهي

١. *T. piluliferum*
٢. *T. polisporum*
٣. *T. hamatum*
٤. *T. koningii*
٥. *T. aureoviride*
٦. *T. harzianum*
٧. *T. logibracheatum*
٨. *T. pseudokoningii*
٩. *T. viride*

غير أن التصنيف الحديث يعتمد على التركيب الجزيئي في تمييز أنواع الفطر فضلاً عن الصفات المظهرية للمستعمرات (Lieckfeldt *et al.*, ١٩٩٩; Moubasher, ١٩٩٣).

٢-٥ دور الفطر *Trichoderma* في المكافحة الاحيائية

يمتد البحث عن دور الفطر *Trichoderma* spp. في السيطرة الحيوية إلى أكثر من ستين عاماً إذ كانت البدايات الأولى على يد الباحث Weindling في عام ١٩٣٢ الذي وضح الطبيعة التضادية للفطر ضد الكثير من الفطريات وأشار إلى دوره في السيطرة الحيوية (Anke, ١٩٩٧)، تبعتها جهود الباحثين (Dennis and Webster, ١٩٧١) اللذين أكدا هذا الدور. ثم قدم (Wells *et al.*, ١٩٧٢) أول بحث حول استعمال الفطر *Trichoderma sp.* في تجارب السيطرة الحيوية تحت ظروف الحقل إذ قام بخلط مستعمرات الفطر مع مزيج معقم من بذور الـ rye grass والتربة للقضاء على الفطر *Sclerotium rolfsii*. واستعمل (Hadar *et al.*, ١٩٧٩) مستخلص النخالة مع الفطر *Trichoderma sp.* في القضاء على الفطر *Rhizoctonia solani* الذي يصيب نباتات الطماطة والباذنجان والفاصوليا المزروعة في البيوت الزجاجية وقد أعطى فطر المكافحة الاحيائية كفاءة تضادية عالية في القضاء على الفطر الممرض.

وأضاف الباحث (Sivan, ١٩٨٤) السماد العضوي (Peat) إلى المعاملة السابقة بنسبة ١:١ (حجم/حجم) لتلافي ارتفاع قيمة الرقم الهيدروجيني للتربة في أثناء نمو الفطر *Trichoderma* إذ تحافظ هذه المادة على الرقم الهيدروجيني للتربة بحدود ٥.٥ فتمنع بذلك نمو البكتريا المرضية للنبات.

ولتقليل كمية لقاح الفطر *Trichoderma* المضاف للتربة قام الباحث (Harman *et al.*, ١٩٨٠) بمعاملة بذور البزاليا بدل التربة بلقاح فطر المكافحة الاحيائية فلاحظ حصول انخفاض معنوي في نسبة الإصابة بكلا الفطرين *Pythium* و *R. solani* كما انخفضت نسبتهما في التربة وبالمقابل تضاعفت نسبة الفطر *Trichoderma* بأكثر من مئة مرة عن المعاملة الأولى وعند زراعة بذور غير معاملة في نفس التربة ظهر انخفاض معنوي في نسبة الإصابة بالفطرين الممرضين السابقين وازدادت إنتاجية الحاصل مما يدل على أن الفطر يبقى لفترة طويلة في التربة محتفظاً بفعاليته. وكررت التجربة من قبل (Cuevas *et al.*, ١٩٩٦) باستعمال بذور فول الصويا الملوثة بالفطر *Fusarium* sp.، وفي بذور القطن الملوثة بالفطر *R. solani* (حميد، ٢٠٠٢) وأعطت نتائج معنوية في خفض نسبة الإصابة بالفطرين السابقين.

أشارت العديد من الدراسات إلى أن عزلات الفطر *Trichoderma* لها تأثير معنوي في خفض نسبة الإصابة بالفطريات المرضية *R. solani* و *Fusarium oxysporum* و *F. culmorum* و *Sclerotium rolfsii* و *Pythium aphanidermatum* و var tritici *Gaeumannomyces gramini* تحت ظروف الحقل والبيت الزجاجي (Kucuk and Kivanc, ٢٠٠٣; Whipps, ١٩٨٧; Chet and Baker, ١٩٨١; Elad *et al.*, ١٩٨٠).

وذكر (Harman *et al.*, ١٩٨٠) بأن تلويث البذور بمادة الكايتين أو بجدار الفطر *R. solani* أدى إلى حصول زيادة كبيرة في كثافة فطر المكافحة الاحيائية. إن ما يزيد كفاءة الفطر *Trichoderma* في السيطرة الحيوية هو قدرته على تحسين نمو وإنتاجية النبات فقد ذكر (Elad *et al.*, ١٩٨٠) بان إضافة الفطر *T. harzianum* المنمى على وسط النخالة للتربة غير الملوثة بالفطريات الممرضة أدى إلى حصول زيادة معنوية في نمو نباتات البزاليا، وأشار (حميد، ٢٠٠٢) إلى أن بعض عزلات الفطر *T. harzianum* أدت إلى تشجيع نمو نبات القطن وزيادة معدل الوزن الجاف للمجموع الخضري بنسبة ١٢.٥٦٪ فضلاً عن كفاءتها في خفض نسبة الإصابة بالفطر *R. solani* في بادرات القطن المزروعة في البيت الزجاجي. كما حققت معاملات إضافة الفطر *T. harzianum* إلى التربة المزروعة بنباتات الطماطة زيادة معنوية في معدل أطوال النباتات وفي معدل الإنتاج بنسب فاقت معاملات إضافة المبيد الكيماوي بنليت (الحديثي، ٢٠٠٢)، وذكر (السعدي، ٢٠٠٤) بأن هنالك زيادة معنوية في معايير النمو والإنتاجية في بذور فول الصويا المعاملة بالفطر *Trichoderma sp.*.

وبسبب قدرة بعض سلالات الفطر *Trichoderma* على تحمل تأثير بعض المبيدات الكيماوية المستعملة ضد المسببات المرضية استعمل الفطر كواحد من عناصر المكافحة المتكاملة فقد أشار (عباس، ١٩٩٨) إلى ضرورة الاستفادة من قدرة بعض سلالات الفطر *T. harzianum* على تحمل التراكيز المرتفعة من المبيد بنليت التي وصلت إلى (١٠٠٠) جزء بالمليون عن طريق استعمال هذا المبيد مع فطر المكافحة الاحيائية للحصول على حماية أعلى لنبات الحنطة ضد الإصابة بالفطر الممرض *R. solani*.

إن هذا الدور المميز للفطر *Trichoderma spp* في القضاء على الكثير من المسببات المرضية فضلاً عن كفاءته في تحسين نمو النبات وإنتاجيته دفع الكثير من الشركات والمؤسسات البحثية نحو الاتجاه إلى تصنيع مبيدات حيوية من أبواغ الفطر لاستعمالها في المكافحة الحيوية (Anke, ١٩٩٧).

٢-٦ تأثير بعض العوامل البيئية في نمو وفعالية الفطر *Trichoderma*

٢-٦-١ درجة الحرارة

تعد درجة الحرارة عاملاً بيئياً مهماً في تحديد نمو الفطر *Trichoderma* ونشاطه ودوره في السيطرة الحيوية. يمتاز الفطر *Trichoderma* بكونه من الفطريات التي تنمو في درجات حرارية معتدلة وله مدى معين من درجات الحرارة تتراوح ما بين ٥-٣٦ م غير أن الدرجة الحرارية المثلى للنمو هي ٣٠ م (Domsch, ١٩٨٠) وذكر (Kredics *et al.*, ٢٠٠٣) بأن الحدود الدنيا والعليا لنمو الفطر تتراوح مابين ١٠-٣٠ مْ ولا يوجد نمو أو إنبات خارج حدود هاتين الدرجتين.

إن هذا المدى من درجات الحرارة ربما يؤثر في إمكانية استعمال الفطر في القضاء على الكثير من المسببات المرضية المقاومة لدرجات الحرارة المنخفضة والتي تصيب البذور النابتة خلال موسم الشتاء البارد والربيع (Antal *et al.*, ٢٠٠٠). وفي دراسة أجريت لاختبار تأثير درجات الحرارة في معدلات نمو ٣٦٠ سلالة للفطر *Trichoderma* تضم الأنواع *T. harzianum* و *T. viride* و *T. auroviride* وجد بأن جميع السلالات نمت بصورة جيدة عند درجة حرارة ٥م في كل من الوسط minimal media و yeast extract agar وأعطى النوع *T. harzianum* أقل نسبة نمو من بين السلالات المقاومة لدرجات الحرارة المنخفضة ولم تتمكن أي من هذه السلالات من النمو في الدرجات الحرارية ٤ و٤٠ م (Kerdics *et al.*, ٢٠٠٠). وفي الأوساط ذات الزرع المزدوج تمكنت السلالات المقاومة لدرجات الحرارة المنخفضة من إنتاج أعضاء التثبيت أو الالتصاق (appressoria) والقضاء على كل من الفطر *R. solani* و*F. oxysporum* عند درجة حرارة ١٠م (Antal *et al.*, ٢٠٠٠).

بالرغم من أن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر *T. harzianum* هي ٣٠ م إلا أن بعض سلالات الفطر قد تبقى فعالة عند درجة حرارة مقاربة للصفر المئوي لذلك استعملت العزلات المقاومة للبرودة في القضاء على الفطر *Rhizoctonia carota* الذي يصيب نبات الجزر في المخازن المبردة عند درجات حرارة تتراوح ما بين (٠-٥)م (Tronsmo, ١٩٨٩).

٢-٦-٢ الرقم الهيدروجيني pH

يؤدي الرقم الهيدروجيني دوراً مهماً في التأثير في مستوى نمو الفطر *Trichoderma* sp. ونشاطه ودوره في القضاء على الكثير من المسببات المرضية للنبات إذ يتحدد ذلك بمديات معينة من الرقم الهيدروجيني سواء كان في أثناء نموه في التربة أو على الأوساط الزرعية المحضرة (Kerdics *et al.*, ٢٠٠٣). فقد أشار (Papavizas, ١٩٨٥) إلى أن الفطر *Trichoderma* sp. له القدرة على النمو في تربة ذات مدى واسع من الرقم الهيدروجيني يتراوح ما بين 2.5 – 9.5 رغم أن معظم سلالات الفطر تفضل النمو في تربة قليلة أو معتدلة الحامضية، وتعد الأنواع التي تفضل النمو في تربة عالية الحموضة بأنها أكثر قدرة على تحمل الإجهاد البيئي لكنها أقل كفاءة في التضاد.

وأشار (Harman, ٢٠٠٠) إلى أن الرقم الهيدروجيني ٤.٥ هو الأمثل لنمو الفطر *Trichoderma* في التربة وعد (Wells, ١٩٨٨) بأن نمو الفطر *Trichoderma* في التربة الحامضية كان أفضل من نمو الفطر الممرض *R. solani* وقد عزا ذلك إلى أن انخفاض درجة حموضة التربة سبب زيادة في تركيز أيونات الحديد الضرورية لنمو الفطر *Trichoderma* فضلاً عن قدرته التنافسية. وذكر (Kredics *et al.*, ٢٠٠٣) بأن سلالات الفطر *Trichoderma* spp. المقاومة لدرجات الحرارة المنخفضة النامية على الوسط yeast

extract agar تستطيع النمو في مدى من الرقم الهيدروجينيـ يتراوح مابين 2 – 6 وعُدَّالرقم الهيدروجيني ٤ هو الأمثل للنمو في حين تفضل الفطريات الممرضة الرقم الهيدروجيني القريب إلى القاعدي. وبين Kucuk وKivanc (٢٠٠٣) بأن الفطر *Trichoderma* لا يستطيع النمو في أوساط ذات قيم حامضية منخفضة (pH=٢) أو قاعدية عالية (١٠ و ١٢) وَعُدّالرقم الهيدروجيني ٦.٥ هو أعلى حد لنمو الفطر *T. harzianum*. بينما أشار الباحث Jackson *et al.*, (١٩٩١) بأن أفضل إنتاج للكتلة الحيوية لثلاث عزلات من الفطر *Trichoderma* كان عند رقم هيدروجيني يتراوح مابين 4.6 – 6.8.

٢-٧ آليات التضاد

تعزى الكفاءة التضادية لأنواع الفطر *Trichoderma* ضد العديد من المسببات المرضية إلى مجموعة من الآليات هي:

٢-٧-١ التنافس Competition

يعد التنافس من الآليات المهمة في السيطرة الحيوية الذي يحدث عندما يتزاحم كائنان أو أكثر على الموقع والمصدر الغذائي نفسه فينمو ويزدهر الكائن الذي يتمتع بكفاءة عالية والذي يكون معدل نموه وتكاثره سريع قياساً بغيره من الكائنات الأخرى المتنافس معها (Cook and Baker, ١٩٨٣) ويزداد التنافس عندما يكون المصدر الغذائي كاربون ونتروجين وعناصر معدنية في التربة محدوداً فيتعرض الكائن الأقل كفاءة إلى التجويع ومن ثم هلاكه نتيجة عدم حصوله على المادة الغذائية المتنافس عليها، فمثلاً تتنافس البكتريا *Pseudomonas flurescens* مع الفطر *Fusarium oxysporum* على عنصر الحديد وتحرم الفطر منه من خلال إنتاجها لمادة Siderophore وهي مادة خارج خلوية ذات وزن جزيئي واطئ تمتاز بكونها ذات ألفة عالية تجاه الحديد (Sivan and Chet, ١٩٨٩$_b$).

إن أحد التطبيقات العملية للتنافس في السيطرة الحيوية ضد الكثير من المسببات المرضية هو إضافة الفطريات أو الكائنات المجهرية ذات الكفاءة التنافسية العالية إلى التربة أو عن طريقة معاملة البذور بها قبل زراعتها فتنمو هذه الكائنات وتزدهر مع النظام البيئي الجذري لهذه النباتات فتقلل بذلك من فرص تواجد الكائنات الأخرى المتنافس معها (Ahmed and Baker, ١٩٨٧). وأشار (Sivan and Chet, ١٩٨٩$_a$) إلى أن التنافس على الكاربون والنتروجين في المنطقة المحيطة بالجذور يمكن اعتباره أحد آليات التضاد بين الفطر *Trichoderma harzianum* والفطر *Fusarium oxysporum*.

وبين (Lo *et al.*, ١٩٩٨) بأن الكائن المجهري المستعمل في السيطرة الحيوية لا يمكن عده منافساً جيداً إلا إذا كان قادراً على النمو بصورة جيدة في المنطقة المحيطة بالجذور مشيراً إلى أهمية الخواص الفيزياوية والكيماوية للتربة ومالها من تأثير في نمو الكائن المجهري فضلاً عن كفاءته التنافسية. وذكر (Howell *et al.*, ٢٠٠٠) إلى أنه من الصعوبة اعتبار التنافس هو

الميكانيكية المعول عليها في تفسير النتائج الإيجابية للسيطرة الحيوية مشيراً إلى فشل الفطر *Trichoderma koningii* في القضاء على الفطر *Rhizoctonia solani* في بادرات القطن المصابة به على الرغم من امتلاكه قدرة تنافسية عالية. في حين أعطى استعمال الفطر *T. koningii* نتائج معنوية في مكافحة الفطر *R. solani* على نبات الطماطة (الوائلي، ٢٠٠٤).

٢-٧-٢ التضاد الحيوي Antibiosis

تشير عدة دراسات إلى أهمية التضاد الحيوي Antibiosis في السيطرة الحيوية كونه أحد الآليات التي يتم من خلالها القضاء على الكثير من المسببات المرضية النباتية بوساطة المركبات الأيضية المفرزة من العامل المسيطر (المضاد) (Harman *et al.*, ٢٠٠٤; Howell, ٢٠٠٣; Anke, ١٩٩٧) (Howell and Stipanovic, ١٩٨٣). فقد ذكر gliovirin المعزول من راشح مزرعة الفطر *T. virens* أعطى كفاءة تثبيطية عالية ضد كل من الفطرين *Pythium ultimum* و *Phytophthora* sp. كما أن فقدان إنتاج المضاد الحيوي أيضاً من الفطر *T. virens* بوساطة إحداث الطفرة له فعل سلبي في التأثير في كفاءة سلالات الفطر في القضاء على الفطر الممرض *Pythium* sp. المسبب لمرض سقوط البادرات (Damping off) في نبات الطماطة (Wilhite *et al.*, ١٩٩٤).

تختلف المركبات الأيضية المفرزة من عوامل التضاد الحيوي في مدى تأثيرها فالبعض من هذه المركبات تكون فعالة ضد مدى واسع من المسببات المرضية في حين يتخصص عمل البعض الآخر منها على مسبب مرضي واحد أو مجموعة معينة من المسببات المرضية (Bonsall *et al.*, ١٩٩٧). كما يتأثر عمل هذه المركبات الأيضية بالظروف البيئة المحيطة فقد ذكر (Dunlop *et al.*, ١٩٨٩) بأن المركبات الببتيدية المعزولة من راشح مزرعة الفطر *T. harziarum* يتأثر إنتاجها بزيادة أو نقصان مدة الحضانة والعوامل البيئية المحيطة.

ذكرت دراسة أجريت لبيان تأثير المركبات الأيضية المتطايرة volatile compound المنتجة من بعض عزلات الفطر *T. harzianum* في تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة للنبات مثل *R* و *R* و *S. rolfsii* و *F. oxysporum* اختلاف عزلات الفطر المنتجة لهذه المركبات فيما بينها في قابليتها على تثبيط نمو المسببات المرضية وأعطت المركبات الأيضية غير المتطايرة non volatile كفاءة أعلى من المركبات المتطايرة في القضاء على المسببات المرضية الفطرية (Kucuk and Kivanc, ٢٠٠٣).

يختلف الكثير من الباحثين في تحديد نوعية المواد الأيضية الداخلة في التضاد الحيوي فقد أشار (Handelsman and Parke, ١٩٨٩) إلى أن التضاد الحيوي يقتصر على التفاعل الذي يضم مركبات ذات وزن جزيئي واطئ التي لها القدرة على الانتشار diffusible ويستثني من ذلك المركبات البروتينية والإنزيمات بينما ذكر كل من (Baker and Griffin, ١٩٩٥) أن

المركبات السامة Toxins والمتطايرة Volatile والإنزيمات الحالة lyso enzyme جميعها تدخل ضمن التضاد الحيوي.

أشار (Papavizas, ١٩٨٥) إلى أن المضادات الحياتية المفرزة من الفطرين *Trichoderma* و *Gliocladium* تشمل المركبات المتطايرة وغير المتطايرة والتي تضم كلاً من Acetaldehyde و trichodermin و gliovirin و gliotoxin.

على الرغم من قدرة عامل التضاد الحيوي *T. harzianum* على إنتاج المضادات الحيوية الببتيدية في المزارع النقية للفطر لكن تبقى الأدلة قليلة حول إمكانية إعطاء الدور الأكبر لهذه المضادات في السيطرة الحيوية ضد الكثير من المسببات المرضية تحت ظروف الحقل، وقد أشار الكثير من الباحثين إلى أن التضاد الحيوي أو المضادات الحيوية بتكامل عملها مع باقي الإنزيمات المفرزة من الفطر والتي تحطم جدران الخلايا الحية للمسببات المرضية (Kubicek *et al.*, ٢٠٠١; Lorito *et al.*, ١٩٩٦; Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤).

٢-٧-٣ المقاومة المستحثة Induced Resistance

تعرف المقاومة المستحثة على إنها المقاومة الموجودة في النبات بمستويات واطئة التي تستحث وتزداد نتيجة تلقيح النبات بعامل غير ممرض أو بعزلة مرضية غير متوافقة أو بالنواتج الايضية لكليهما (Hwang and Benson, ٢٠٠٣; Van Loon *et al.*, ١٩٩٨) وتشير المصادر إلى أن المقاومة المستحثة جهازية وتفتقر للخصوصية كما إنها بطيئة وتعتمد في سرعتها وتركيزها على فعالية وتركيز العامل المستحث وأن دوام المقاومة المستحثة يعتمد على حيوية المستحث (Agrios, ١٩٩٧). تؤثر سلالات الفطر *Trichoderma* spp. بصورة كبيرة في تطور النبات والعمليات الكيموحيوية فيه إذ تحتل هذه السلالات أنسجة الجذور وتعمل على إحداث تغيرات مظهرية وكيموحيوية تعد جزءً من الاستجابة الدفاعية للنبات والتي تقود في النهاية إلى استحثاث المقاومة الجهازية Induced Systemic Resistance (ISR) في كافة أجزاء النبات (Harman *et al.*, ٢٠٠٤). وقد أشارت إحدى الدراسات إلى حدوث زيادة في فعالية إنزيم الـ Chitinase وb-١,٣-glucanase وperoxidase وcellulase في نباتات الخيار المعاملة بالفطر *T. harzianum* في نظام المزرعة المائية وعند إجراء طريقة الفصل بالكروتوغرافي (HPLC) لمستخلص الأوراق النباتية المعاملة بالفطر *Trichoderma* لوحظ انفصال مركبات فينولية فعالة ضد الكثير من المسببات المرضية (كما ظهر في الاختبار الإحيائي Bioassay ضد البكتريا والخمائر والفطريات) (Yedidia *et al.*, ١٩٩٩) وأشار (حميد، ٢٠٠٢) إلى قدرة مجموعة من عزلات الفطر *Trichoderma* spp على استحثاث المقاومة في نبات القطن انعكس إلى زيادة معنوية لفعالية إنزيم البروكسيديز في بادرات القطن نتيجة معاملة

البذور بالمستحضرات الجافة لتلك العزلات كما أظهرت بعض العزلات للفطر *Trichoderma* قدرة على إنتاج الاثلين الذي يعد عاملاً مهماً في استحثاث المقاومة وتحفيز نمو نبات القطن.

أشار (Harman *et al.*, ٢٠٠٤) إلى أن هنالك عدة أصناف من المركبات التي ينتجها الفطر *Trichoderma* تعمل على استحثاث المقاومة في النبات وهي الإنزيمات ومناظرات البروتينات التي تشفر من قبل الجينات المسؤولة عن الضراوة والسكريات قليلة الوحدات Oligosacharides وبقية المركبات ذات الوزن الجزيئي الواطئ.

وذكر (Yedidia *et al.*, ١٩٩٩) أن الفطر *T. harzianum* أظهر كفاءة عالية في تشجيع زيادة استجابة النمو في كل من تجارب البيت الزجاجي ونظام المزرعة المائية فلقد أعطت النباتات المعاملة بالفطر زيادة في معدل إنبات البذور بنسبة ٣٠% وزيادة في المساحة السطحية للجذور بنسبة ٩٠% وكذلك أظهرت المعاملة زيادة ملحوظة في تركيز الفسفور والحديد.

٢-٧-٤ التطفل Mycoparasitism

يعرف التطفل بصورة عامة بأنه معيشة كائن حي على حساب كائن حي آخر من أجل الحصول على الغذاء والمأوى مع إحداث ضرر على العائل (Chet *et al.*, ١٩٨١). وكأحد آليات السيطرة الحيوية استعمل التطفل (Mycoparasitism) بصورة ناجحة في تقليل كمية لقاح الفطريات أو الأجسام الحجرية التي تكونها الفطريات في التربة للحيلولة من دون إصابة الجذور النباتية بالعوامل المرضية (Elad *et al.*, ١٩٨٣).

قسم الباحثان (Barnett and Binder, ١٩٧٣) التطفل في الفطريات إلى نوعين اعتماداً على حيوية العائل:

١. **Biotrophic:** يفضل الفطر في هذا النوع من التطفل الحصول على غذائه من الخلايا الحية للعائل إذ يقوم بإرسال ممصات إلى داخل الخلايا، وفي هذا النوع من التطفل يكون الفطر فيه مقتصراً على عائل محدد أو مجموعة معينة من العوائل (Manocha, ١٩٩٠).
٢. **Necrotrophic:** في هذا النوع من التطفل يكون الفطر فيه ذا طبيعة رمية إذ يقوم أولاً بقتل خلايا المضيف ثم يتغذى عليها، والفطريات العائدة لهذا النوع تكون أكثر شراسة وتهاجم عدداً كبيراً من العوائل كما إنها غير متخصصة في تطفلها إذ بإمكانها التطفل على العائل الحي أو غير الحي (Manocha, ١٩٩٠)، ويضم هذا النوع من التطفل أغلب الفطريات المستعملة في السيطرة الحيوية (Baker, ١٩٨٧).

يمر الفطر *Trichoderma* بعدة مراحل خلال عملية تطفله على باقي الفطريات هي:

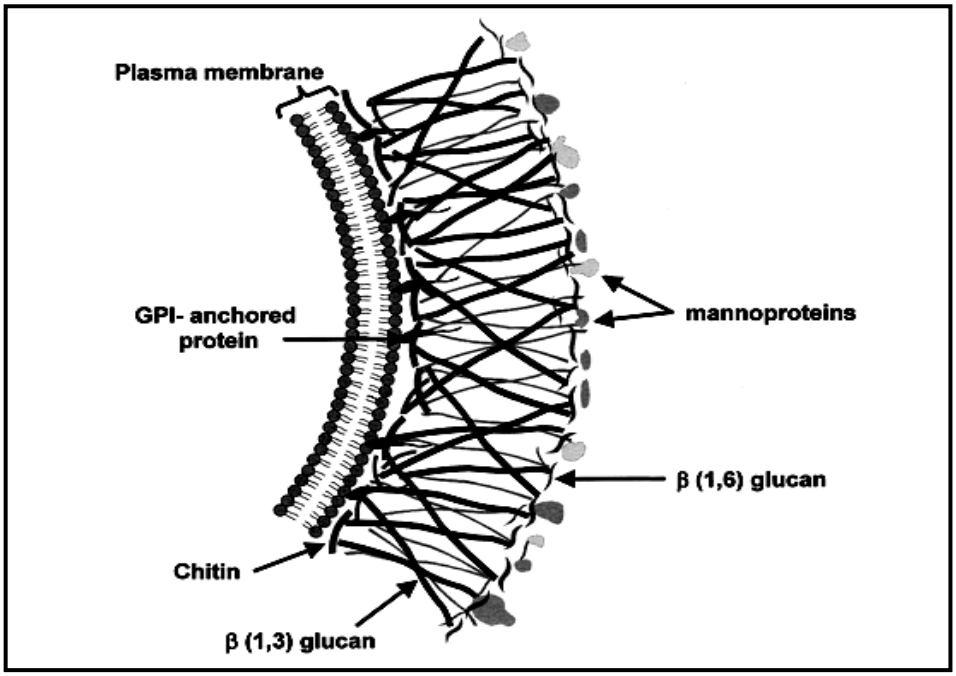
أ- المرحلة الأولى: والتي تطلق عليها بالـ Chemotrophic growth وفيها ينجذب الفطر *Trichoderma* نحو الايعازات الكيماوية الصادرة من الفطر الممرض (Markovich and Kononova, ٢٠٠٣; Chet *et al.*, ١٩٨١).

ب- المرحلة الثانية: وتعرف بمرحلة التمييز Recognition، إذ يهاجم الفطر *Trichoderma* فيها مجموعة معينة فقط من الفطريات وتتصف هذه المرحلة بأنها ذات طبيعة فيزياوية وكيماوية ويؤدي اللكتين دوراً مهماً في هذه المرحلة (Markovich and Kononova, ٢٠٠٣; Rocha-Ramirez *et al.*, ٢٠٠٢; Inbar and Chet, ١٩٩٤; Elad *et al.*, ١٩٨٣).

ج- المرحلة الثالثة: وهو مرحلة الالتصاق *Attachment* وهنا ينمو الفطر *Trichoderma* أما على طول الغزل الفطري للمضيف أو يلتف حوله (Lu *et al.*, ٢٠٠٤; Harman *et al.*, ١٩٨١; Tronsmo and Dennis, ١٩٧٨).

د- المرحلة الرابعة: يقوم الفطر في هذه المرحلة بتحليل جدران خلايا المضيف وكما هو معروف بأن جدران خلايا أغلب الفطريات تتألف بصورة رئيسة من الكايتين (مثال عليها الفطريات البازيدية Basidiomycetes التي تتألف جدرانها من الكايتين واللامنارين laminarine (β−glucan) وغير حاوية على السليلوز) (Sivan and Chet, ١٩٨٩$_a$).

يوجد الكايتين في جدران خلايا أغلب الفطريات أما على شكل طبقة بدائية من الألياف الدقيقة أو على شكل طبقة داخلية معقدة ترتبط بالـ glucan والبروتين بوساطة أواصر ببتيدية (شكل - ١) (Sivan and Chet, ١٩٨٩$_a$; Elad *et al.*, ١٩٨٥) ولكي يخترق الفطر جدران خلايا المضيف يجب أن يمتلك مجموعة من الإنزيمات المحللة لمكونات هذه الجدران، وقد أشارت عدة دراسات إلى أن الفطر *Trichoderma* يمتلك مجموع من الإنزيمات الخارجية (extracelluler enzymes) المحللة لمكونات هذه الجدران وهي الـ Chitinase والـ β−1,3−glucanase والـ protease (Zaldivar *et al.*, ٢٠٠١; El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠; Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤; Cherif and Benhamou, ١٩٩٠). أما المرحلة الأخيرة من التطفل فتتمثل باختراق هايفات الفطر المسيطر لخلايا المضيف وتحليل مكوناته الداخلية (Markovich and Kononova, ٢٠٠٣).



شكل (١): تركيب الجدار الخلوي لمعظم الفطريات حسب (Selitrennikoff, ٢٠٠١)

بينت التقنيات الحديثة المستعملة في الكيمياء الخلوية (Cytochemistry) بأن الفطر *Trichoderma* يقوم بالالتفاف على هايفات الفطر *Rhizoctonia solani* ومن ثم اختراقها محدثاً ضرراً كبيراً لها متمثلاً بتغير محتويات الجدار الخلوي وانكماش الغشاء البلازمي وتجمع المحتويات السايتوبلازمية لخلايا الفطر (Benhamou and Chet, ١٩٩٣).

بالرغم من أهمية هذه الآلية في السيطرة الحيوية إلا أن عملها يتكامل مع المضادات الحيوية في القضاء على الكثير من الفطريات المرضية (Lorito *et al.*, ١٩٩٦; Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤). أشار (Harman *et al.*, ٢٠٠٤) إلى أن هذه الآلية ذات كفاءة قليلة في حماية البذور النباتية من الإصابة بالفطريات الممرضة وذلك لكون عملية التطفل بين العامل المسيطر والممرض ربما تأخذ وقتاً أطول من الوقت الذي يستغرقه الفطر الممرض في إصابة البذور النباتية.

٢-٨ الإنزيمات Enzymes

أكدت عدة دراسات على أهمية الإنزيمات في السيطرة الحيوية كونها أحد أهم المركبات المفرزة من العوامل المسيطرة في أثناء عملية القضاء على المسببات المرضية (Limon *et al.*, ٢٠٠٤; De Marco and Felix, ٢٠٠٢; Kubicek *etal.*, ٢٠٠١; Lorito *et al.*, ١٩٩٦). وتشير البحوث إلى أن إنزيمات الـ Chitinase والـ Glucanase المفرزة من قبل عوامل السيطرة الحيوية ضرورية لتثبيط نمو الفطريات المرضية إذ تعمل هذه الإنزيمات على

تحطيم مركبات الكايتين (Chitin) والكلوكان (β – glucan) ومتعدد السكريات (polysaccharides) الضرورية لقوة جدران الفطريات وصلابتها فتغير بذلك من وحدة مكونات الجدار الخلوي للفطر (Howell, ٢٠٠٣; De Marco and Felix, ٢٠٠٢).

وذكر (Metcalf and Wilson, ٢٠٠١) بأنه بعد إتمام عملية تلقيح جذور نبات البصل المصابة بالفطر الممرض *Sclerotium cepivorum* بالفطر المسيطر *T. koningii* تقوم هايفات الفطر المسيطر باختراق أنسجة بشرة وقشرة النبات المصاب وتحطم هايفات الفطر الممرض من دون أن تؤدي إلى إحداث ضرر في الأنسجة النباتية المصابة إذ يعود ذلك إلى تأثير إنزيمات الـ endochitinase أو الـ exochitinase المفرزة من الفطر المسيطر.

إن هذا الدور للإنزيمات المحللة للكايتين دعم من قبل (Lorito *et al.*, ١٩٩٨) الذي قام بنقل الجين المشفر لإنزيم الـ endochitinase من الفطر *T. harzianum* إلى نبات التبغ والبطاطا فلاحظ حدوث ارتفاع في نسبة المقاومة لهذين النباتين ضد الكثير من المسببات المرضية. وأشار (Kapat *et al.*, ١٩٩٨) إلى أن السيطرة الحيوية المستعملة ضد الفطر *Botrytis cinerea* بوساطة الفطر *T. harzianum* تعود بصورة جزئية إلى فعالية إنزيم البروتييز (protease) الذي يعمل على تحطيم الإنزيمات المحللة (lyso enzyme) التي يفرزها الفطر الممرض في أثناء مهاجمته للخلايا النباتية إلى سلاسل ببتيدية أو إلى مكوناتها من الأحماض الامينية.

ودرس الباحث (Dipietro *et al.*, ١٩٩٣) الفعل التآزري بين الإنزيم endochitinase والمضاد الحيوي gliotoxin على إنبات كونيديا الفطر الممرض *Botrytis cinerea* فوجد بأن معاملة الكونيديا بمزيج الإنزيم والمضاد الحيوي كان أكثر كفاءة في تثبيط إنبات هذه الكونيديا فيما لو عوملت بالإنزيم والمضاد الحيوي كلاً على حده.

وتوسع الباحث (Lorito *et al.*, ١٩٩٦) أكثر في هذا المفهوم إذ قام بمزج عدد من المركبات المضادة لنمو الفطريات مع مجموعة من الإنزيمات المحللة وعامل بها كلاً من الفطر *B. cinerea* و *F. oxysporum* فلاحظ حصول تآزر بين الإنزيمات والمركبات المضادة وبين بأن مستوى كفاءة المزيج يعتمد على الفعالية التضادية للإنزيمات كما أشار إلى إن مستوى التآزر ينخفض عند إضافة الإنزيمات بعد المركبات المضادة مشيراً إلى أن تحطيم الجدار الخلوي للفطر ضروري جداً لحصول التفاعل.

٢-٨-١ إنزيم الكايتنيز

تشارك الإنزيمات المحللة للكايتين (Chitinolytic enzyme) في الكثير من الفعاليات الحيوية كالتحلل الذاتي (Autolysis) والتغاير الشكلي (Morphogensis) والتغذية (Nutrition) فبالإضافة إلى دورها المميز في أثناء تطفل الفطريات على بعضها البعض فإن لها

دوراً مهماً في علاقة الفطريات مع بقية الكائنات الحية كالنباتات والحشرات (Papavizas, ١٩٨٥; Mauch *et al.*, ١٩٨٨). وأشار كل من (Howard *et al.*, ٢٠٠٣; Botha *et al.*, ١٩٩٨) إلى إن الصيغة العامة للإنزيمات المحللة للكايتين هي:

Poly{١,٤-(N-acetyl-b-D-glucosamnide)} glycohydrolase (EC.٣.٢.١.١٤)

ويطلق عليه أيضاً chitin depolymerases (Howard *et al.*, ٢٠٠٣).

تذكر عدة دراسات بأن إنزيم الكايتنيز هو أحد أهم الإنزيمات الداخلة في السيطرة الحيوية كما إنه عامل محدد لها يفرزه الفطر *Trichoderma* في أثناء تطفله على الفطريات المرضية للنبات لوجود مركب الكايتين في جدرانها الذي يكسبها قوة وصلابة تجاه الكثير من المؤثرات الميكانيكية والكيماوية الخارجية (Kubicek *et al.*, ٢٠٠١; Mercedes *et al.*, ٢٠٠٠).

يتألف الكايتين من بوليمر متماثل لوحدات N-acetyl-D-[$(Gl_cNA_c)_n$] glucosamine مرتبطة مع بعضها البعض بوساطة آصرة $\beta(1-4)$ (Gooday, ١٩٩٠).

يضم إنزيم الكايتنيز مجموعة من الإنزيمات التي صنفت على أساس الناتج النهائي للإنزيم إلى:

١. endochitinase (EC. ٣.٢.١.١٤): يعمل هذا الإنزيم على تحليل الكايتين أو الكايتين قليل الوحدات (Chitooligomere) بصورة عشوائية محرراً خليطاً من المركبات الذائبة ذات الوزن الجزيئي الواطئ مختلفة الأحجام مع وحدات من السكر الثنائي diacetylchitobiose $(Gl_cNAc)_2$ التي تُعَدّ الناتج النهائي الأساسي لعمل الإنزيم (Kubicek *et al.*, ٢٠٠١). أشار (Markovich and Kononova, ٢٠٠٣) إلى أن هذا الصنف من الإنزيم يشطر الأواصر الداخلية للكايتين محرراً وحدات السكر الثنائي Chitobise والثلاثي Chitotriose والرباعي Chitotertrose.

٢. chitin 1,4-β-chitobiosidase (chitobiosidase): كما يطلق عليه أيضاً بالـ exochitinase يحلل هذا الإنزيم الكايتين أو الكايتين قليل الوحدات Chitooligomere من النهايات غير المختزلة محرراً وحدات السكر الثنائي $(Gl_cNA_c)_2$ فقط.

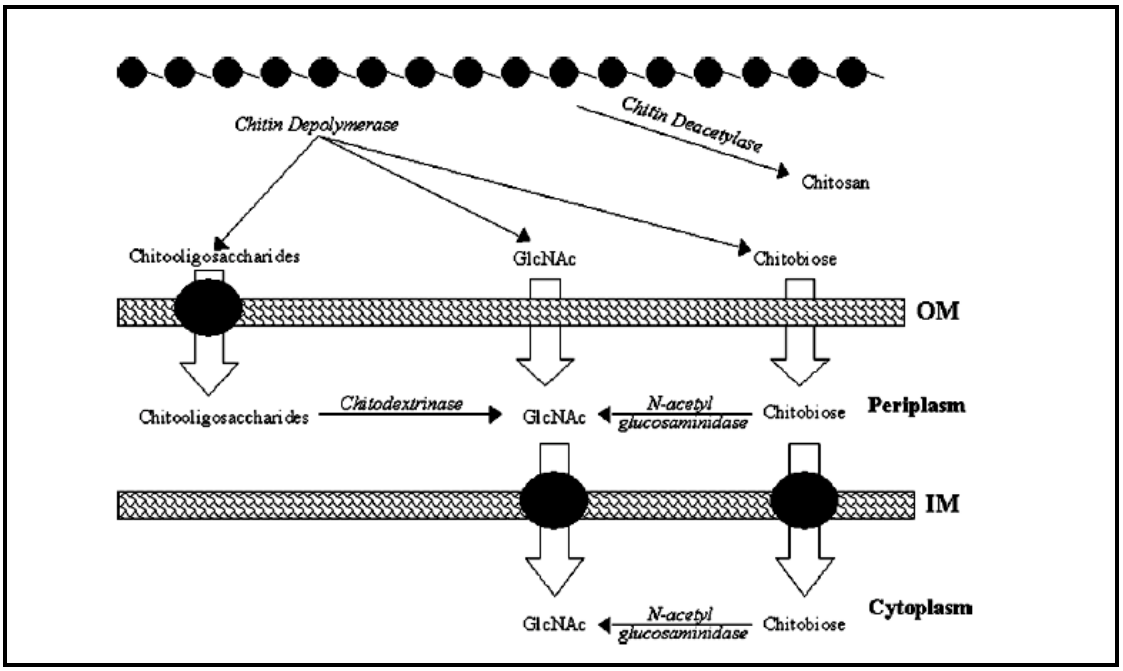
٣. β-N-acetyhelhexosaminidase (EC. ٣.٢.١.٥٢): يحلل هذا الإنزيم الكايتين قليل الوحدات وكذلك الكايتين أيضاً بالتعاقب من النهاية غير المختزلة محرراً وحدات السكر الأحادي N-acetylglucosamine (Monomere) فقط، ويعد هذا الإنزيم هو الوحيد القادر على مهاجمة وحدات السكر الثنائي $(Gl_cNA_c)_2$ (Howard *et al.*, ٢٠٠٣; Kubicek *et al.*, ٢٠٠١).

تتراوح أعداد إنزيمات الكايتنيز المنتجة من الفطر *T. harzianum* مابين ٥-٧ إنزيمات حسب نوع السلالة المستعملة صنف اثنان منها ضمن القسم الثالث ولها أوزان جزيئية هي ١٠٢ و٧٣ KDa وأربعة منها ضمن القسم الأول ولها أوزان جزيئية هي ٥٢ و ٤٢ و ٣٣ و ٣١ KDa بينما يضم القسم الثاني إنزيماً واحداً وله وزن جزيئي هو ٤٠ Kda (Haran *et al.*, ١٩٩٦). وهنالك تصنيف بديل لإنزيمات الكايتنيز يعتمد على التشابه في تسلسل الأحماض الأمينية في جزيئة الإنزيم (Markvich and Kononova, ٢٠٠٣).

أشار (Keyhani and Roseman, ١٩٩٦) إلى أن السكريات chitobiose و chitooligos acharides المتحررة نتيجة تحلل الكايتين بفعل إنزيم الـ chitin depolymerase يتم تحويلها قبل دخولها إلى السايتوبلازم إلى وحدات السكر الإحادي GleCNAC بفعل إنزيمي chitodextrinase (EC.٣.٢.١.١٤) و N-cetylglucosaminidase (EC.٣.٢.١.٥٢) شكل (٢).

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.*, ٢٠٠٠).

ذكر الكثير من الباحثين أن فعالية إنزيم الكايتنيز (chitinase) المنتج من الفطر *Trichoderma* تفوق فعالية الإنزيم نفسه المفرز من النبات والبكتريا وباقي الفطريات

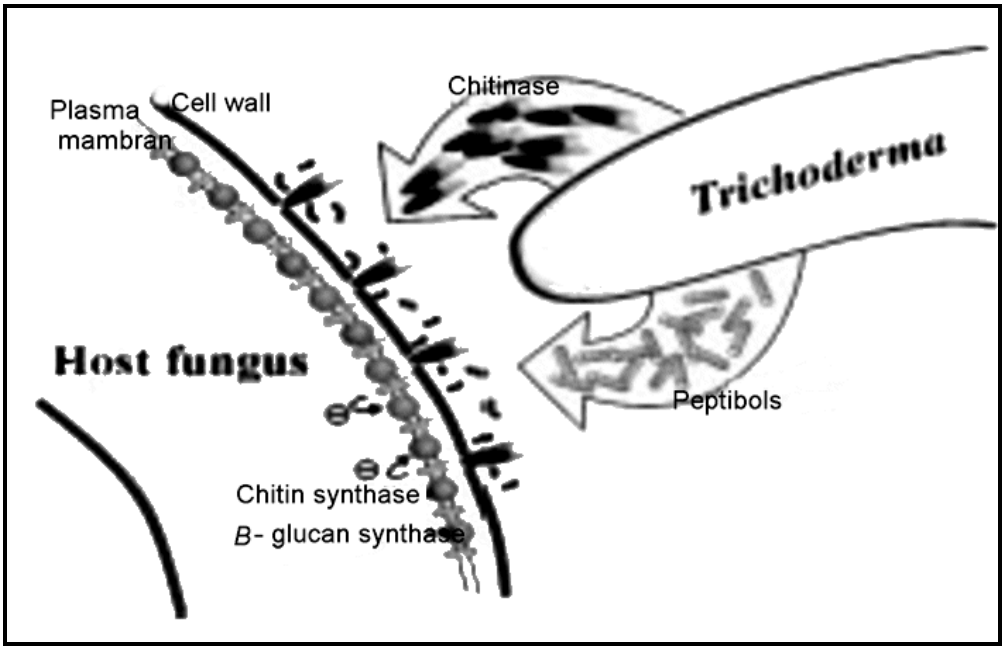


شكل (٢): اليـة عمـل انـزيم الكـايتينيز حسـب مقتـرح (Keyhani and Roseman, ١٩٩٦)

المقاس تحت الظروف نفسها وهذا يدعم الفرضية التي تشير إلى أن هذا الإنزيم متخصص لمهاجمة جدران خلايا بقية الفطريات إذ لا يهاجم الإنزيم المفرز من الفطر *Trichoderma* الأجزاء الرخوة الموجودة في قمة الهايفا فقط وإنما يقوم بتحليل الجدران الكايتينية الصلبة للهايفات الناضجة والكونيديا والأبواغ الكلاميدية والأجسام الحجرية (Rousseau *et al.*, ١٩٩٦; Lorito *et al.*, ١٩٩٣; Benhamou and Chet, ١٩٩٣).

وفي دراسة أجراها الباحث (Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤) لبيان تأثير الإنزيمات والمضادات الحياتية المفرزة من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط حاوٍ على جدار خلية الفطر *Botrytis cinerea* كمصدر وحيد للكاربون أشار فيها إلى كفاءة كل من المستخلص النقي للإنزيم والمضاد الحياتي في تثبيط نمو الفطر الممرض كلاً على حده ولكن بتراكيز أعلى مما موجود في راشح مزرعة الفطر كما ذكر بأن معاملة الفطر الممرض بمزيج الإنزيم والمضاد الحيوي أدى إلى تثبيط نمو الفطر الممرض مبيناً بأن كلاً من الإنزيم والمضاد الحياتي يعملان بصورة متآزرة عند إضافتهما بصورة متزامنة ولكن يحدث اختزال في فعالية الإنزيم بنسبة ٥٠% عما هو موجود في راشح مزرعة الفطر *T. harzianum*.

ذكر (Kubicek *et al.*, ٢٠٠١) بأنه بعد تكسير جدران خلايا الفطريات الممرضة بوساطة إنزيم الكايتنيز وباقي الإنزيمات المساعدة المفرزة من الفطر *Trichoderma* يعمل المضاد الحياتي على تعطيل عمل الإنزيمات المسؤولة عن إعادة تصنيع مكونات الجدار الخلوي وكذلك تثبيط قدرة الفطر الممرض على إصلاح الخلل الذي أحدثه الإنزيم في جدرانه (شكل-٣)، وقد دعمت هذه النظرية من (Lewis and Papavizas, ١٩٨٧) اللذين أكدا حصول تغيرات في نفاذية جدران خلايا المضيف في أثناء تطفل الفطر *Trichoderma* عليها.



شكل (٣): عملية التأزر بين الأنزيمات والمضادات الحيوية المفرزة من قبل الفطر *Trichoderma* في أثناء عملية تطفله على الفطريات الأخرى، حسب مقترح (Kubicek *et al.*, ٢٠٠١)

٢-٨-٢ العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيم الكايتنيز

٢-٨-٢-١ نوع المصدر الكاربوني

يتأثر إنتاج إنزيم الكايتنيز بصورة كبيرة بنوع المصدر الكربوني الموجود في وسط التخمر، وتشير عدة مصادر إلى أن الإنزيم ينتج بمستويات عالية إذا نما الفطر *Trichoderma* sp. في وسط حاوٍ على الكايتين النقي أو جدار خلوي أو غزل فطري طري أو جاف لأحد الفطريات الحساسة للفطر *Trichoderma* كمصدر وحيد للكاربون وينخفض إنتاج الإنزيم إذا استبدل الكايتين بالكايتوزان (مركب مشابه للكايتين غير أنه فاقد لمجموعة الاستيل $COCH_3$) والسليلوز والكايتين غير النقي مشيراً إلى أن عملية التحفيز على إنتاج الإنزيم مختبرياً هي عملية متخصصة (Lorito *et al.*, ١٩٩٤; Harman *et al.*, ١٩٩٣; Dela Cruz *et al.*, ١٩٩٢; Ulhoa and Peberdy, ١٩٩٢).

وأشار كل من (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠; Mach *et al.*, ١٩٩٩) إلى إنتاج الإنزيم عند إضافة الكلوكوز، سكروز والنواتج النهائية لتحلل الكايتين كما أن التحفيز المباشر والتثبيط يعملان على تنظيم عملية إنتاج الإنزيم وذلك لكونه من الإنزيمات المستحثة.

رغم أن الدراسات كثيرة حول أهمية المصدر الكربوني في إنتاج إنزيم الكايتنيز إلا أن عدداً من الباحثين ذهب إلى تفسير الأحداث التي تسبق عملية الاستحثاث بوساطة المصدر الكربوني فقد أشار (Inbar and Chet, ١٩٩٥) إلى أن تكوين الإنزيمات المحللة للكايتين في أثناء مهاجمة الفطر *T. harzianum* للفطر الممرض *R. solani* يستحث بوساطة اللكتينات الموجودة على سطح جدار خلايا الفطر الممرض وقد عدوا بأن تأثير اللكتين يُعَد إحدى المراحل المبكرة التي تسبق عملية الاستحثاث بوساطة الكايتين الموجود في جدار الفطر الممرض (Markovich and Kononova,٢٠٠٣; Donzelli and Harman, ٢٠٠١).

أشار (Kulling *et al.*, ٢٠٠٠) إلى أن الفطر *T. harzianum* يفرز في بداية تطفله على الفطر *R. solani* مجموعة من الإنزيمات الكامنة التي تقوم بتحليل السكريات القليلة الوحدات الموجودة في جدار الفطر، وتستحث هذه السكريات المتحررة بالتعاقب على إنتاج كميات كبيرة من الإنزيمات المحطمة لجدار خلية الفطر *R. solani* من الفطر *T. harzianum*. وبين (Mercedes *et al.*, ٢٠٠٠) بأن التجويع للمصدر الكربوني والنيتروجيني والتعرض للإجهاد الفسيولوجي له تأثير كبير في تحفيز الجينات المسؤولة عن إنتاج إنزيم الكايتنيز.

٢-٨-٢-٢ الرقم الهيدروجيني

يؤثر الرقم الهيدروجيني للوسط في نمو الفطريات وقابليتها على تخليق وإنتاج الكثير من الإنزيمات والمركبات الأيضية الأخرى وكأحد الإنزيمات المهمة التي تنتجها الفطريات المستعملة في السيطرة الحيوية ضد الكثير من المسببات المرضية للنبات اتجهت عدة دراسات

إلى تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز في الكثير من الأوساط المستعملة لإنتاج الإنزيم (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠).

وتشير عدة دراسات إلى أن الأوساط المتعادلة إلى قليلة الحامضية هي أنسب الأوساط المستعملة في إنتاج إنزيم الكايتنيز في الكثير من الفطريات المستعملة في السيطرة الحيوية ومنها الفطر *Trichoderma* sp. والفطر *Stachybotrys elegans* (Anke, ١٩٩٧; Tweddell *et al.*, ١٩٩٤). فقد ذكر (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠) أن أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج إنزيم الكايتنيز من قبل الفطر *T. harzianum* النامي في الوسط minimal synthetic medium هو ٦. وأعطى الرقم الهيدروجيني ٥ أفضل نسبة في إنتاج إنزيم الكايتنيز لمجموعة من عزلات الفطر *Trichoderma* spp. (Kredics *et al.*, ٢٠٠٣).

٢-٨-٢-٣ مدة الحضن

تشير عدة دراسات إلى أن مدة الحضن اللازمة لإنتاج إنزيم الكايتنيز تختلف حسب الكائن والوسط المستعمل وظروف الحضن، فقد أشار (Tweddell *et al.*, ١٩٩٤) إلى إن إنتاج إنزيم الكايتنيز من قبل الفطر *Staclybotrys elegans* وصل إلى أعلى مستوى له بعد مدة حضن ثلاثة أيام من تنمية الفطر في وسط حاوٍ على جدار خلية الفطر الممرض *R. solani* كمصدر وحيد للكربون.

وبين (Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤) بأن إنتاج إنزيم الـ ١,٣-glucanase, β chitinase والـ protease من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط حاوٍ على جدار خلية الفطر الممرض *B. cinerea* يزداد بعد مدة ٣٠-٣٥ ساعة من بدء الحضن وبعدها يبدأ بالانخفاض.

كما تتأثر مدة الحضن اللازمة لإنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* على نوع المصدر الكربوني المستعمل فعند استعمال الكايتين أو الغزل الفطري الجاف للفطر *Sclerotium rolfsii* يصل إنتاج إنزيم الكايتنيز إلى أعلى مستواه بعد مدة حضن سبعة أيام في حين تقل مدة الحضن إلى أربعة أيام عند استعمال الغزل الفطري الطري بدل الجاف ولكن بكفاءة أقل (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠).

٢-٨-٢-٤ درجة الحرارة

تؤثر درجات الحرارة بصورة كبيرة في إنتاج الإنزيمات من الكثير من الكائنات الحية لما لها من تأثير في حيوية الكائن وقدرته على إنتاج الإنزيم لغرض النمو والتغذية فضلاً عن القيام بالكثير من الفعاليات الحيوية والتي تدخل فيها الإنزيمات كأحد أهم العوامل المساعدة ومن بين هذه الفعاليات الحيوية هي تطفل الفطريات على بعضها البعض كأحد أهم ميكانيكيات السيطرة الحيوية المستعملة ضد الكثير من الفطريات الممرضة للنبات والتي يدخل فيها إنزيم

الكايتنيز كعامل رئيس ومحدد لهذه الفعالية (Kucuk and Kivanc, ٢٠٠٣; Kredics *et al.*, ٢٠٠٣).

وتختلف درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز حسب نوع الكائن المستعمل وقدرته على النمو في المديات الحرارية المرتفعة أو المنخفضة (Kredics *et al.*, ٢٠٠٣).

فقد أشار (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠) إلى أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* هي ٣٠ م بينما أعطت العزلات المقاومة لدرجات الحرارة المنخفضة كفاءة عالية في إنتاج إنزيم الكايتنيز عند درجة حرارة ١٠ م كما أن الإنزيم بقي محتفظاً بفعاليته عند درجة حرارة ٥ م (Antal *et al.*, ٢٠٠٠).

وذكر (Tweddell *et al.*, ١٩٩٤) بأن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Stachybotrys elegans* هي ٣٧ م.

٢-٨-٣ تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم الكايتنيز وثباتيته

تنشط الإنزيمات ضمن مديات محددة من الرقم الهيدروجيني ويعود سبب ذلك إلى تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الإنزيم وميل الإنزيم للمادة الأساس وسرعة التفاعل فضلاً عن تأثيره في تأين مكونات التفاعل الإنزيمي وهي الإنزيمات والمادة الأساس والإنزيمات المساعدة (المظفر، ١٩٨٣).

وردت الأرقام الهيدروجينية المثلى لفعالية وثبات إنزيم الكايتنيز في معظم الدراسات التي تناولت صفات هذا الإنزيم والتي تختلف حسب جنس الكائن المنتج لهذا الإنزيم كما تختلف مابين الأنواع العائدة للجنس الواحد وبصورة عامة تقع الأرقام الهيدروجينية المثلى لفعالية إنزيم الكايتنيز المنتج من الفطريات والنباتات ضمن الحدود الحامضية بينما تتجه القيم المثلى لفعالية الإنزيم في البكتريا نحو القاعدية (Bolar *et al.*, ٢٠٠٠).

ذكرت دراسات أجريت على إنزيم الكايتنيز المنتج من قبل بعض سلالات الفطر *T. harzianum* أن أعلى فعالية للإنزيم تراوحت مابين ٤-٤.٥ للسلالة ٢١٣ (Sivan and Chet, ١٩٨٩) وللسلالة T٢٤ تراوحت مابين ٤-٥ أما أعلى ثباتية له فقد تراوحت مابين ٤.٥-٧ (El-Katatny *et al.*,٢٠٠١).

أشار (Taylor *et al.*, ٢٠٠٢) إلى أن أعلى فعالية لإنزيم الكايتنيز المنتج من فطر السيطرة الحيوية stachybotrys elegans كانت عند الرقم الهيدروجيني ٥ أما أعلى ثبات له فقد كانت مابين ٥-٧ إذا احتفظ الإنزيم ب ٧٥% من فعاليته. فيما وجد (Tikhonov *et al.*, ٢٠٠٢) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر *Verticillium chlomydosporim* يقع مابين ٥.٢-٥.٧ وفيما يخص البكتريا ذكرت دراسة أجريت لمعرفة صفات إنزيم الكايتنيز المنتج من البكتريا المحللة للكايتن *Rolstonia* sp. أن أعلى فعالية للإنزيم

كانت مابين الرقمين الهيدروجينيين ٤-٥ أما أعلى ثباتية له فقد كانت مابين ٥-٨ (Sutrisno *et al.*, ٢٠٠٤)

٣-١ المواد والأجهزة المستعملة

٣-١-١ المواد الكيمياوية

جدول (١) يوضح المواد الكيمياوية المستعملة في التجارب المختبرية فضلاً عن الشركات المصنعة لها

	اسم المادة		الشركة المصنعة
١.	خلات الصوديوم	CH_3COONa	BDH
٢.	حامض الخليك	CH_3COOH	BDH
٣.	هيدروكسيد الصوديوم	$NaOH$	BDH
٤.	ارسينات الصوديوم	Na_2A_o	BDH
٥.	حامض الكبريتيك	H_2SO_4	BDH
٦.	اسيتون	C_3H_6O	BDH
٧.	كلوكوز	$C_6H_{12}O_6$	BDH
٨.	سكروز	$C_{12}H_{22}O_{11}$	BDH
٩.	كبريتات المغنيسيوم المائية	$MgSO_4.7H_2O$	BDH
١٠.	كلوريد البوتاسيوم	KCl	BDH
١١.	كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2$	BDH
١٢.	كبريتات المنغنيز	$MnSO_4$	BDH
١٣.	ترترات الصوديوم البوتاسيوم	$Na,KC_4H_4O_6$	BDH
١٤.	كاربونات الصوديوم اللامائية	Na_2CO_3	Fluka
١٥.	كبريتات النحاس المائية	$CuSO_4.5H_2O$	Fluka
١٦.	موليدات الامونيوم	$(NH_4)_2MoO_4$	Fluka
١٧.	ايثانول	C_2H_5OH	Fluka
١٨.	ايثر	$(C_2H_5)_2O$	Fluka
١٩.	كبريتات الامونيوم	$(NH_4)_2SO_4$	Fluka
٢٠.	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH_2PO_4	Fluka
٢١.	كبريتات الحديد المائية	$FeSO_4.7H_2O$	Fluka
٢٢.	كبريتات النحاس المائية	$CuSO_4.5H_2O$	Fluka
٢٣.	كبريتات الزنك المائية	$ZnO_4.7H_2O$	Fluka
٢٤.	كبريتات المنغنيز المائية	$MnSO_4.2H_2O$	Fluka
٢٥.	نترات الامونيوم	NH_4NO_3	Fluka
٢٦.	كبريتات الزنك	$ZnSO_4$	Fluka

	اسم المادة		الشركة المصنعة
.٢٧	كاربونت الصوديوم الحامضية	$NaHCO_3$	Merck
.٢٨	نترات الصوديوم	$NaNO_3$	Merck
.٢٩	اكار-اكار	Agar-Agar	Himedia
.٣٠	وسط اكار البطاطا والدكستروز	PDA	Idg
.٣١	كلورافينيكول	Chloramphenicol	معمل أدوية سامراء
.٣٢	حامض الهيدروكلوريك	HCl	BDH
.٣٣	حليب فرز	Skim milk	BDH
.٣٤	أوراق ترشيح رقم ١	Filter paper	Whatman No.١
.٣٥	أوراق ترشيح فائق	Milipore filter ٠.٤٥	Whatman
.٣٦	أوراق ترشيح فائق	Milipore filter ٠.٢٢	Whatman
.٣٧	هايبوكلورات الصوديوم	NaOCl	تجاري

٣-١-٢ الأجهزة المستعملة

جدول (٢) يوضح الأجهزة المستعملة في التجارب المختبرية فضلاً عن الشركات المصنعة لها

	اسم الجهاز		الشركة المصنعة
١.	موصدة	Autoclave	WEBECO-GmbH-Germany
٢.	ماصات دقيقة	Automatic micropipette	ORGANON-TEKNIKA-Belgium
٣.	ميزان	Balance	SARTORIOUS-U.K.
٤.	جهاز تقطير	Distiller	H-JURGENS-CO.-Germany
٥.	حاضنة	Incubator	GALLENKAMK-England
٦.	مجهر مركب	Compound microscope	OLYMPUS-Japan
٧.	فرن كهربائي	Oven	MEMMERT-Germany
٨.	جهاز قياس الحموضة	pH-meter	PHILIPS-Holand
٩.	ثلاجة	Refrigerator	ISHTAR-Iraq
١٠.	ميزان الكتروني حساس	Sensitive electronic balance	SARTORIOUS-U.K.
١١.	حاضنة هزازة	Shaking incubator	MEMMERT-Germany
١٢.	جهاز المطياف الضوئي	Spectrophotometer	SPECTRONIC ٢١ Bansch and Lomb
١٣.	حمام مائي	Water bath	MEMMERT-Germany
١٤.	منبذة	Centrifuge	HERMLE Z ٢٣٠-Germany
١٥.	خلاط	Blander	National
١٦.	مسخن ومحرك مغناطيسي	Magnatic stirrer	Scientific industries, U.S.A.

٣-١-٣ الأوساط الغذائية

١. وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة (idg) ويتكون من ٤ غم/لتر مستخلص البطاطا و٢٠غم/لتر دكستروز و١٥غم/لتر آكار (Agar No. ١).

٢. وسط مستخلص البطاطا والسكروز السائل Potato Sucrose Broth

ويتكون من مستخلص البطاطا (بواقع ٢٠٠ غم بطاطا/لتر ماء مقطر) و٢٠غم/لتر سكروز (Koneman *et al.*, ١٩٧٩).

٣. وسط اكار الحليب Milk Agar

حضر بإذابة ١غم من حليب الفرز (Skim Milk) في ١٠مل من الماء المقطر، كما ذوب ٢غم من الاكار في ٩٠ مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى ٦، عقم المحلولان كلاً على حده ومُزجا بعده تبريدهما إلى درجة حرارة ٤٥م وصب الوسط في أطباق بتري معقمة (Bilinsk,١٩٨٧).

٤. وسط الكايتين الغروي

حضر حسب طريقة (Baath and Soder-Strom, ١٩٨٠) ويتكون من ٥٠٠ مل من محلول الأملاح المعدنية التالية:

١. نترات الصوديوم	$NaNO_3$	٢	غم
٢. كبريتات الامنيوم	$(NH_4)_2SO_4$	١	غم
٣. فوسفات البوتاسيوم الثنائية الهيدروجين	KH_2PO_4	١	غم
٤. كبريتات المغنيسيوم المائية	$MgSO_4.7H_2O$	٠.٥	غم
٥. كلوريد البوتاسيوم	KCl	٠.٥	غم
٦. كبريتات الحديد المائية	$FeSO_4.7H_2O$	٠.٠١	غم
٧. كبريتات النحاس المائية	$CuSO_4.5H_2O$	٠.٠١	غم
٨. كبريتات الزنك المائية	$ZnSO_4.7H_2O$	١	ملغم
٩. كبريتات المنغنيز المائية	$MnSO_4.2H_2O$	٥	ملغم
١٠. كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2$	٠.٠٥	غم

ثم أضيف له ٥٠٠ مل من المحلول المتكون من

كايتين غروي	٤ غم (وزن جاف)
اكار	٢٠٠ غم
ماء مقطر	٥٠٠ مل

عقم الوسط ثم صب في أنابيب اختبار معقمة ذات سداد لولبي على ارتفاع (٣-٤) سم من الأنبوبة.

٥. وسط إنتاج إنزيم الكايتنيز Minimal Synthetic Medium (MSM)

حضر الوسط وفق طريقة (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠) ويتكون من ٠.٢غم/لتر كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ و٠.٩غم/لتر فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين K_2HPO_4 و٠.٢غم/لتر كلوريد البوتاسيوم KCl و١غم/لتر نترات الامونيوم NH_4NO_3 و٠.٠٠٢غم/لتر كبريتات الحديد المائية $FeSO_4.7H_2O$ و٠.٠٠٢غم/لتر كبريتات المنغنيز $MnSO_4$ و٠.٠٠٢غم/لتر كبريتات الزنك $ZnSO_4$ وأضيفت كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ كمصدر نتيروجيني وبواقع ٠.٣٣٩نانوغرام/لتر ويجهز الوسط بمصدر كاربوني مناسب وبنسبة ١%.

عقمت جميع الأوساط بدرجة حرارة ١٢١م وضغط ١.٥ بار لمدة ١٥ دقيقة باستثناء الوسط الذي يحوي على حليب الفرز فقد تم تعقيم محلول الـ Skim milk لمدة ٥ دقائق ثم أضيف إلى بقية مكونات الوسط المعقمة في الظروف السابقة نفسها، كما أضيف المضاد الحيوي الـ Chloramphenicol إلى الأوساط بنسبة ٠.٢٥غم/لتر لغرض منع نمو البكتريا.

٣-١-٤ المحاليل

١. محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز ٠.٢ مولار وبأرقام هيدروجينية (٤, ٥)

ويتكون من محلول خلات الصوديوم بتركيز ٠.٢ مولار وحامض الخليك بتركيز ٠.٢ مولار (Gomori, ١٩٥٥).

٢. محلول الفوسفات الدارئ بتركيز ٠.٢ مولاروبأرقام هيدروجينية (٦,٧,٨)

ويتكون من محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 بتركيز ٠.٢ مولار وفوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين K_2HPO_4 بتركيز ٠.٢ مولار (Gomori, ١٩٥٥).

٣. محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز ١٠%

حضر بإذابة ١٠غم من هيدروكسيد الصوديوم في حجم معين من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠مل بالماء المقطر.

٤. محلول حامض الهيدروكلوريك بتركيز ١٣.٧%

وحضر بإذابة ٣٧ مل من حامض الهيدروكلوريك بتركيز ٣٧٪ في كمية معينة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠مل بالماء المقطر.

٥. محلول حامض الهيدروكلوريك المركز بتركيز ١٢ مولار

٦. **محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز ٥ مولار**

وحضر بإذابة ٢٠غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية معينة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر.

٧. **محلول الكايتين الغروي بتركيز ٠.٧٥%**

حضر بإذابة ٠.٣غم كايتين غروي في كمية من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني معين مع التحريك باستعمال المحرك المغناطيسي ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠مل بالمحلول الدارئ نفسه.

٣-١-٥ الكواشف

١. **كاشف النحاس:** ويتكون من محلولين أساسيين هما

محلول A: ويتكون من إذابة ٦غم تارترات الصوديوم-بوتاسيوم و١٢غم من كاربونات الصوديوم اللامائية في ١٢٥مل من الماء المقطر ويضاف إلى ذلك ٢غم من كبريتات النحاس المائية و٨غم من كاربونات الصوديوم الحامضية وأذيبت جيداً ثم رشحت بورق الترشيح نوع ١ .Whatman No.

محلول B: حضر بإذابة ٩٠غم من كبريتات الصوديوم اللامائية في ٢٥٠ مل من الماء المقطر وسخن على بدرجة حرارة ٨٠ م باستعمال محرك مغناطيسي لحين اختفاء الفقاعات، ورشح ساخناً بورق الترشيح نوع ١.Whatman No، ثم خلط المحلول A مع المحلول B وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى ٥٠٠ مل وحفظ في عبوة بدرجة حرارة ٢٥م (Somogyi, ١٩٥٢).

٢. كاشف نيلسون Nelson

حضر بإذابة ٢٥غم مولبيدات الامونيوم في ٤٥٠ مل من الماء المقطر ثم وضع في دورق تسخين على خلاط مغناطيسي مع التسخين الهادئ بدرجة حرارة ٦٠ م، وأخذت ٣ غم ارسنات الصوديوم وأذيبت في ٢٥ مل من الماء المقطر مع الرج المستمر وأضيف إليها ٢١ مل من حامض الكبريتيك المركز وتم خلط المحتويات وتكملة الحجم إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر ووضع المحلول في حمام مائي بدرجة ٥٥م لمدة ٢٥ دقيقة، ثم بردت المحتويات وحفظ المحلول في قنينة معتمة بدرجة حرارة الغرفة (Somogyi, ١٩٥٢).

٣-٢ طرائق العمل

٣-٢-١ مصدر اللقاح الفطري

٣-٢-١-١ الفطر *Rhizoctonia solani*

تم الحصول على عزلة مرضية للفطر *R. solani* من قسم وقاية النبات في كلية الزراعة/جامعة بغداد، وقد عزلت من نباتات قطن مصابة.

٣-٢-١-٢ الفطر *Trichoderma harzianum*

تم الحصول على عزلة الفطر *Trichoderma harzianum* من المبيد الحيوي البيوكونت (Biocont-T-(Granular الأردني المنشأ من قسم وقاية النبات في كلية الزراعة/ جامعة بغداد الذي يمتاز بكونه مقاوماً حيوياً فطرياً فعالاً لوقاية وعلاج النباتات من الأمراض الفطرية ومن بينها الأمراض التي يسببها الفطر *R. solani*. المادة الفعالة عبارة عن أبواغ حية للفطر *Trichoderma harzianum* بتركيز أعلى من 19×10^7 بوغ/غرام واستعمل بعد حله بالماء بنسبة تخفيف مماثلة للنسبة المستعملة في البيوت الزجاجية وهي ٢٥ غرام/٢٠ لتر وزرع بطريقة الصب (Pouring) في أطباق بتري حاوية على وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar وحضن بدرجة حرارة ٢٥م لمدة خمسة أيام وبعد ظهور المستعمرات أجريت عملية عزل لمستعمرات الفطر على وسط اكار البطاطا والدكستروز (PDA) للحصول على مستعمرات نقية للفطر.

٣-٢-٢ حفظ اللقاح الفطري

تم صب ٢٠ مل من الوسط PDA المعقم في أنابيب اختبار حجم ٥٠مل بعدها تركت الأنابيب مائلة حتى تصلب الوسط الغذائي، لقحت مجموعة من الأنابيب بقرص قطره ١٠ملم مأخوذة من حافة مستعمرة الفطر *R. solani* النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر ٤ أيام ولقحت مجموعة أخرى من الأنابيب بقرص مماثل للفطر *T. harzianum* النامي على الوسط

PDA وبعمر ثلاثة أيام، حضنت الأنابيب بدرجة ٢٥م لمدة ٤ أيام وحفظت في الثلاجة بدرجة ٤ م لحين الاستعمال.

٣-٢-٣ تحضير اللقاح الفطري

٣-٢-٤ تأثير الفطر *R. solani* في نسبة إنبات بذور الطماطة

اعتمدت طريقة Carling وLeiner (١٩٨٦). إذ تم زرع بذور الطماطة *Lycopersicon esuclentum* Mill صنف Super marmonde المعقمة سطحياً بمحلول هيبوكلورات الصوديوم بتركيز ٤٪ لمدة ٤ – ٥ دقيقة والتي جرى غسلها بالماء المقطر المعقم فيما بعد على أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي المعقم PDA بمعدل (٢٠ بذرة/طبق) وبشكل دائري بعد تلقيح مركز الطبق بقرص قطره ١٠ ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *R. solani* النامي على الوسط PDA وبواقع ثلاثة مكررات مع الأخذ بنظر الاعتبار إجراء معاملة مقارنة بزراعة بذور الطماطة على الوسط الغذائي بالطريقة نفسها وبدون تلقيح الوسط بالفطر *R. solani*. تم حساب نسبة إنبات بذور الطماطة بعد مرور ستة أيام من الحضن بدرجة حرارة ٢٥ م وحسب القانون التالي

$$\text{نسبة الإنبات} = \frac{\text{العدد الكلي للبذور} - \text{عدد البذور غير النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times ١٠٠$$

٣-٢-٥ تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *R. solani*

لحساب تأثير تداخل درجات الحرارة ١٥ ٢٥ و٣٥ م والأرقام الهيدروجينية ٤ و٦ و٨ في نمو الفطر الممرض *R. solani* وزع الوسط PDA المعقم على ثلاثة دوارق مخروطية حجم ٥٠٠ مل بواقع ٣٠٠ مل وسط لكل دورق وعدلت الأرقام الهيدروجينية للأوساط إلى ٦ و٨ باستعمال محلول دارئ الفوسفات بتركيز ٠.٢ مولار وإلى الرقم الهيدروجيني ٤ باستعمال محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز ٠.٢ مولار وبعد تعقيمها بجهاز التعقيم البخاري صبت الأوساط في أطباق بتري قطرها ٩٠ ملم بواقع ٩ أطباق لكل رقم هيدروجيني بعدها لقحت الأطباق جميعها بقرص قطره ١٠ ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *R. solani* النامي على الوسط PDA بعمر أربعة أيام وقسمت الأطباق التي لها الرقم الهيدروجيني نفسه إلى ثلاث مجاميع وحضنت كل مجموعة في واحدة من الدرجات الحرارية ١٥ ٢٥ و٣٥ م لمدة سبعة أيام وبواقع ثلاثة مكررات لكل درجة حرارة وقدر نمو الفطر بأخذ معدل قطرين متعامدين من ظهر المستعمرة يمران بمركز القرص كل ٢٤ ساعة.

٣-٢-٦ تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *T. harzianm*

اتبعت نفس الطريقة السابقة ولكن باستعمال قرص الفطر *T. harzianm* النامي على الوسط PDA وبعمر ثلاثة أيام.

٣-٢-٧ تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في الكفاءة التضادية للفطر المسيطر *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *R. solani*

اعتمدت طريقة الزرع المزدوج (Ligocka *et al.*, ٢٠٠٢) لاختبار قدرة الفطر المسيطر *T. harzianum* في التضاد مع الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* في أطباق بتري حاوية على الوسط PDA المعقم إذ لقح مركز النصف الأول من الطبق بقرص قطره ١٠ ملم من الفطر *T. harzianum* النامي على الوسط PDA وبعمر ثلاثة أيام أما مركز النصف الآخر من الطبق فقد لقحت بقرص مماثل من الفطر الممرض *R. solani* النامي على الوسط PDA وبعمر أربعة أيام وأجريت معاملة مقارنة وذلك بتلقيح مركز أحد نصفي الطبق بالفطر الممرض وجرى الاختبار عند ثلاثة أرقام هيدروجينية هي ٤ ٦ و٨ وذلك بتعديل قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط إلى ٤ باستعمال محلول الخلات الدارئ بتركيز ٠.٢ مولار وإلى الرقمين الهيدروجينيين ٦ و ٨ باستعمال محلول الفوسفات الدارئ بتركيز ٠.٢ مولار وقسمت الأطباق الحاوية على الرقم الهيدروجيني نفسه إلى ثلاث مجاميع وحضنت كل مجموعة في واحدة من الدرجات الحرارية ١٥ ٢٥ و٣٥م وبواقع ثلاثة مكررات لكل درجة حرارة وقيست أقطار المستعمرات بعد مدة حضانة ٧ أيام وقدرت درجة التضاد حسب مقياس (Bell *et al.*, ١٩٨٢) والمكون من خمس درجات

١. الفطر المضاد يغطي الطبق بكامله.
٢. الفطر المضاد يغطي ٣/٤ مساحة الطبق.
٣. الفطر المضاد والفطر الممرض كل منهما يغطي نصف مساحة الطبق.
٤. الفطر الممرض يغطي ٣/٤ مساحة الطبق.
٥. الفطر الممرض يغطي الطبق بكامله.

٣-٢-٨ استخلاص الكايتين

اتبعت طريقة (Bemiller and Whistler, ١٩٦٢) مع بعض التحويرات لتصبح كالآتي:

١. نظفت قشور الروبيان بعد غسلها جيداً بالماء الجاري وجففت بوضعها قرب مصدر تيار هواء لنحصل على ٢٠ غم قشور جافة.

٢. طحنت القشور بوساطة الطاحونة الكهربائية ونقعت في محلول هيدروكسيد الصوديوم ١٠% بدرجة حرارة المختبر لمدة ثلاثة أيام (مع مراعاة تجديد المحلول القاعدي كل يوم.

٣. غسل الناتج بالماء عدة مرات للتخلص من القاعدة ثم سحن بالمذيبات العضوية التالية: أسيتون مركز ٤٠ مل وايثانول مطلق ١٠٠ مل وإيثر ٢٠ مل على التوالي في جفنة خزفية ورشحت بعد كل إضافة باستعمال ورق ترشيح نوع ١ .Whatman No.

٤. جفف الناتج تحت ضغط مخلخل بوساطة (Vacuum dessicator) ثم نقعت بمحلول ١٣.٧% حامض الهيدروكلوريك بدرجة حرارة ٢٠- م لمدة أربع ساعات.

٥. غسل الناتج بـ ٢٥٠ مل من الماء البارد ثلاث مرات لكي يتم التخلص من الحامض.

٦. سحن الناتج مرة ثانية بالايثانول المطلق والايثر وجفف الناتج وأعيدت المعاملة بالحامض أيضاً وغسل بعدها بالماء البارد ثلاث مرات أيضاً.

٧. نقع الناتج في محلول هيبوكلورات الصوديوم التجاري بتركيز ٦.٥٪ برجه على محرك مغناطيسي لمدة ٥-١٠ دقائق، ثم غسل الناتج الأبيض بـ ٢٥٠ مل ماء بارد أربع مرات لكي يتم التخلص من القاعدة وترك ليجف.

٨. كان الناتج النهائي ٤ غم وزن جاف من الكايتين أي بنسبة ٢٠% من الوزن الأولي للقشور الجافة.

٣-٢-٩ تحضير الكايتين الغروي

اتبعت طريقة Inglis وKawchuk (٢٠٠٢) وتتلخص بإذابة ٥٠ غم من الكايتين (Crab shell chitin) في ١٥٠ مل من حامض HCl بتركيز ١٢ مولار. يترسب الكايتين بشكل عالق غروي (Colloidal suspension) عند إضافته ببطء إلى ٢٠٠ مل من الماء المقطر المبرد إلى ٤ مْ، ويعادل الناتج إلى الرقم الهيدروجيني ٧ بوساطة إضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز ٥ مولار، نبذ الناتج مركزياً بسرعة 10000xg، أضيف للراسب

محلول دارئ الفوسفات بتركيز ٠.٢ مولار وبرقم هيدروجيني ٧، أعيد النبذ المركزي مرة ثانية وبالسرعة نفسها، حفظ الراسب في الثلاجة داخل قنينة معتمة لحين استعماله.

لتحديد محتوى الكايتين من الماء، أخذت عينة من الكايتين الغروي وجففت بدرجة حرارة ٧٠ م ووزنت لمعرفة الفرق في الوزن.

٣-٢-١٠ تحضير الغزل الفطري الطري والجاف للفطر الممرض *R. solani*

استعملت الطريقة المتبعة من (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠) مع بعض التحويرات وكما يلي:

١. زرع قرص اكار البطاطا الحاوي على مستعمرة الفطر *R. solani* بعمر أربعة أيام في ١٠٠ مل من وسط البطاطا السائل Potato sucrose broth الموضوع في دورق مخروطي حجم ٥٠٠ مل وحضنت بدرجة حرارة ٢٥ م لمدة ١٤ يوماً.

٢. بعد انتهاء مدة الحضن جمع الغزل الفطري بوساطة ترشيحه على أوراق ترشيح نوع Whatman No.١ وغسل بالماء المقطر بعدها خلط مع الماء المقطر في الخلاط.

٣. نبذت المكونات مركزياً سرعة 6000xg لمدة عشر دقائق ثلاث مرات بعد الغسل بالماء المقطر في كل مرة للتخلص من السكريات الذائبة.

٤. سحن الراسب مع الأسيتون المبرد بدرجة ٢٠-م في جفنة خزفية وترك ليجف في الثلاجة أو قرب مصدر تيار هواء بارد لنحصل على غزل فطري مجفف بشكل مسحوق دقيق لاستعماله لاحقاً كمصدر كاربوني في وسط إنتاج إنزيم الكايتنيز.

ولتحضير الغزل الفطري الطري نتبع نفس الخطوات السابقة باستثناء الخطوة الرابعة، وتجري عملية تحضير الغزل الفطري الطري تحت ظروف تعقيم إذ يعقم الخلاط بالايثانول المطلق المضاف له المضاد الحيوي Chloramphenicol كما ويعقم الماء المقطر المستعمل في الخلط والغسل.

أضيف الغزل الفطري الطري إلى وسط إنتاج إنزيم الكايتنيز بصورة مباشرة تحت ظروف تعقيم إلا أن الغزل الفطري الجاف عقم مع الوسط بجهاز المؤصدة.

٣-٢-١١ الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لإنزيم الكايتنيز

اتبعت طريقة (Baath and Soder-strom, ١٩٨٠) إذ لقحت أنابيب اكار الكايتين الغروي بقرص قطره ١٠ ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *T. harzianm* النامي على الوسط الغذائي PDA وبعمر ثلاثة أيام، ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٢٨ م لمدة ١٤ يوماً وبواقع ثلاثة مكررات وأجريت معاملة مقارنة وذلك بترك أنبوبة غير مزروعة بمستعمرات

الفطر لملاحظة الفرق في منطقة التحلل، يقاس تحلل الكايتين بعمق منطقة الإراقة وتقرأ النتائج تبعاً للجدول التالي:-

جدول (٣) يوضح الكشف عن مستوى تحلل الكايتن باستعمال وسط الكايتن الغروي

عمق منطقة التحلل	تصنيف العزلة	الرمز
١٥< ملم	شديد الفعالية	+++
١٠-١٥ ملم	متوسط الفعالية	++
١٠> ملم	ضعيف الفعالية	+
صفر	غير محلل	-

٣-٢-١٢ الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لإنزيم البروتييز

لقح وسط اكار الحليب milk agar بقرص قطره ١٠ ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *T. harzianm* النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر ثلاثة أيام وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٢٥ م وبواقع ثلاثة مكررات، ويتم الكشف عن تحلل البروتين عند ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات (Bilinsk, ١٩٨٧).

٣-٢-١٣ تقدير السكريات المختزلة والمنحنى القياسي لسكر الـ D-glucose

استعمل السكر D-glucose كمادة قياسية لعمل المنحنى القياسي للسكريات المختزلة إذ تم إذابة ١٠٠ ملغم من سكر الـ D-glucose في كمية معينة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر لنحصل على تركيز ١ ملغم/مل والذي يمثل محلول A. بعدها أخذ ١٠ مل من محلول A وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل ماء مقطر لنحصل على تركيز ٠.١ ملغم/مل (١٠٠ مايكروغرام/مل) لاستعماله كمحلول خزين (stock solution).

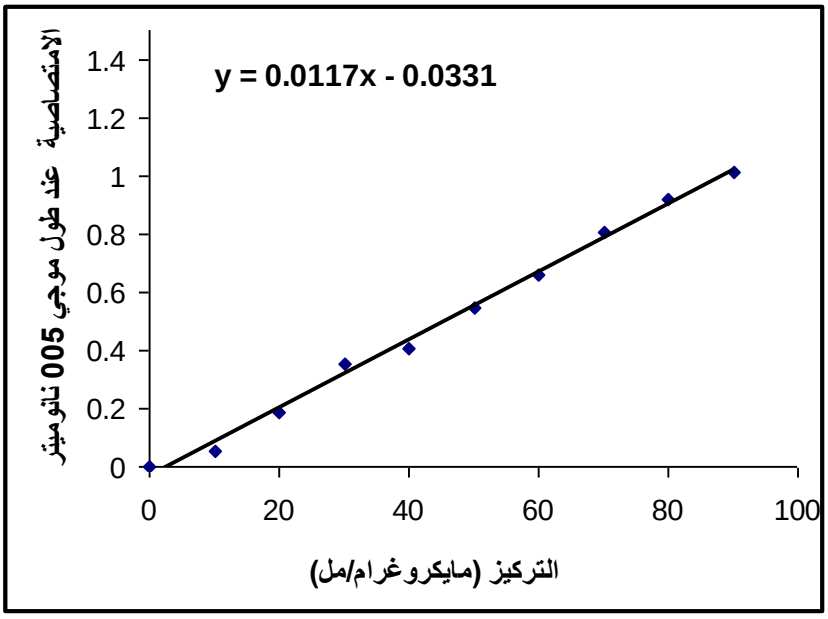
حضرت سلسلة من التراكيز من المحلول الخزين (stock solution) هي ١٠ و٢٠ و٣٠ و٤٠ و٥٠ و٦٠ و٧٠ و٨٠ و٩٠ مايكروغرام/مل وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز.

ولتحديد مقدار السكريات المختزلة في المحاليل اتبعت طريقة Somogyi (١٩٥٢) وكالآتي:

١. سحب ١ مل لكل من التراكيز أعلاه ووضع في أنبوبة اختبار وأضيف له ١ مل كاشف النحاس ووضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة عشر دقائق ثم بردت تبريداً سريعاً بالماء البارد.

٢. أضيف لكل منها ٢ مل من كاشف نيلسون وتركت الأنابيب في مكان مظلم لمدة ٣٠ دقيقة.

٣. نبذت الأنابيب مركزياً بسرعة ٦٠٠٠xg لمدة خمس دقائق وأخذ الراشح وقيست له الامتصاصية على طول موجي ٥٠٠ نانوميتر وصفر الجهاز باستعمال الماء المقطر والذي أجريت له المعاملات السابقة.



شكل (٤) المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز

٣-٢-١٤ قياس الفعالية الإنزيمية للكايتنيز

يعتمد مبدأ قياس الفعالية الإنزيمية للكايتنيز على مقدار سكر N-acely glucosamine وباقي السكريات المختزلة الناتجة من التحلل الإنزيمي للكايتين وعبر عن الفعالية الإنزيمية للكايتنيز بأنها كمية الإنزيم التي تحرر مايكرومول واحد من السكريات المختزلة بالساعة الواحدة تحت ظروف القياس في ١ مل من الراشح الإنزيمي (Tweddell *et al.*, ١٩٩٤).

ولتحديد الفعالية الإنزيمية للكايتنيز اتبعت الطريقة المعتمدة من (Mauch and Boller, ١٩٨٨) وتتلخص بإضافة ١ مل من الراشح الإنزيمي الخام إلى ١ مل من محلول الكايتين الغروي ٠.٧٥٪ في أنبوبة اختبار، حضن المزيج بدرجة حرارة ٣٧ م في حمام مائي هزاز لمدة ساعتين وفصل محلول المادة الأساس-الإنزيم بالنبذ المركزي بسرعة ١٠٠٠xg لمدة ثلاث دقائق لإيقاف التفاعل وأخذ الراشح لغرض قياس السكريات المختزلة حسب طريقة (Somogyi, ١٩٥٢) الموضحة سابقاً ولتصفير الجهاز استعمل الإنزيم المقتول حرارياً والذي أجريت عليه المعاملات السابقة.

٣-٢-١٥ تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز

جرت دراسة تأثير بعض العوامل وهي مدة الحضن والمصدر الكربوني والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والتهوية في إنتاج الكايتنيز للفطر *T. harzianum* النامي على الوسط المعدني Minimal synthetic medium (MSM) إذ ثبتت بقية العوامل باستثناء العامل المدروس ولقح وسط الإنتاج بأقراص مأخوذة من حافة مستعمرة الفطر *T. harzianum* النامي في الوسط PDA وبعمر ثلاثة أيام وبواقع ثلاثة أقراص قطر الواحد منها ٥ ملم لكل ١٠ مل من وسط الإنتاج وقدرت الإنتاجية بدلالة وحدة/مل (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠).

٣-٢-١٥-١ المصدر الكربوني ومدة الحضن

تم اختبار ثلاثة أنواع من المصادر الكربونية وهي الكايتين والغزل الفطري الطري والجاف بنسبة ١% (w/v) من الوسط MSM وعدلت قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط إلى ٦ باستعمال محلول دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني ٦. لقح الوسط بأقراص الفطر *T. harzianum* وحضنت المزارع بدرجة حرارة ٣٠ م مع المزج سرعة ١٥٠ دورة/دقيقة باستعمال الحاضنة الهزازة وبواقع ثلاثة مكررات، فصل الغزل الفطري وبقايا المصادر الكاربونية والمواد غير المتحللة باستعمال النبذ المركزي بدرجة حرارة ٤ م وبسرعة ٥٠٠٠xg ولمدة عشر دقائق، مرر الرائق خلال ورق ترشيح نوعه ٠.٤٥ Milipore filter واستعمل الرائق مستخلصاً خاماً وقدرت الفعالية الإنزيمية كل ٢٤ ساعة حتى نهاية مدة الحضن.

٣-٢-١٥-٢ الرقم الهيدروجيني

حضر وسط إنتاج الإنزيم MSM الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١% كمصدر وحيد للكربون وبأرقام هيدروجينية تراوحت مابين ٤-٨ باستعمال محلول الفوسفات الدارئ بأرقام هيدروجينية ٦ و٧ و٨ ومحلول خلات الصوديوم الدارئ بأرقام هيدروجينية ٤ و٥ ولقحت الأوساط بأقراص الفطر *T. harzianum* قطرها ٥ ملم وبواقع ثلاثة أقراص لكل ١٠ مل من وسط MSM وحضنت المزارع بدرجة حرارة ٣٠ م لمدة ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاثة مكررات لكل رقم هيدروجيني، استخلص الراشح الخام للإنزيم وقدرت الفعالية حسب طريقة Somogyi (١٩٥٢).

٣-٢-١٥-٣ درجة الحرارة

لقح الوسط الخاص بإنتاج الإنزيم (MSM) الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١% وبرقم هيدروجيني ٤ بأقراص الفطر *T. harzianum* قطرها ٥ ملم وبواقع ثلاثة أقراص لكل ١٠ مل من وسط MSM وحضنت المزارع بدرجات حرارية مختلفة ١٥ و٢٠ و٢٥ و٣٠ و٣٥ و٤٠ مْ لمدة ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة ثم استخلص الراشح الإنزيمي الخام وقدرت الفعالية حسب طريقة Somogyi (١٩٥٢).

٣-٢-١٥-٤ التهوية

لدراسة تأثير التهوية في إنتاج الإنزيم أجريت التجربة تحت ظرفين مختلفين إحدهما وسط ساكن بدون تحريك والآخر وسط متحرك بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة إذ لقح وسط إنتاج الإنزيم MSM الحاوي على الغزل الفطري الجاف للفطر *R. solani* بنسبة ١٪ بأقراص الفطر *T. harzianum* بواقع ثلاثة أقراص لكل ١٠ مل من الوسط MSM قطر القرص الواحد ٥ ملم وعدل الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج إلى pH=٤ باستعمال محلول دارئ الخلات برقم هيدروجيني ٤ حضنت المزارع بدرجة حرارة ٢٠ م لمدة ٢٤ ساعة وبواقع ثلاثة مكررات ثم قدرت الفعالية الإنزيمية للراشح الإنزيمي الخام حسب طريقة Somogyi (١٩٥٢).

٣-٢-١٦ تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم الخام

قدرت فعالية الراشح الإنزيمي الخام في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني لركيزة الكايتين الغروي وذلك لمعرفة الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الراشح الإنزيمي الخام إذ أضيف ١ مل من محلول الكايتين الغروي المعلق بمحاليل الدوارئ التي تراوحت أرقامها الهيدروجينية ما بين ٤-٨ إلى ١ مل من الراشح الإنزيمي الخام المأخوذ من مزرعة فطرية لإنتاج إنزيم الكايتنيز برقم هيدروجيني ٤ ودرجة حرارة ٢٠ م، وضعت الأنابيب في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ساعتين بعدها تم إيقاف التفاعل وقدرت الفعالية الإنزيمية حسب طريقة Somogyi (١٩٥٢).

٣-٢-١٧ تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم الخام

تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في ثباتية الإنزيم الخام عند الأرقام الهيدروجينية (٤ و٦ و٧) لركيزة الكايتين الغروي وذلك بأخذ ٠.٢ مل من الراشح الإنزيمي الخام وإضافته إلى ٠.٨ مل من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني معين حضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٣٥ م مدة نصف ساعة، بعدها وضعت في حمام ثلجي، وأضيف إلى كل ١ مل من محلول الإنزيم الخام ١ مل من محلول الكايتين الغروي بأرقام هيدروجينية ٤ و ٥ و٦ و٧ و٨ بعدها وضعت الأنابيب في

حمام مائي هزاز بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ساعتين وقدرت الفعالية حسب طريقة (١٩٥٢) Somogyi.

٣-٢-١٨ تأثير الراشح الإنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في نمو الفطر الممرض *R. solani*

لغرض بيان تأثير إنزيمات الفطر *Trichoderma harzianum* في نمو الفطر الممرض *R. solani* بمعزل عن تأثير الغزل الفطري والأبواغ والمضادات الحياتية والمركبات الأيضية الأخرى الموجودة في الراشح الإنزيمي الخام تم إجراء بعض المعاملات، على الراشح الخام لإنزيم الكايتنيز

المعاملة الأولى: فصل الإنزيم عن المضاد الحياتي وذلك عن طريق ترسيب بروتين الإنزيم بإضافة الأسيتون المبرد إلى ٢٠- م إلى الراشح الخام للإنزيم بنسبة حجم واحد من الراشح إلى حجمين من الأسيتون بصورة تدريجية، نبذ المحلول بسرعة ١٠٠٠٠xg لمدة نصف ساعة، وأذيب الراسب في حجم معين من المحلول الدارئ يعادل نصف حجم الراشح وبرقم هيدروجيني ٤ و٧ بعدها مرر الإنزيم خلال أوراق ترشيح نوع Milipore filter ٠.٢٢ لغرض التعقيم وللتخلص من الغزل الفطري والأبواغ (Pohl, ١٩٩٠).

المعاملة الثانية: قتل الإنزيم وذلك بغليه بدرجة حرارة ١٠٠ م لمدة عشر دقائق، بعدها مرر الإنزيم خلال أوراق ترشيح نوع Milipore filter ٠.٢٢ للتخلص من الغزل الفطري والأبواغ.

المعاملة الثالثة: تم إمرار الراشح الخام للإنزيم خلال المرشح Milipore filter ٠.٢٢ لغرض التخلص من الغزل الفطري والأبواغ..

أضيفت المعاملات السابقة للراشح الخام للإنزيم إلى الوسط PDA قبل تصلبه بأرقام هيدروجينية ٤ و٧ للوسط وبنسبة ١٠%، بعدها لقحت الأوساط بقرص الفطر *R. solani* وسجل معدل نمو الفطر بعد كل ٢٤ ساعة.

٣-٣ التحليل الإحصائي

حللت نتائج التجارب وفق نموذج التجارب العاملية بتصميم تام التعشية Factorial experiments with completely randomized design وقد استعمل اختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D.) تحت مستوى ٠.٠٥ لبيان معنوية النتائج (الراوي وخلف الله، ١٩٨٠).

٤-١ تأثير الفطر *R. solani* في نسبة انبات بذور الطماطة

أظهرت نتائج معاملة بذور نبات الطماطة *Lycopersicon esculentum* Mill صنف Super marmande بالفطر الممرض *R. solani* إن نسبة إنبات هذه البذور كانت ٤٠٪ بعد ستة أيام من تنميتها في وسط الـ PDA الملقح بقرص الفطر الممرض مقارنة بالبذور غير المعاملة.

٤-٢ تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *R. solani*

٤-٢-١ درجة الحرارة

أظهرت نتائج هذه التجربة (شكل ٥-أ) وجود فروقات معنوية في معدلات نمو الفطر *R. solani* النامي في وسط الـ PDA للمستويات الحرارية ١٥ و ٢٥ و ٣٥ م ورقم هيدروجيني ٤ (عند مستوى معنوية <٠.٠٥) بزيادة مدة الحضن كما لوحظ بأن معدل نمو الفطر كان سريعاً عند درجتي الحرارة ٢٥ و ٣٥ م مقارنة بدرجة الحرارة ١٥ م، إذ غطى الفطر مساحة الطبق بالكامل في اليوم السادس من الحضن عند كلتا الدرجتين الحراريتين بينما لم يغطِ الفطر سوى ٧٠ % من مساحة الطبق في نهاية مدة الحضن عند درجة حرارة ١٥ م.

كما بينت نتائج التجربة ذاتها (شكل ٥-ب) ازدياد معدلات نمو الفطر بصورة كبيرة عند درجتي الحرارة ٢٥ و ٣٥ م ورقم هيدروجيني ٦ مع زيادة مدة الحضن مقارنة بدرجة الحرارة ١٥ م إذ غطى الفطر كامل مساحة الطبق في اليوم الرابع من الحضن عند كلتا الدرجتين بينما تباطأت معدلات النمو بصورة كبيرة عند درجة حرارة ١٥ م مقارنة مع باقي الدرجتين الحراريتين إذ بلغ قطر المستعمرة الفطرية ٧١ ملم في نهاية مدة الحضن.

ويبين الشكل (٥-ج) وجود فروقات معنوية (<٠.٠٥) في معدلات النمو للفطر *R. solani* النامي في وسط الـ PDA برقم هيدروجيني ٨ للمستويات الحرارية ١٥ و٢٥ و٣٥م طيلة مدة التجربة على الرغم من النمو البطيء للفطر عند الدرجات الحرارية كافة وبينت النتائج أن أعلى مستوى للنمو كان عند درجة حرارة ٣٥ م إذ بلغ قطر المستعمرة الفطرية ٧٨ ملم في نهاية مدة الحضن تلاها النمو في درجة الحرارة ٢٥ م إذ بلغ قطر المستعمرة الفطرية ٧١ ملم ثم تباطأت معدلات النمو بصورة كبيرة عند درجة حرارة ١٥ م إذ بلغ قطر مستعمرة الفطر ٤٣ ملم في نهاية مدة الحضن.

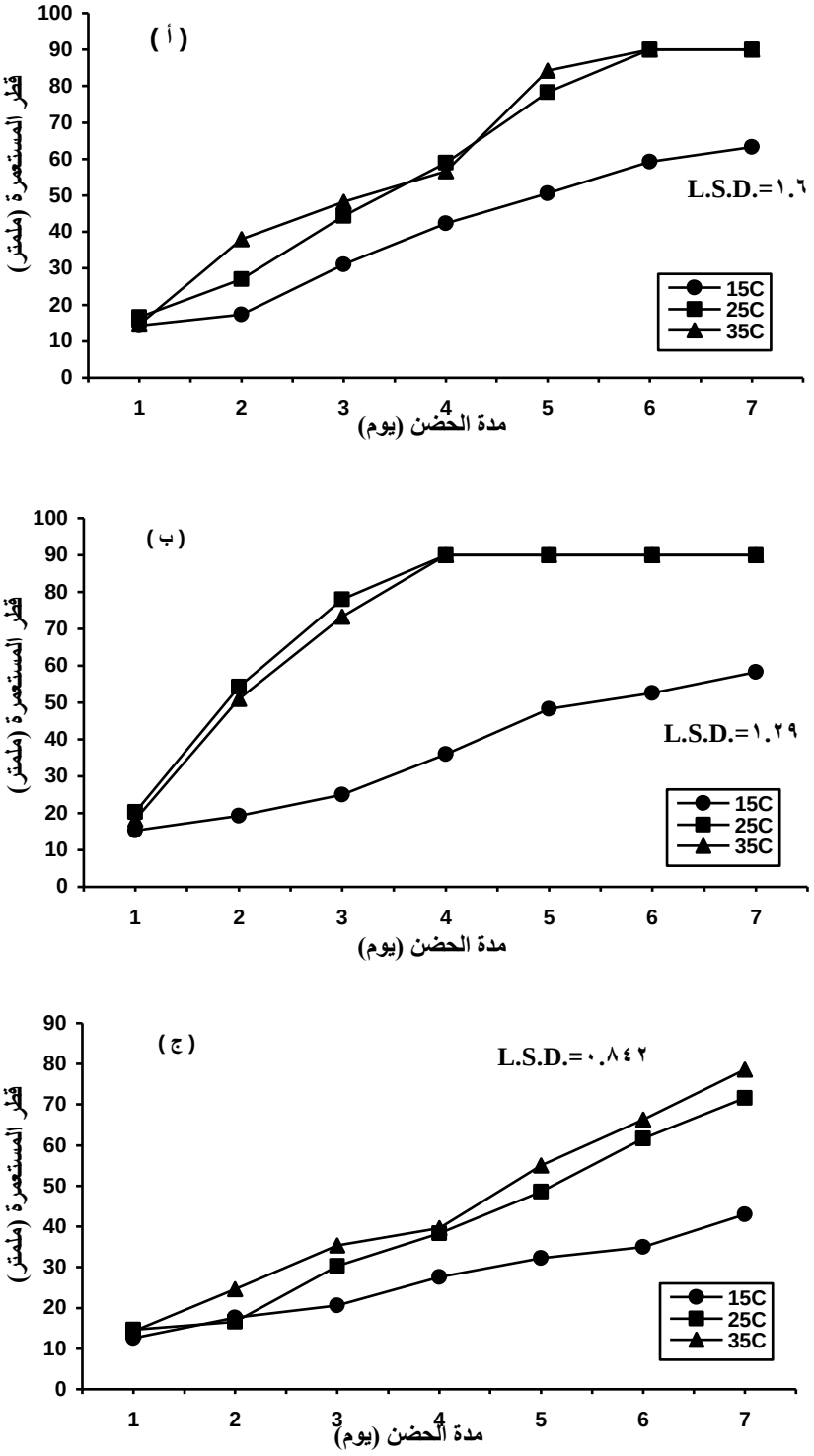
٤-١-٢ الرقم الهيدروجيني

بينت نتائج التجربة شكل (٦-أ) حصول زيادة معنوية (<٠.٠٥) في معدلات نمو الفطر بزيادة مدة الحضن وفي الأرقام الهيدروجينية ٤ و٦ و٨ عند درجة حرارة ١٥ م وأظهرت النتائج تفوق معدلات النمو عند الرقم الهيدروجيني ٤ مقارنة مع مثيلاتها في باقي المعاملات (٦ pH و

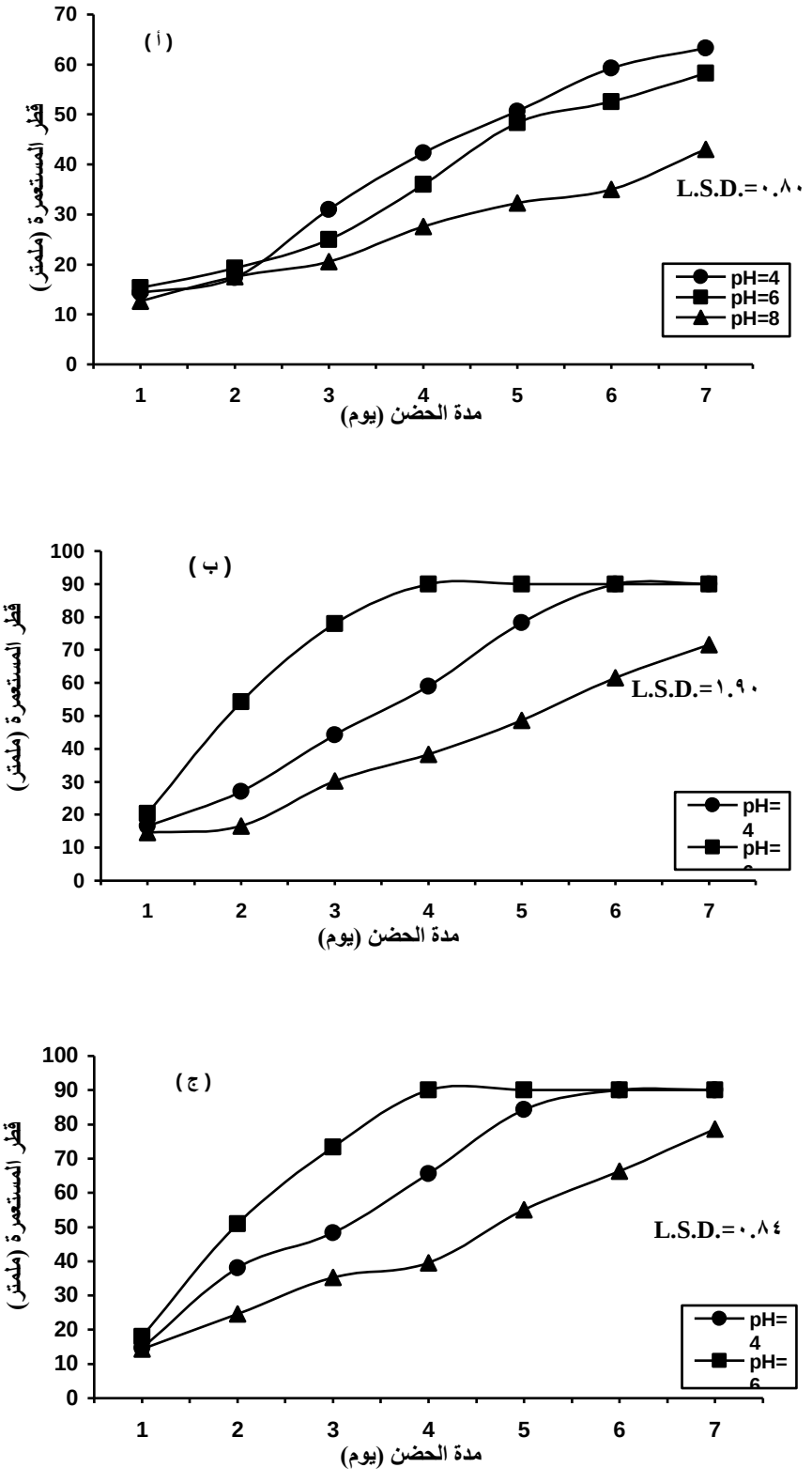
٨ pH) ومع ذلك لوحظ بأن مستوى النمو كان بطيئاً في الأرقام الهيدروجينية كافة ووصل إلى أدنى مستوى له عند الرقم الهيدروجيني ٨ إذ بلغ قطر مستعمرة الفطر ٤٣ ملم في نهاية مدة الحضن في حين بلغت أقطار المستعمرات الفطرية ٦٣ و ٥٨ ملم عند الأرقام الهيدروجيني ٤ و٦ على التوالي في نهاية مدة التجربة.

كما بينت نتائج التجربة ذاتها (شكل ٦-ب) وجود فروقات معنوية (<٠.٠٥) في معدلات نمو الفطر ما بين الأرقام الهيدروجينية ٤ و٦ و٨ وفي درجة حرارة ٢٥ م بزيادة مدة الحضن وأن أعلى زيادة معنوية في معدلات النمو كانت عند الرقم الهيدروجيني ٦ إذ غطى الفطر مساحة الطبق بالكامل في اليوم الرابع من الحضن فيما لم تغطى المساحة الكلية للطبق إلا في اليوم السادس من الحضن عند الرقم الهيدروجيني ٤ وامتازت المستعمرات النامية عند الرقم الهيدروجيني ٨ بنموها البطيء قياساً ببقية الأرقام الهيدروجينية إذ بلغ قطر المستعمرة الفطرية ٥٨ ملم في نهاية مدة الحضن.

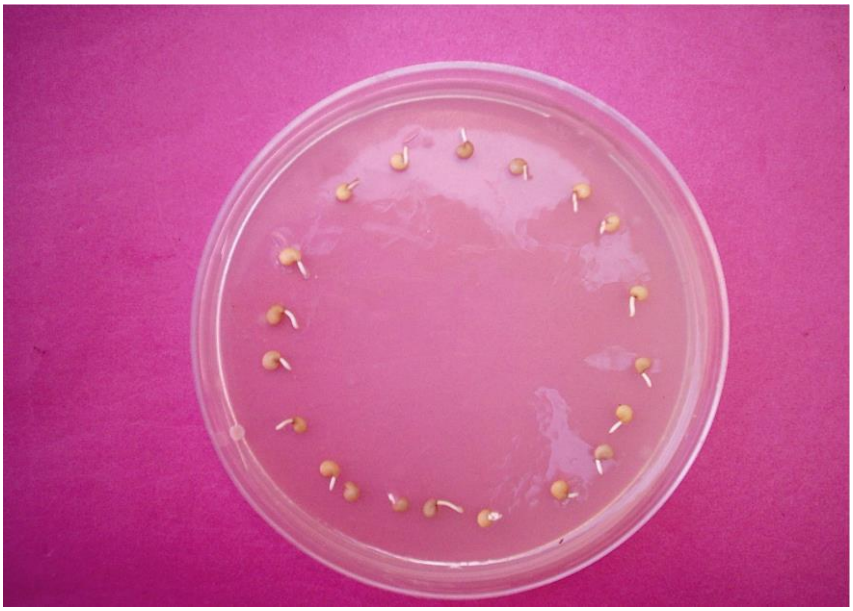
أما تأثير الأرقام الهيدروجينية في مستوى نمو الفطر *R. solani* عند درجة حرارة ٣٥ م فقد كان مشابهاً لمثيلاتها عند درجة حرارة ٢٥ م (شكل ٦-ج) مع فروقات طفيفة في أقطار المستعمرات النامية عند الرقم الهيدروجيني نفسه في كلتا الدرجتين الحراريتين وبلغ قطر المستعمرة الفطرية ٧٨ ملم عند الرقم الهيدروجيني ٨ في نهاية مدة الحضن.



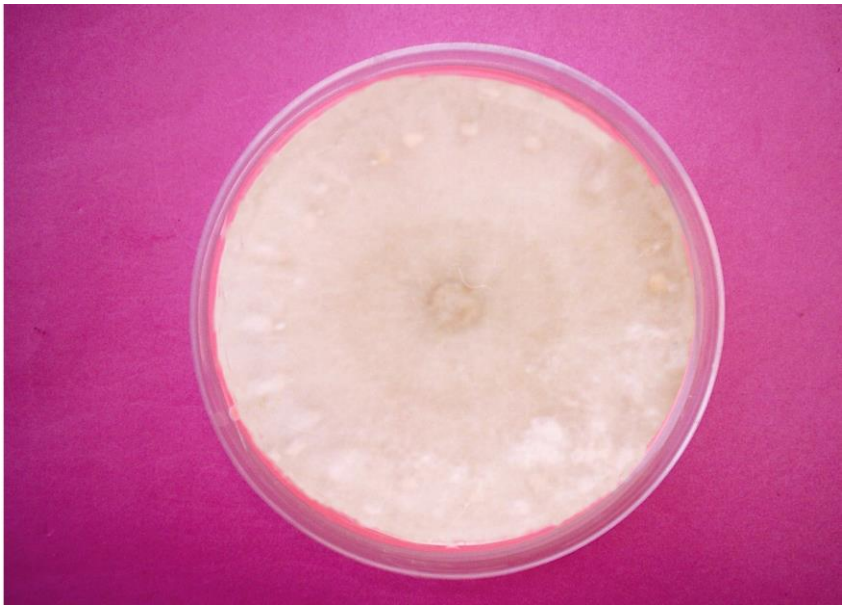
شكل رقم (٥): تأثير درجات الحرارة في معدلات نمو الفطر *Rhizoctonia solani* النامي في وسط PDA عند الأرقام الهيدروجينية (أ) pH ٤ و (ب) pH ٦ و (ج) pH ٨ وبواقع ثلاثة مكررات



شكل رقم (٦): تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر *Rhizoctonia solani* النامي في وسط PDA عند درجات حرارة (أ) ١٥م و(ب) ٢٥م و(ج) ٣٥م وبواقع ثلاثة مكررات



أ



ب

صور (١): تأثير الفطر *R. solani* في نسبة أنبات بذور الطماطة في وسط PDA بعد مدة حضن سبعة ايام بدرجة حرارة ٢٥ م (أ) سيطرة، (ب) بذور الطماطة المعاملة بالفطر الممرض

٤-٣ تأثير بعض العوامل البيئية في نمو الفطر *T. harzianum*

٤-٣-١ درجة الحرارة

أظهرت نتائج التجربة (شكل ٧-أ) حصول زيادة معنوية (<٠.٠٥) في معدلات نمو الفطر *T. harzianum* النامي في وسط الـ PDA برقم هيدروجيني ٤ وعند المستويات

الحرارية ١٥ و ٢٥ و ٣٥ م بزيادة مدة الحضن بلغت أقصاها عند درجة الحرارة ٢٥ و ٣٥ م إذ غطت مستعمرات الفطر مساحة الطبق بالكامل في اليوم الثالث من الحضن عند كلتا الدرجتين الحراريتين بينما لم يتمكن الفطر من تغطية المساحة الكلية للطبق إلا في اليوم الخامس من الحضن عند درجة حرارة ١٥ م.

وبين الشكل (٧-ب) وجود فروقات معنوية (<٠.٠٥) في معدلات نمو الفطر مابين درجات الحرارة المختلفة ١٥ و٢٥ و٣٥ م طيلة مدة التجربة وأظهرت درجة الحرارة ٢٥م زيادة معنوية كبيرة في معدلات النمو مقارنة بدرجتي الحرارة ١٥ و ٣٥م إذ غطى الفطر مساحة الطبق بالكامل في اليوم الثالث من الحضن بينما تباطأت معدلات النمو بصورة كبيرة عند درجتي الحرارة ١٥ و٣٥م إذ لم يغطِ الفطر كامل مساحة الطبق في نهاية مدة التجربة عند كلتا الدرجتين الحراريتين وبدى ذلك أكثر وضوحاً عند درجة حرارة ٣٥ م إذ بلغ قطر المستعمرة الفطرية ٤٥ ملم في نهاية مدة الحضن.

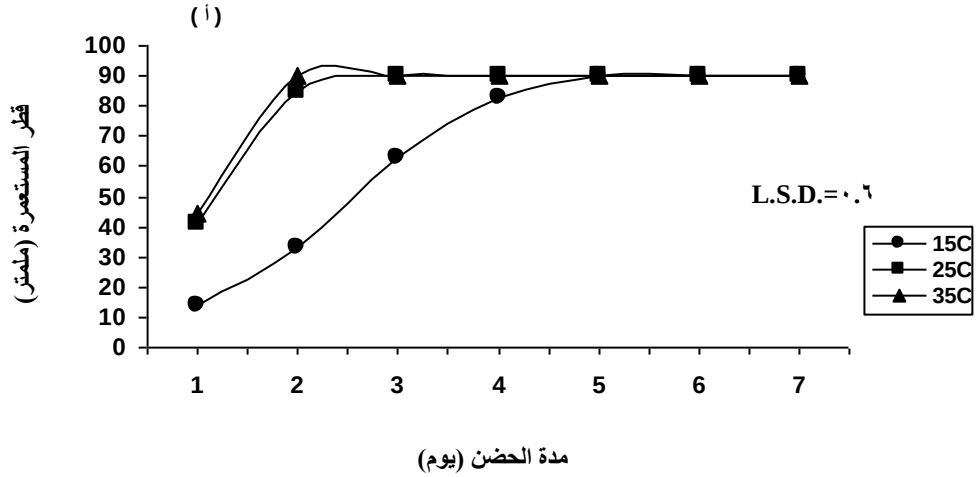
وعند إجراء التجربة نفسها عند الرقم الهيدروجيني ٨ (شكل ٧-ج) لوحظ حصول تباطؤ كبير في سرعة النمو وعلى جميع المستويات الحرارية (١٥ و٢٥ و٣٥) م على الرغم من الزيادة المعنوية في معدلات النمو إذ لم تشغل مستعمرات الفطر سوى أقل من نصف مساحة الطبق في نهاية مدة الحضن إذ يبين الشكل حدوث تشابه كبير في معدلات النمو عند درجتي الحرارة ٢٥ و٣٥ م إذ لم تظهر فروقات معنوية بينهما طيلة مدة التجربة باستثناء اليوم الثاني والخامس من الحضن إذ سجلت فروقات معنوية بينهما (<٠.٠٥). أما معدلات نمو الفطر في درجة حرارة ١٥ م فقد انخفضت معنوياً عن مثيلاتها في درجتي الحرارة ٢٥ و٣٥ م إذ بلغ قطر المستعمرة الفطرية ٢٥ ملم في نهاية مدة التجربة

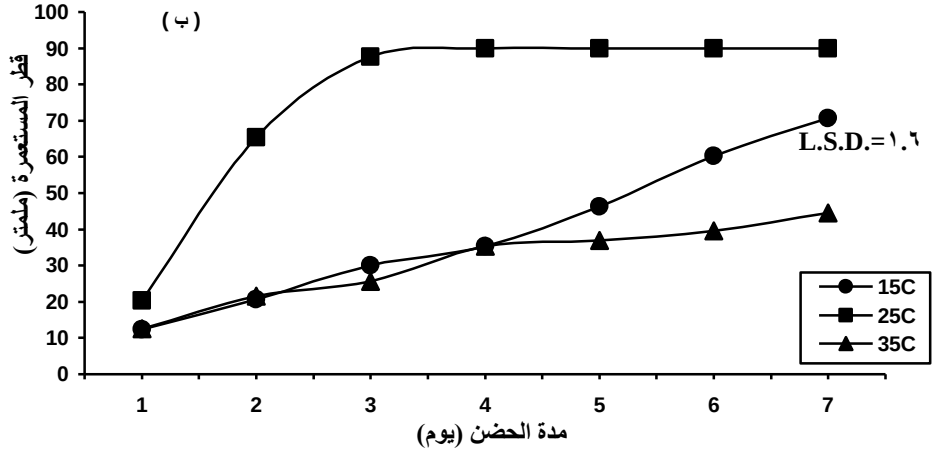
٤-٣-٢ الرقم الهيدروجيني

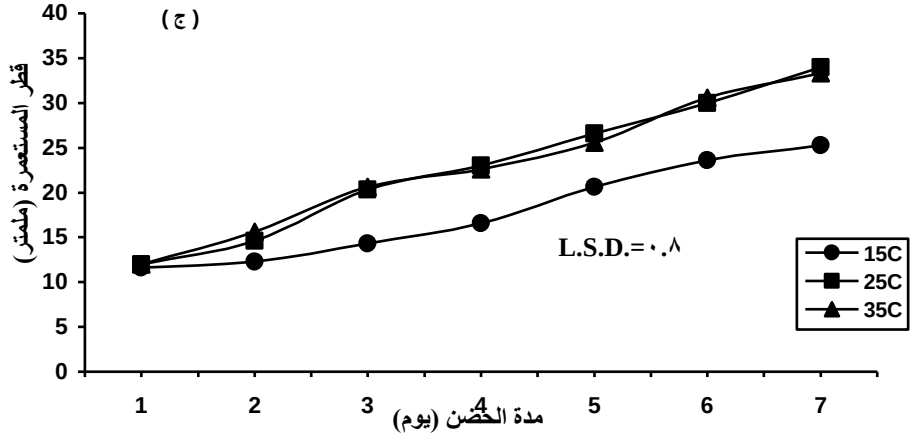
أظهرت نتائج تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر *T. harzianum* (شكل ٨-أ) وجود فروقات معنوية (<٠.٠٥) في معدلات نمو الفطر في الأرقام الهيدروجينية ٤ و٦ و٨ عند درجة حرارة ١٥ م طيلة مدة التجربة وازدادت معدلات النمو بصورة كبيرة عند الرقم الهيدروجيني ٤ مقارنة ببقية الأرقام الهيدروجينية إذ غطى الفطر مساحة الطبق بالكامل في اليوم الخامس من الحضن بينما لم يغطِ الفطر سوى ٧٨% من المساحة الكلية للطبق في نهاية مدة الحضن عند الرقم الهيدروجيني ٦ وأظهر الرقم الهيدروجيني ٨ تباطؤاً شديداً في سرعة نمو الفطر مقارنة بغيره من الأرقام الهيدروجينية على الرغم من الزيادة المعنوية في معدلات النمو (<٠.٠٥) إذ لم يغطِ الفطر سوى ٢٨% من مساحة الطبق في نهاية مدة الحضن وبين الشكل (٨-ب) حصول زيادة معنوية كبيرة (<٠.٠٥) في معدلات النمو عند الأرقام الهيدروجينية ٤ و٦ مقارنة بالرقم الهيدروجيني ٨ إذ غطى الفطر مساحة الطبق بالكامل في اليوم الثالث من الحضن

عند كلا الرقمين الهيدروجينيين أما بالنسبة للرقم الهيدروجيني ٨ فبالرغم من الزيادة المعنوية في معدلات النمو إلا أن نمو الفطر كان بطيئاً جداً طيلة مدة التجربة مقارنة ببقية الأرقام الهيدروجيني إذ لم يغطِ الفطر سوى ٣٧% من مساحة الطبق في نهاية مدة الحضن.

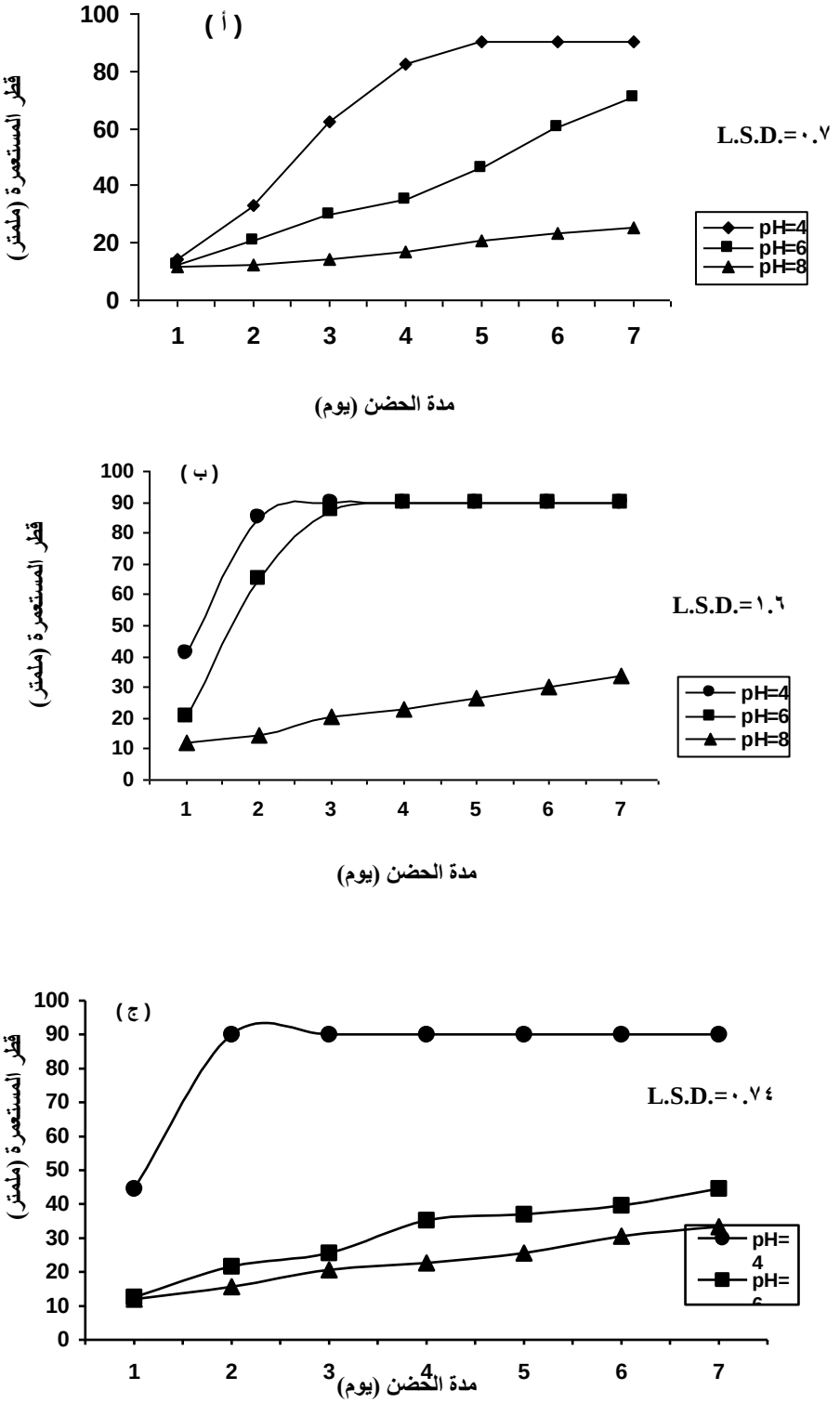
وبتكرار التجربة نفسها في درجة حرارة ٣٥ م (شكل ٨-ج) ظهر فرق معنوي كبير (<٠.٠٥) مابين معدلات النمو عند الرقم الهيدروجيني ٤ وبقية الأرقام الهيدروجينية على الرغم من وجود فروقات معنوية مابين الرقمين الهيدروجينيين ٦ و٨ ولوحظ بأن سرعة النمو كانت كبيرة عند الرقم الهيدروجيني ٤ فقد غطى الفطر تقريباً مساحة الطبق بالكامل تقريباً في اليوم الثاني من الحضن في حين تباطأت سرعة نمو الفطر بصورة كبيرة عند الرقمين الهيدروجينيين ٦ و٨ إذ لم يغطِ الفطر سوى أقل من نصف المساحة الكلية للطبق في نهاية مدة التجربة فقد بلغت أقطار المستعمرات ٤٥ ملم و ٣٣ ملم عند الرقمين الهيدروجينيين ٦ و٨ على التوالي في نهاية مدة الحضن.







شكل رقم (٧): تأثير درجات الحرارة في معدلات نمو الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط PDA عند الأرقام الهيدروجينية (أ) pH ٤ و (ب) pH ٦ و (ج) pH ٨ وبواقع ثلاثة مكررات



شكل رقم (٨): تأثير الرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط PDA عند درجات حرارة (أ) ١٥ م و(ب) ٢٥ م و(ج) ٣٥ م وبواقع ثلاثة مكررات

٤-٤ تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *R. solani*

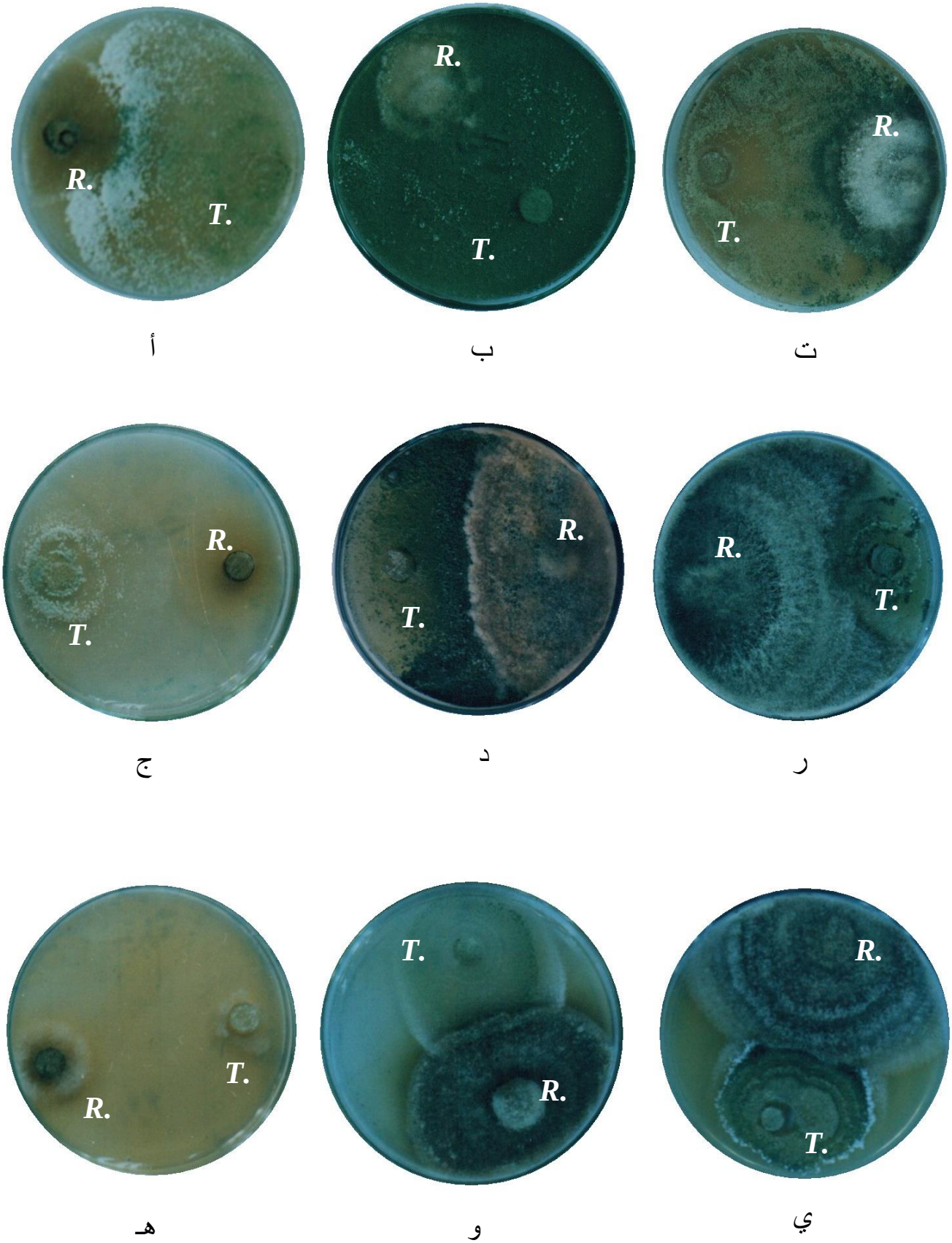
أظهرت نتائج التجربة (جدول ٤) حصول تباين واضح في القدرة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد الفطر الممرض *R. solani* بارتفاع وانخفاض درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني فقد أظهرت مستعمرات الفطر النامية في وسط الـ PDA كفاءة تضادية عالية عند الرقم الهيدروجيني ٤ باختلاف درجات الحرارة وصلت إلى أعلى مستوى لها عند درجة حرارة ٣٥ م تلتها درجتي الحرارة ١٥ و ٢٥ م إذ تماثل تأثيرهما بصورة كبيرة على الكفاءة التضادية للفطر.

وتباين تأثير الرقم الهيدروجيني ٦ في مستوى كفاءة التضاد في الحد من نمو الفطر الممرض باختلاف درجات الحرارة فقد أظهرت درجة الحرارة ٢٥ م تأثيراً كبيراً في زيادة الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* في حين لوحظ انخفاض مستوى الكفاءة التضادية عند درجة حرارة ١٥ م وازداد ذلك وضوحاً عند درجة حرارة ٣٥ م.

أما بالنسبة للرقم الهيدروجيني ٨ فقد كان له دور كبير في تقليل كفاءة فطر التضاد في الحد من نمو الفطر الممرض عند درجات الحرارة كافة وكان هذا التأثير أكثر وضوحاً عند درجة حرارة ١٥ م التي أظهرت في الوقت نفسه تأثيراً كبيراً في الحد من نمو الفطر الممرض في وسط الـ PDA، (صورة ٢).

جدول (٤): تأثير درجات الحرارة والارقام الهايدروجينية في الكفاءة التضادية للفطر *T. harzinum* ضد الفطر *R. solani* في وسط الـ PDA بعد مدة حضانة سبعة أيام

الرقم الهيدروجيني pH	ظروف الحضن Temperature	درجة التضاد
٤	١٥ C^o	١.٤
	٢٥ C^o	١.٤٥
	٣٥ C^o	١.٢٦
٦	١٥ C^o	٢.٤
	٢٥ C^o	١.٣
	٣٥ C^o	٢.٨
٨	١٥ C^o	٣.٩٦
	٢٥ C^o	٢.٩
	٣٥ C^o	٣.٢٦



صورة (٢): تأثير الفطر *T. harzianum* في نمو اسحر *R. solani* بعد مدة حضن سبب- ايام في وسط PDA عند : أ- ٤ pH و ١٥ م°، ب- ٤ pH و ٢٥ م°، ت- ٤ pH و ٣٥ م°، ج- ٦ pH و ١٥ م°، د- ٦ pH و ٢٥ م°، ر- ٦ pH و ٣٥ م°، هـ - ٨ pH و ١٥ م°، و- ٨ pH و ٢٥ م°، ي- ٨ pH و ٣٥ م°

٤-٥ استخلاص الكايتين

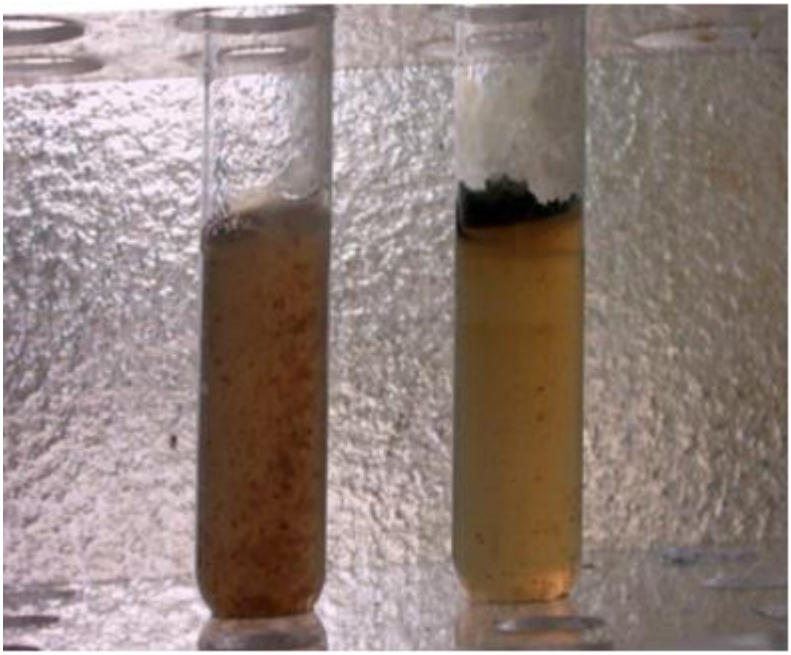
تم استخلاص ٤غم من الكايتين من مجموع ٢٠غم من قشور الروبيان *Metapenaeus affinis* المجففة (د. مالك حسن/ مركز علوم البحار/ جامعة البصرة) أي أن نسبة الكايتين في القشور الجافة كانت تساوي ٢٠%.

٤-٦ الكشف عن إنتاج إنزيم الكايتنيز

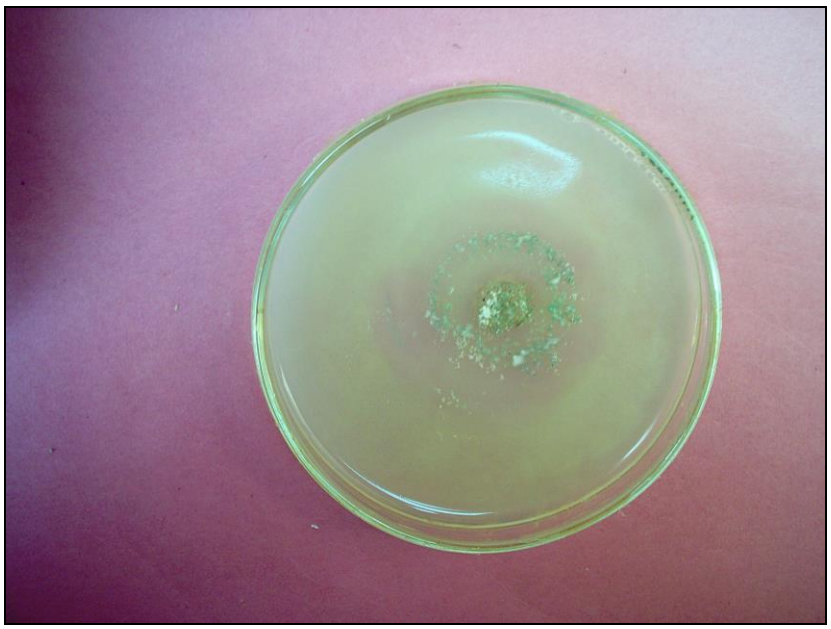
أظهرت نتائج الكشف عن إنتاج إنزيم الكايتنيز ظهور منطقة إراقة (تحلل) أسفل قرص الفطر *T. harzianum* عمقها ١٠ملم (صورة ٣) بعد مرور ١٤ يوماً من الحضن بدرجة حرارة ٢٨م في وسط الكايتين الغروي، وعلى هذا الأساس تم تصنيف عزلة الفطر بأنها متوسطة الفعالية.

٤-٧ الكشف عن إنتاج إنزيم البروتييز

أظهرت نتيجة الكشف عن إنتاج إنزيم البروتينز ظهور هالة شفافة تماماً قطرها ٨ سم حول مستعمرة الفطر *Trichoderma harzianum* النامية في وسط أكار الحليب Milk Agar بعد مرور ثلاثة أيام من الحضن بدرجة حرارة ٢٥م دلالة على تحلل الكازائين نتيجة لإفراز الفطر لإنزيم البروتييز، (صورة ٤).



صورة (٣): تحلل الكايتين بفعل الفطر *T. harzianum* في وسط الكايتين الغروي بدرجة حرارة ٢٨ م لمدة ١٤ يوم



صورة (٤): تحلل البروتين بفعل الفطر *T. harzianum* في وسط Skim milk في درجة حرارة ٢٥ م لمدة ٤٨ ساعة

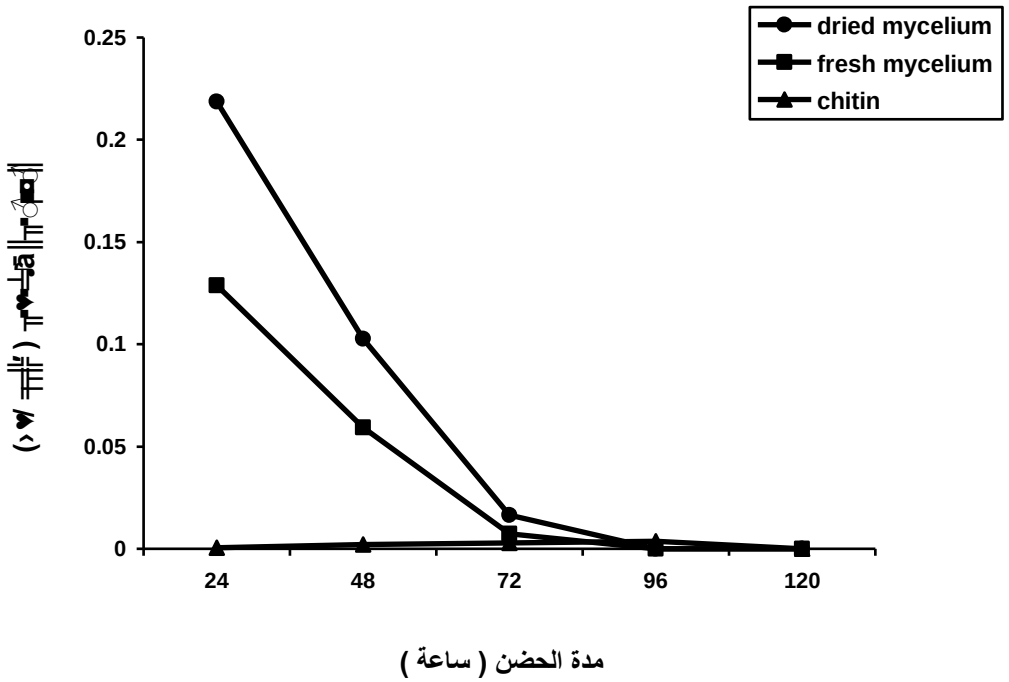
٤-٨ تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز

٤-٨-١ نوع المصدر الكربوني

أظهرت نتائج دراسة تأثير المصدر الكربوني (١٪) (شكل ٩) في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* المنمى في وسط الـ MSM في درجة حرارة ٣٠م وعند الرقم الهيدروجيني ٦ إن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان باستعمال الغزل الفطري الجاف كمصدر وحيد للكربون إذ بلغت الفعالية الإنزيمية للكايتنيز ٠.٢١٨٧ وحدة/مل بعد ٢٤ ساعة من الحضن في حين بلغت تلك الفعالية باستعمال الغزل الفطري الطري ٠.١٢٨٨ وحدة/مل، وكانت الفعالية الإنزيمية ٠.٠٠٣٦٨ وحدة/مل عند استعمال الكايتين المستخلص من قشور الروبيان كمصدر وحيد للكربون بعد مدة حضن ٩٦ ساعة.

٤-٨-٢ مدة الحضن

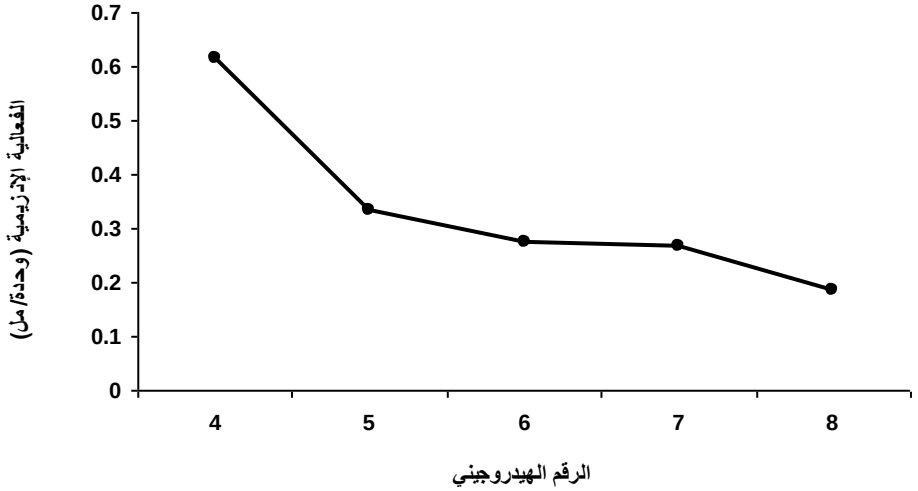
أظهرت النتائج (شكل ٩) تباين مدة الحضن المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* حسب نوع المصدر الكربوني المستعمل فقد سجل أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم باستعمال الغزل الفطري الطري والجاف بعد مرور ٢٤ ساعة من الحضن في وسط MSM بدرجة حرارة ٣٠م عند الرقم الهيدروجيني ٦ مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها ٠.١٢٨٨ و٠.٢١٨ على التوالي في حين استمر إنتاج إنزيم الكايتنيز بالتزايد وبقيم ضئيلة حتى بلغ أعلى مستوى له بعد مرور ٩٦ ساعة باستعمال الكايتين المستخلص من قشور الروبيان كمصدر وحيد للكاربون إذ بلغت الفعالية الإنزيمية ٠.٠٠٣٦٨.



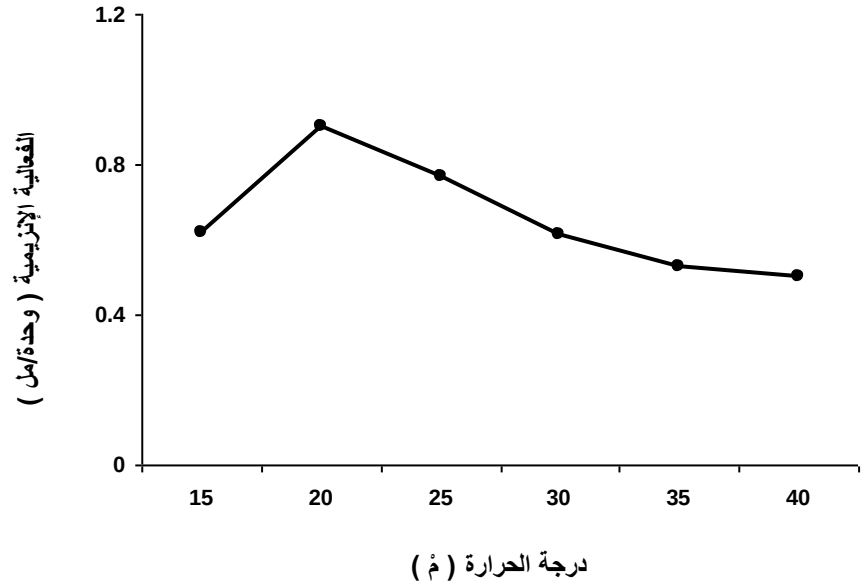
شكل رقم (٩): تأثير مدة الحضن ونوع المصدر الكربوني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM (برقم هيدروجيني ٦) وبدرجة حرارة ٣٠ م مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاثة مكررات

٤-٨-٣ الرقم الهيدروجيني

تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط الـ MSM الحاوي على الغزل الفطري الجاف (١٪) كمصدر وحيد للكربون وبعد مدة حضن ٢٤ ساعة ظهر أن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم يقع عند الرقم الهيدروجيني ٤ إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده ٠.٦١٥٥ وحدة/مل في حين انخفض مستوى إنتاج الإنزيم بزيادة قيمة الرقم الهيدروجيني وصولاً إلى الرقم الهيدروجيني ٨ إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده ٠.١٨٥٣ وحدة/مل (شكل ١٠).



شكل رقم (١٠): تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١٪ كمصدر وحيد للكربون وبدرجة حرارة ٣٠ م بعد مدة حضانة ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاثة مكررات



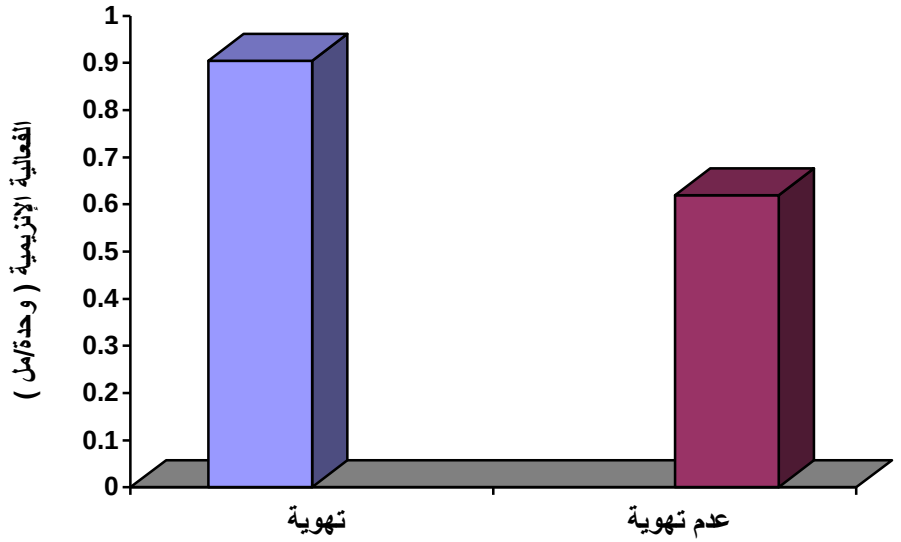
شكل رقم (١١): تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM برقم هيدروجيني ٤ الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١٪ كمصدر وحيد للكربون بعد مدة حضن ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبواقع ثلاثة مكررات

٤-٨-٤ درجة الحرارة

أظهرت نتائج دراسة تأثير درجة الحرارة في مستوى إنتاج إنزيم الكايتنيز (شكل ١١) من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط الـ MSM برقم هيدروجيني ٤ والحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة ١٪ وبعد مدة حضانة ٢٤ ساعة مع المزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة إن أفضل درجة حرارة لإنتاج الإنزيم هي ٢٠ م إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها ٠.٩٠٣٩٥ وحدة/مل وانخفضت الفعالية الإنزيمية بزيادة درجة الحرارة ووصلت أدنى مستوى لها عند درجة حرارة ٤٠ م إذ بلغت قيمة الفعالية الإنزيمية عندها ٠.٤٩٩٥ وحدة/مل، كما انخفضت الفعالية الإنزيمية عند درجة حرارة ١٥ م إذ بلغت قيمتها ٠.٦١٨٦ وحدة/مل.

٤-٨-٥ التهوية

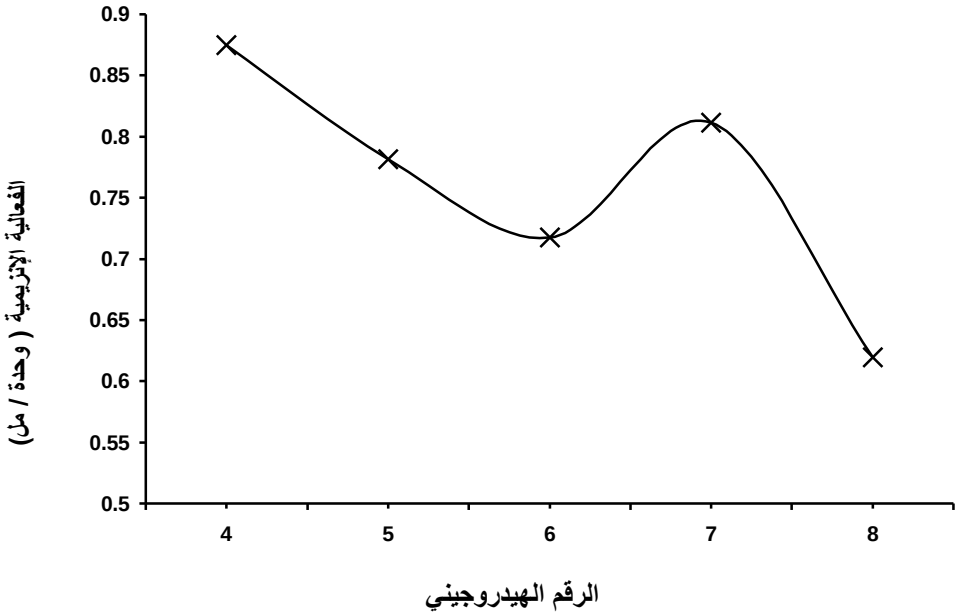
تم دراسة تأثير التهوية والمزج في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط الـ MSM برقم هيدروجيني ٤ والحاوي على الغزل الفطري الجاف (١٪) وفي درجة حرارة ٢٠م وبعد مدة حضن ٢٤ ساعة إذ أظهرت النتائج بأن التهوية والمزج باستعمال الحاضنة الهزازة بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة هي الأفضل في إنتاج الإنزيم مقارنة مع ظرف عدم التهوية (شكل ١٢) إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عند ظروف التهوية والمزج ٠.٩٠٣٩٥ وحدة/مل في حين بلغت قيمتها عند انعدام التهوية ٠.٦١٨٩٧ وحدة/مل.



شكل رقم (١٢): تأثير عامل التهوية والمزج في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط MSM بدرجة حرارة ٢٠م لمدة ٢٤ ساعة وبواقع ثلاثة مكررات

٤-٩ الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم الخام

أظهرت نتائج التحري عن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم الخام تجاه ركيزة الكايتين الغروي بأرقام هيدروجينية تراوحت ما بين ٤ – ٨ إن أعلى مستوى لفعالية الإنزيم ظهر عند الرقم الهيدروجيني ٤ إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده ٠.٨٧٥ وحدة/مل تلاه الرقم الهيدروجيني ٧ الذي بلغت عنده الفعالية الإنزيمية ٠.٨١١٢ وحدة/مل ويشير الشكل (١٣) إلى أن الفعالية الإنزيمية للراشح الإنزيمي الخام وصلت إلى أدنى مستوى لها عند الرقم الهيدروجيني ٨ إذ بلغت ٠.٦١٩٤٦ وحدة/مل.



شكل (١٣) تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الراشح الإنزيمي الخام للكايتنيز

٤-١٠ الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم الخام

أظهرت نتائج دراسة ثباتية إنزيم الكايتنيز الخام تجاه الأرقام الهيدروجينية المختلفة (٤-٨) بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم الخام يتراوح مابين ٤-٧ إذ احتفظ الإنزيم بـ ٩٠٪ من فعاليته بعد خزنه لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ م في الأرقام الهيدروجينية ٤ و ٧.

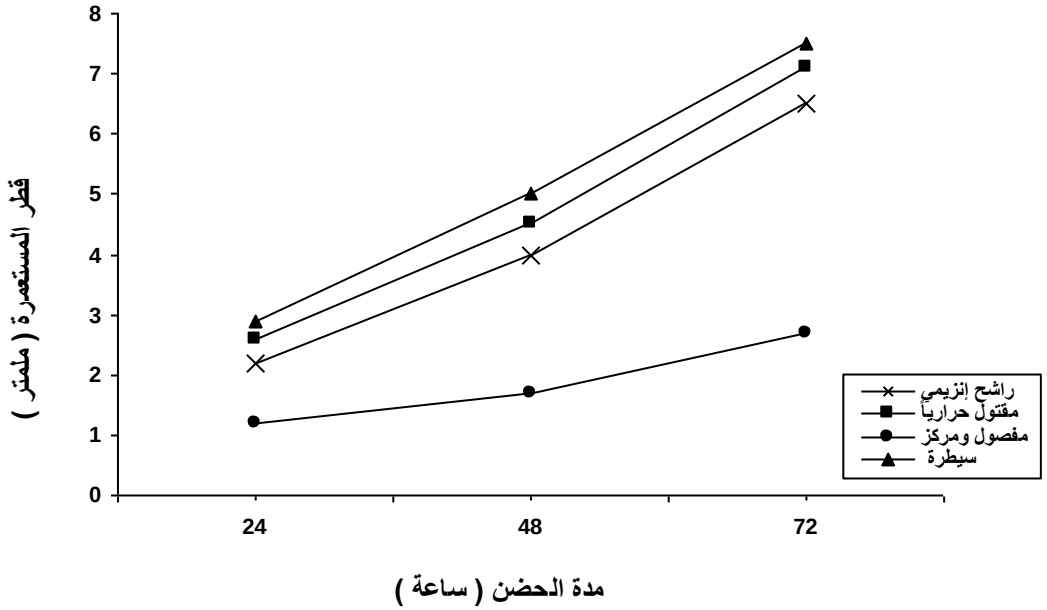
٤-١١ تأثير معاملات الراشح الإنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في معدلات نمو الفطر *R. solani*

بينت نتائج تأثير المعاملات للراشح الأنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في نمو الفطر *R. solani* وعند الرقم الهيدروجيني ٤ (شكل ١٤-أ) انخفاضاً كبيراً في معدلات نمو الفطر الممرض بعد المعاملة بالراشح الانزيمي المفصول والمركز بالاسيتون بنسبة ١٠٪ مقارنة ببقية المعاملات اذ بلغت نسبة التثبيط ٦٤% بينما وصلت نسبة التثبيط باستعمال الراشح الانزيمي الخام الى ١٣% وسجلت المعاملة بالراشح الانزيمي المعامل حرارياً اقل نسبة في تثبيط نمو الفطر الممرض إذ بلغت ٨%.

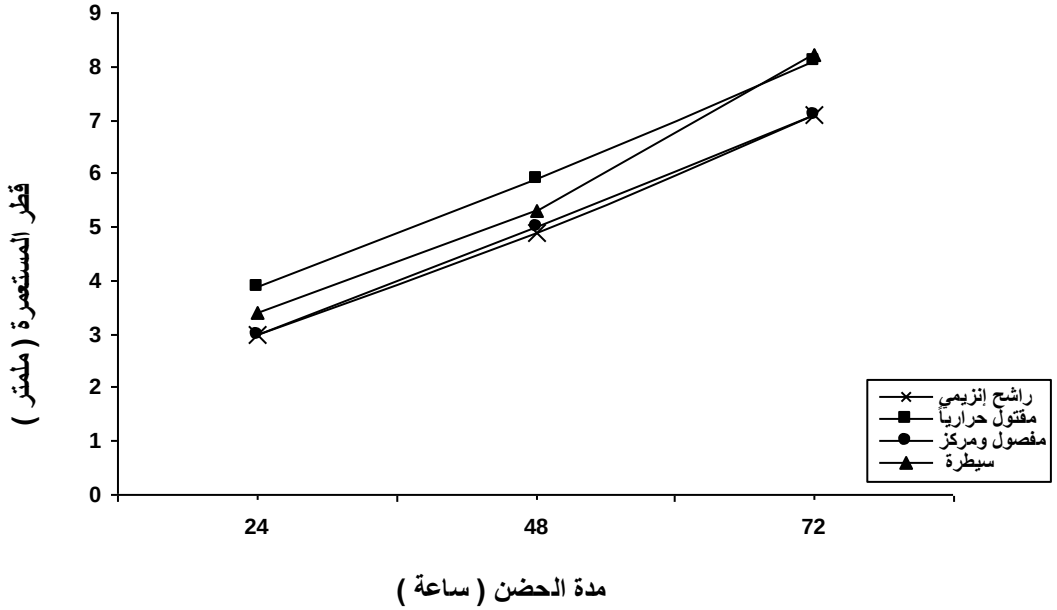
أما بالنسبة للرقم الهيدروجيني ٧ فقد تساوت نسبة التثبيط باستعمال الراشح الإنزيمي المفصول والمركز بالاسيتون مع المعاملة بالراشح الإنزيمي الخام وبلغت ١٣% وانخفضت إلى ١.٢% باستعمال الراشح الإنزيمي المعامل حرارياً (شكل ١٤-ب).

وبمقارنة نسب التثبيط عند كلا الرقمين الهيدروجينيين لوحظ تفوق المعاملة بالراشح المفصول والمركز بالاسيتون عند الرقم الهيدروجيني ٤ مقارنة ببقية المعاملات، (صورة ٥) في

حين تساوت نسبة التثبيط باستعمال الراشح الإنزيمي الخام عند كلا الرقمين الهيدروجينيين اذ بلغت ١٣٪ وأعطت المعاملة بالراشح الإنزيمي المعامل حرارياً اقل نسبة في تثبيط نمو الفطر الممرض عند كلا الرقمين الهيدروجينيين. وقد بلغت أدناها عند الرقم الهيدروجيني ٧.



أ



ب

شكل رقم (١٤): تأثير المعاملات للراشح الإنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في معدلات نمو الفطر *R. solani* النامي في وسط الـ PDA بدرجة حرارة ٢٥م (أ): برقم هيدروجيني ٤ (ب): برقم هيدروجيني ٧ وبواقع ثلاثة مكررات

أ

ب

صورة (٥): تأثير الراشح الخام لأنزيم الكايتينيز المفصول والمركز بالأسيتون للفطر *T. harzianum* في نمو الفطر *R. solani* بعد مدة حضن ثلاثة ايام في وسط PDA برقم هيدروجيني ٤ ودرجة حرارة ٢٠ م ، (أ) السيطرة، (ب) المعاملة

٥-١ المناقشة Discussion

إن الاهتمام المتزايد حول موضوع السيطرة الحيوية كونها إحدى الوسائل المتكاملة مع المبيدات الكيمياوية كثف الجهود في هذه الدراسة نحو تفسير بعض آلياتها والوقوف على تأثير بعض العوامل البيئية فيها من خلال استعمال عامل المكافحة الحيوية الفطر *Trichoderma harzianum* ضد الفطر الممرض *Rhizoctnia solani* المسبب لمرض سقوط البادرات وعلى مدى واسع من العوائل النباتية (Montealegre, ٢٠٠٣). ومن الجدير بالذكر بأن الدراسة قد اقتصرت على الجانب المختبري لتعذر العمل في الحقل والبيوت الزجاجية. تبين من الدراسة الحالية أن لعامل الحرارة دوراً مهماً في التأثير في نمو الفطر *R. solani* فقد أظهر الفطر مستويات مختلفة من النمو في درجات الحرارة ١٥ و٢٥ و٣٥م باختلاف الأرقام الهيدروجينية إلا أن نموه الأمثل كان عند درجتي الحرارة ٢٥ و٣٥م في حين انخفضت معدلات النمو بصورة كبيرة في درجة حرارة ١٥م. إن هذه النتائج جاءت متوافقة مع ما ذكره (عباس، ١٩٩٨) من أن المدى الحراري الأمثل لنمو العزلات المرضية للفطر *R. solani* تراوح مابين (٢٥ – ٣٥) م وأن الانخفاض في معدلات النمو كان واضحاً في درجة حرارة ١٥م. كما تتفق أيضاً مع ما أشار إليه (Mazzola *et al.*, ١٩٩٦) إلى أن العزلات المرضية للفطر المأخوذة من نبات حنطة مصاب غطت مساحة الطبق بالكامل بعد مرور أربعة أيام من الحضن في درجة حرارة ٢٥م وفي المقابل ذكر (تكسانة، ١٩٨٣) بأن العزلات الممرضة من الفطر لم تتمكن من النمو عند درجة حرارة ٣٥م وقد يرجع سبب هذا الاختلاف في النتائج إلى نوع العزلة والمنطقة التي أخذت منها وظروف التجربة.

تتحدد درجات الحرارة المثلى لنمو الأحياء المجهرية بمدى تأثر جميع تفاعلات الخلية التي تشترك فيها الإنزيمات وأن الانخفاض السريع في معدلات النمو عند رفع درجة الحرارة أكثر من المثلى ربما ناتج عن الخلل الذي يحدث في عمل هذه الإنزيمات ويشار إلى الدرجة الحرارية الدنيا للنمو بأنها الدرجة التي بعدها يتوقف فيها عبور المواد المذابة في الوسط خلال الغشاء السايتوبلازمي (السعد، ١٩٩٠ ;Tanner, ١٩٩٧).

أما بالنسبة لتأثير الرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *R. solani* فقد تبين بأن الرقم الهيدروجيني ٦ هو الأمثل للنمو باختلاف درجات الحرارة يليه الرقم الهيدروجيني ٤ بينما انخفضت معدلات النمو عند الرقم الهيدروجيني ٨ مقارنة ببقية الأرقام الهيدروجينية وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ذكره (تكسانة، ١٩٨٣) من أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو العزلات الممرضة وغير الممرضة للفطر *R. solani* تراوح مابين ٥-٦ ويشار إلى أن هذا

المدى من الرقم الهيدروجيني هو الأمثل لنمو الفطر في التربة (Agrios, ١٩٩٧; Nelson *et al.*, ١٩٩٦).

بالرغم من التغيرات الحاصلة في المحيط (الوسط) الذي ينمو فيه الفطر إلا أن سايتوبلازم الخلية يبقى محافظاً على نسبته من أيونات الهيدروجين والهيدروكسيل وذلك لأن الغشاء البلازمي يعد غير ناضح نسبياً لهذه الأيونات إلا أن الإنزيمات الموجودة في الغشاء السايتوبلازمي نفسه تتأثر بتركيز أيون الهيدروجين مما يؤدي إلى تأثر الفعاليات الأخرى التي من أبرزها ألفة هذه الإنزيمات الموجودة في الغشاء للمواد المذابة في الوسط (السعد، ١٩٩٠) وبهدف استكمال بعض جوانب الموضوع تم دراسة تأثير درجات الحرارة والرقم الهيدروجيني في معدلات نمو الفطر المسيطر *T. harzianum* وقد تبين من النتائج بأن الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر كانت ٢٥م باختلاف الأرقام الهيدروجينية وانخفضت معدلات النمو بصورة ملحوظة عند درجتي الحرارة ١٥ و٣٥م عند جميع الأرقام الهيدروجينية باستثناء الرقم الهيدروجيني ٤ الذي أظهر زيادة كبيرة في معدلات النمو عند كلتا الدرجتين الحراريتين.

إن هذه النتائج جاءت مقاربة لما ذكره (Domsch *et al.*, ١٩٨٠) الذي أشار إلى أن الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر *T. harzianum* كانت ٣٠م وأن أقصى درجة حرارية للنمو هي ٣٦م. كما أشار بعض الباحثين إلى أن الفطر المذكور يعد من الفطريات التي تنمو في درجات حرارية معتدلة وينخفض معدل نموه ونشاطه بارتفاع وانخفاض درجات الحرارة عند الحدود الدنيا والعليا (Kucuk and Kivanc, ٢٠٠٣). وتشير إحدى الدراسات إلى أن عدداً قليلاً جداً من سلالات الفطر *T. harzianum* قادرة على النمو في درجات الحرارة المنخفضة على الأوساط Yeast extract Aagar, minimal media (Kredics *et al.*, ٢٠٠٣).

وبالنسبة لتأثير الرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *T. harzianum* فقد ظهر بأن معدلات نمو الفطر قد ازدادت بصورة كبيرة عند الرقم الهيدروجيني ٤ باختلاف درجات الحرارة والسبب في ذلك قد يعود إلى تأثير حموضة الوسط في تأين المركبات الموجودة فيه ودرجة ارتباطها بالإنزيمات الموجودة في الغشاء البلازمي للفطر وكذلك تأثيرها في فعالية ونشاط هذه الإنزيمات وباقي إنزيمات الفطر ومن ثم زيادة سرعة العمليات الحيوية المرتبطة بها التي من أبرزها سرعة تكوين الأبواغ وسرعة إنباتها في الوسط (Tanner, ١٩٩٧; Morra, ١٩٩٧).

وتباين تأثير الرقم الهيدروجيني ٦ في معدلات نمو الفطر باختلاف درجات الحرارة فقد أظهرت درجة الحرارة ٢٥م تأثيراً كبيراً في زيادة معدلات النمو بينما انخفض مستوى النمو في درجة حرارة ١٥م وازداد الانخفاض وضوحاً عند درجة حرارة ٣٥م. أما بالنسبة للرقم الهيدروجيني ٨ الذي يعد غير ملائم لنمو أغلب الفطريات (Tanner, ١٩٩٧) كان له تأثير واضح في خفض معدلات النمو عند درجات الحرارة كافة. إن هذا المدى من التأثير للرقم

الهيدروجيني في نمو الفطر اتفق مع ما ذكره (Kredics *et al.*, ٢٠٠٣) في أن الفطر *T. harzianum* يمتلك القدرة على النمو في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني يتراوح مابين ٢ – ٦ وأن الرقم الهيدروجيني ٤ هو الأمثل لنمو الفطر.

إن تأثير العوامل البيئية في نمو الفطر *T. harzianum* انعكس على كفاءة الفطر في التضاد مع الفطر *R. solani* وذلك من خلال تأثيرها في سرعة نمو الفطر ونشاطه وسرعة تكوين الأبواغ الذي ينعكس على قدرته التنافسية وتطفله على الفطر الممرض أو من خلال افرازه للعديد من الانزيمات والمضادات الحياتية التي تسبب قتل خلايا المضيف أو تحد من نموه وانتشاره (Kucuk and Kivance, ٢٠٠٣; Kredics *et al.*, ٢٠٠٣) هذا فضلاً عن أن بعض العوامل البيئية الملائمة لنمو الفطر *T. harzianum* تكون في الوقت نفسه مثبطة لنمو الفطر الممرض (Hunter and Bodman, ٢٠٠٠).

اعتماداً على اختبار التضاد بوساطة الزرع المزدوج الذي اقترحه (Bell *et al.*, ١٩٨٢) فإن الدرجة ٢ تمثل أقل مستوى مقبول لتحديد قدرة الفطر *T. harzianum* في التضاد مع الفطر *R. solani* وأن زيادة هذه الدرجة عن ذلك يعكس ضعف القدرة التضادية للفطر مما يجعله غير مفيد في المكافحة الاحيائية لذلك وحسب هذا التصنيف تم حساب تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني على مستوى كفاءة الفطر التضادية ففي الرقم الهيدروجيني ٤ نلاحظ بأن الكفاءة التضادية للفطر كانت عالية باختلاف درجات الحرارة الذي كان في الوقت نفسه مشجعاً لنمو الفطر بينما تباين تأثير الرقم الهيدروجيني ٦ في كفاءة الفطر التضادية ضد الفطر الممرض باختلاف درجات الحرارة فقد أظهر الفطر قدرة تضادية عالية عند درجة حرارة ٢٥م بينما انخفضت كفاءته في درجات الحرارة ١٥ و٣٥م اللتان تعدان غير ملائمتين لنمو الفطر المسيطر. وأظهر الرقم الهيدروجيني ٨ تأثيراً كبيراً في خفض كفاءة الفطر التضادية الذي يعود بصورة كبيرة إلى كونه غير ملائم لنمو الفطر.

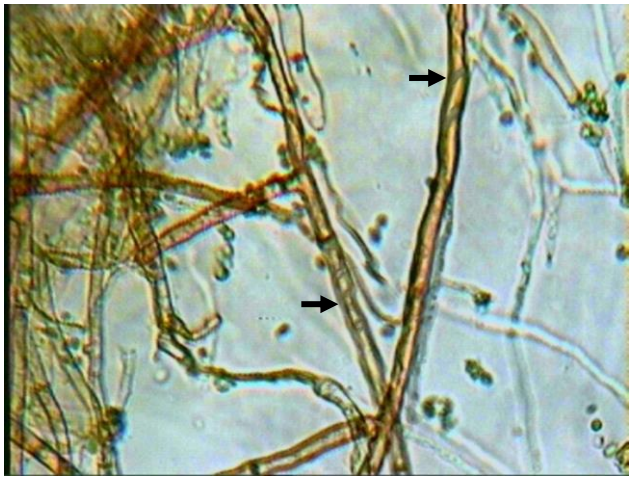
أشار حميد إلى أن بعض عزلات الفطر *T. harzianum* أظهرت درجة تضادية عالية ١.٢ ضد الفطر *R. solani* عند تنميتها في وسط PSA برقم هيدروجيني ٦ في درجة حرارة ٢٥م. أن معظم سلالات الفطر *Trichodeirma* تنمو في درجات حرارية معتدلة مما يقلل من فرص حماية البذور النابتة من الإصابة بالسلالات الفطرية الممرضة المقاومة لدرجات الحرارة المنخفضة خلال موسم الشتاء البارد والربيع (Kerdics, ٢٠٠٣). كما بين Hunter وBodman (٢٠٠٠) بأن أغلب الفطريات المستعملة في السيطرة الحيوية والتي من أبرزها الفطر *Trichoderma* حساسة لتأثير العوامل البيئية وأن أنسب الظروف البيئية للتضاد، هي عند درجة الحرارة ٢٥م ورقم الهيدروجيني يتراوح مابين ٦ – ٨.

يتجسد عمل الفطر *T. harzianum* في القضاء على الفطر *R. solani* من خلال العديد من الآليات التي أبرزها آليتي التنافس والتطفل. ظهر دور آلية التنافس من خلال سرعة نمو الفطر *T. harzianum* مقارنة بالفطر الممرض *R. solani* وهي ناتجة عن سرعة استهلاكه للمواد الغذائية الموجودة في الوسط PDA وازدادت هذه الآلية وضوحاً عند تنمية كلا الفطرين بصورة منفردة ومزدوجة تحت ظروف بيئية تعد أكثر ملائمة لنمو الفطر المسيطر.

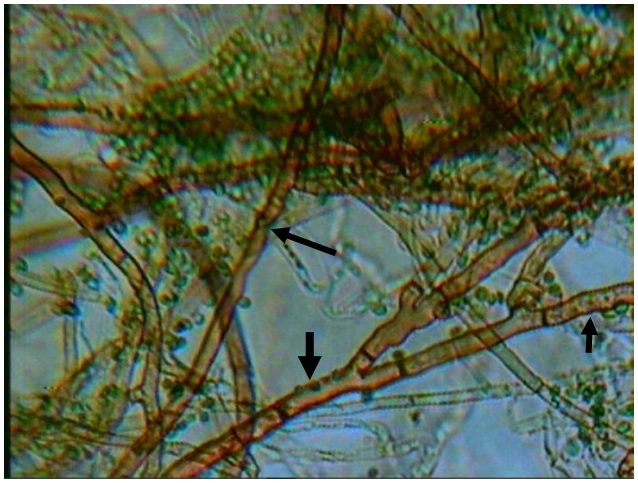
أما بالنسبة لآلية التطفل فقد تمثلت بالتفاف الفطر المسيطر على الغزل الفطري للمضيف *R. solani* وإنبات الإبواغ عليه وإحداث تشوهات في جدرانه وتحلل خلاياه نتيجة لإفراز الفطر *T. harzianum* للعديد من الإنزيمات والمضادات الحياتية (صورة ٦).

أ

ب



ج

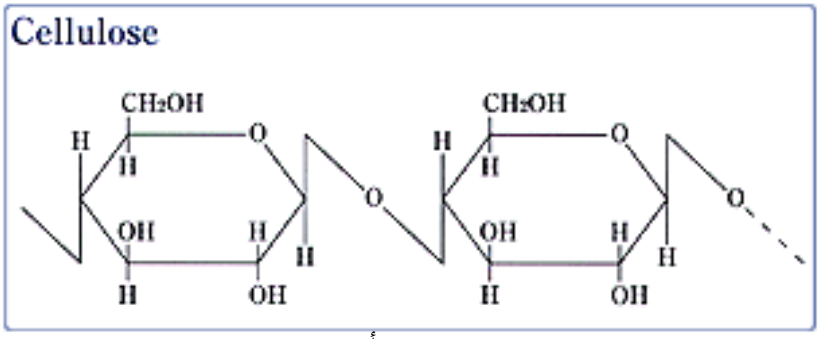


صورة (٦): تأثير الفطر المضاد *T. harzianum* في الصفات المظهرية للفطر الممرض *R. solani* :
أ- خيوط الفطر الممرض في معاملة السيطرة . ب- التفاف خيوط الفطر المضاد حول خيوط الفطر الممرض. ج- تشوه مظهر الخيوط الفطرية للفطر الممرض وتجمع ابواغ الفطر المضاد على خيوط الفطر الممرض، قوة التكبير ٤٠٠x

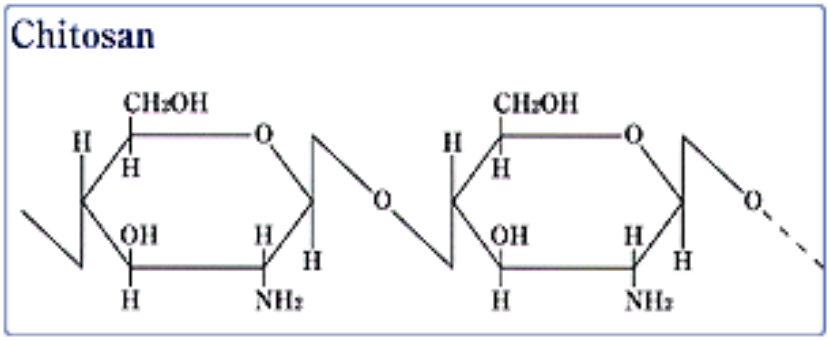
ومن خلال الكشوفات التي اجريت تبين بأن للفطر القدرة على إنتاج إنزيمي الكايتنيز والبروتييز وتعذر الكشف عن إنتاج إنزيم الكلوكانيز لعدم توفر المادة الأساس لعمل الإنزيم وهي اللامنارين هذا فضلاً عن أن المادة الأساس لعمل إنزيم الكايتنيز وهي الكايتين تم استخلاصها من قشور الروبيان المتوفرة في أسواق البصرة إذ تحتوي القشور الجافة للروبيان على كايتين بنسبة ١٤% - ٢٧% (Ashford *et al.*, ١٩٧٧) أو ١٧% (Naczk and Shaidi, ١٩٩٠) والذي يتواجد بصورة متكلسة في أنسجة هذا الحيوان.

وقد أجريت عدة خطوات لغرض استخلاص الكايتين بصورة نقية تضمنت إضافة مواد كيمياوية مختلفة مثل هيدروكسيد الصوديوم الذي أضيف لغرض إزالة البروتينات المرتبطة بالكايتين (deprotenization) ولكن بتراكيز غير عالية وذلك لأن التراكيز العالية تعمل على إزالة مجاميع الاستيل deacetylation الموجودة في الكايتين وتحويله إلى كيتوزان الذي هو عبارة عن كايتين حذفت منه مجموعة الاستيل (شكل ١٥) كما أضيف حامض الهيدروكلوريك بنسبة ١٣.٧٪ لغرض التخلص من الأملاح demineralization الموجودة مع الكايتين والتي من أبرزها كاربونات الكالسيوم وفوسفات الكالسيوم، أما بالنسبة للدهون والصبغات فقد تمت إزالتها بوساطة إضافة مذيبات عضوية ومادة قاصرة.

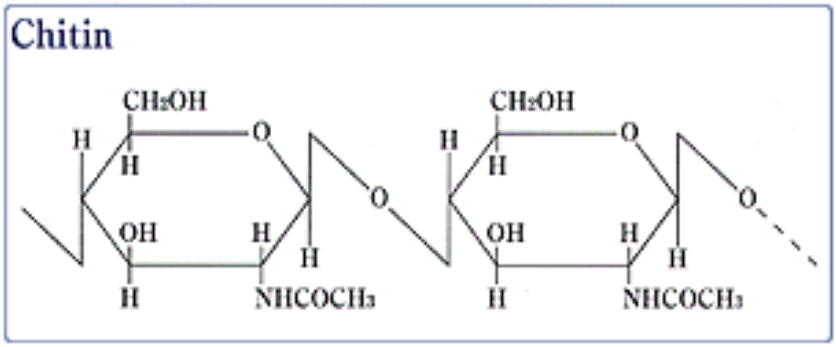
وعلى الرغم من شيوع استعمال هذه الطريقة في الاستخلاص إلا أنها لا تخلو من مساوئ وذلك لأن المادة الناتجة قد تكون غير عالية النقاوة إذ قد تعمل المواد الكيمياوية المضافة إلى حدوث إزالة للاستلة أو فقدان للبلمرة إذا أضيفت بتراكيز عالية (Gagne, ١٩٩٣).



أ



ب



ج

شكل (١٥): التركيب الكيميائي لكل من (أ) الكايتين، (ب) الكيتو زان، (ج) السليلوز حسب (Gagne, ١٩٩٣)

إن نسبة الكايتين الذي تم الحصول عليه من قشور الروبيان كانت ٢٠% وهي مقاربة لما ذكره (Naczk and Shahidi, ١٩٩٠; Ashford *et al*., ١٩٧٧) ومطابقة لما حصل عليه (Bemiller and Whistler, ١٩٦٢; Gagne, ١٩٩٣; الجراخ، ١٩٩٦).

استعمل الكايتين المستخلص من قشور الروبيان كمادة أساس لعمل إنزيم الكايتنيز في وسط إنتاج الإنزيم وكذلك استعمل بعد تحويله إلى كايتين غروي في وسط الكشف عن إنتاج الإنزيم وكركيزة لعمل الإنزيم في وسط التفاعل.

تناولت الدراسة إنزيم الكايتينز بصورة مفصلة لأنه يعد المفتاح الرئيس لتطفل الفطر على باقي الفطريات الممرضة التي تحوي في جدرانها على الكايتين (Emani *et al*., ٢٠٠٣) وذلك من خلال دراسة الظروف المثلى لإنتاجه بدلالة الفعالية الإنزيمية المقاسة بـ وحدة/مل في الساعة الواحدة. من بين الظروف التي تم دراسة تأثيرها في إنتاج الإنزيم هي نوع المصدر الكربوني المستعمل إذ تم استعمال ثلاثة مصادر كاربونية وهي الكايتين المستخلص من قشور الروبيان والغزل الفطري الطري والجاف للفطر *R. solani* اللذين تم تحضيرها حسب الطريقة المتبعة من قبل (El-Katatny *et al*., ٢٠٠٠) مع بعض التحويرات التي تمثلت باستعمال الاسيتون المبرد إلى ٢٠-مْ بدلاً عن جهاز التجفيد lypholyzer لتحويل الغزل الفطري الطري إلى مسحوق جاف وذلك لعدم توفر الجهاز المذكور ولكون الاسيتون المبرد إلى ٢٠- مْ يعمل بنفس مبدأ جهاز التجفيد وهو تجفيف مكونات الخلية أو البروتينات بوساطة استعمال مذيبات عضوية مع الثلج الجاف هذا فضلاً عن ذلك فإن الاسيتون المبرد إلى ٢٠- مْ يستعمل في كثير من الأحيان كبديل لجهاز التجفيد كإحدى الطرائق المستعملة في ترسيب البروتينات إذ يحافظ على طبيعة البروتينات والمركبات الأخرى الموجودة في العينة التي لا تذوب في الاسيتون، وتستكمل هذه الطريقة بتعريض العينة المعاملة بالاسيتون إلى مصدر تيار هواء بارد للإسراع في تبخير الاسيتون في ظروف باردة لضمان عدم تأثر العينة (Pohl, ١٩٩٠).

أظهرت النتائج بأن أعلى فعالية لانزيم الكايتنيز كانت باستعمال الغزل الفطري الجاف كمصدر وحيد للكربون يليه الغزل الفطري الطري فيما انخفضت الفعالية الإنزيمية للكايتنيز باستعمال الكايتين المستخلص من قشور الروبيان، إن هذه النتائج تعكس تواجد الكايتين في جدار الفطر *R. solani* كما تعكس دور إنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر *T. harzianum* في تحطيم جدار الفطر *R. solani*. إن الزيادة في مستوى إنتاج إنزيم الكايتنيز باستعمال الغزل الفطري الجاف كمصدر وحيد للكربون مقارنة بالغزل الفطري الطري ربما يعود إلى تأثير عملية التجفيف بالاسيتون في تركيز نسبة الكايتين الموجود في جدار الفطر مقارنة بالغزل الفطري الطري ومن ثم زيادة نسبة إنتاج الإنزيم أو قد يعود السبب في ذلك إلى إفراز الغزل الفطري الطري للفطر مركبات أيضية ضد الفطر *T. harzianum* تسببت في انخفاض مستوى إنتاج

الإنزيم مقارنة بالغزل الفطري الجاف (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠). إن انخفاض الفعالية الإنزيمية للكايتنيز باستعمال الكايتين المستخلص من قشور الروبيان ربما يعود إلى أن درجة نقاوة الكايتين المستخلص غير عالية وهذا يؤثر في ألفة الإنزيم تجاه المادة الأساس فقد أشار (Kubicek *et al.*, ٢٠٠١) إلى إن إنتاج إنزيم الكايتنيز ينخفض أو يتثبط في حالة استعمال الكايتين غير النقي كمصدر وحيد للكربون.

تباينت مدة الحضن المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز باختلاف نوع المصدر الكربوني المستعمل فقد ظهر بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان بعد مرور ٢٤ ساعة من الحضن في وسط MSM برقم هيدروجيني ٦ وفي درجة حرارة ٣٠م باستعمال الغزل الفطري الطري والجاف ثم أخذ مستواه بالانخفاض بعد مرور ٤٨ ساعة من الحضن. إن هذا الانخفاض قد يعود إلى سببين مهمين احدهما هو أن إنزيم الكايتنيز يعد من الإنزيمات التي تنتج بصورة مبكرة إذ يتم إفرازه في المراحل الأولى من التطفل (Kubicek *et al.*, ٢٠٠١; Donzelli and Harman, ٢٠٠١). أما السبب الآخر فيعود إلى أن مستوى إنتاج الإنزيم يقل بزيادة مدة الحضن نتيجة لعدة عوامل منها حصول تغيرات بيئية غير مرغوبة في وسط الإنتاج تؤثر في مستوى إنتاج الإنزيم وفعاليته ومنها أن إنزيم الكايتنيز يعد من الإنزيمات المستحثة لذا فإن معدل إنتاجه يقل أو يتوقف عند تجمع النواتج النهائية لعمل الإنزيم (Mach *et al.*, ١٩٩٩) . فضلاً عن ذلك فإن مستوى إنتاج الإنزيم قد يقل نتيجة للتحلل الذي يحدث للإنزيم بفعل إنزيمات البروتييز التي تنتج مع باقي الإنزيمات المسؤولة عن التضاد (Markovich and Kononova, ٢٠٠٣) وقد لوحظ ذلك لدى إجرائنا لتجربة ثانوية للكشف عن مستوى إنتاج إنزيم البروتييز في وسط Richards modified medium برقم هيدروجيني ٦ وفي درجة حرارة ٢٥م باستعمال الغزل الفطري الطري والجاف لفطر الـ *R. solani* كمصدر وحيد للكربون إذ ظهر بأن أعلى مستوى لإنتاج إنزيم البروتييز كان بعد مرور ٢٤ ساعة من الحضن وانخفض مستواه بعد مرور ٤٨ ساعة. إن هذه النتائج تتفق مع ما ذكره (Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤) بأن مستوى إنتاج إنزيم الكايتنيز والكلوكانيز والبروتييز يزداد في الفترة الزمنية ما بين ٣٠ – ٣٦ ساعة من الحضن في وسط حاوٍ على جدار خلية الفطر Botryis cinerea كمصدر وحيد للكربون.

ومن العوامل الأخرى التي جرى دراسة تأثيرها في إنتاج إنزيم الكايتنيز هو الرقم الهيدروجيني للوسط لتأثيره الكبير في صفات الوسط كتأين المواد الغذائية فيه ودرجة ذوبانها ومن ثم تأثيرها في السعة الدارئة للوسط الذي ينعكس على مستوى نمو الفطر ونشاطه وقدرته على إنتاج العديد من الإنزيمات التي من بينها إنزيم الكايتنيز (Kredics *et al.*, ٢٠٠٣) فقد تؤثر حموضة الوسط في عمل الجينات المسؤولة عن تخليق الإنزيم وذلك لكونه من الإنزيمات المستحثة التي يتأثر تخليقها بالإجهاد الفسيولوجي للوسط ودرجة تأين المواد الغذائية فيه

(Kubicek *et al.*, ٢٠٠١; Mach *et al.*, ١٩٩٩). أشار (Elad *et al.*, ١٩٨٢)، إلى أن تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* كان مماثلاً لتأثيره في نمو الفطر إذ أن أعلى مستوى للنمو ولإنتاج الإنزيم كان عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية وهي نتيجة متوافقة مع ما حصلنا عليه فقد ظهر بأن أعلى مستوى لنمو الفطر وإنتاجيه لإنزيم الكايتنيز كان عند الرقم الهيدروجيني ٤ الذي أعطى في الوقت نفسه درجة تضادية عالية للفطر المسيطر ضد الفطر *R. solani*. كما جاءت هذه النتيجة مقاربة لما ذكره (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠) من أن الأوساط الحامضية تعد المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* مبيناً بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان مابين الرقمين الهيدروجينيين ٥.٥ – ٦، واستعمل (Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤) الرقم الهيدروجيني ٦ في إنتاج إنزيم الكايتنيز في وسط Richard modified medium إلا أنه لم يشر إلى الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنتاج. بينما ذكر (Tweddell *et al.*, ١٩٩٤) أن أعلى مستوى لإنتاج إنزيم الكايتنز من الفطر *Stachybotrys elegans* كان مابين الرقمين الهيدروجينيين ٤ – ٥ باستعمال جدار خلية الفطر *R. solani* كمصدر وحيد للكربون.

أما بالنسبة لتأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الكايتنيز فقد تبين من النتائج أن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان عند درجة حرارة ٢٠ م إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها ٠.٩٠٣٩٥ وحدة/مل وانخفض مستوى الإنتاج بصورة تدريجية بزيادة درجة الحرارة حتى وصل إلى أدنى مستوى له عند درجة حرارة ٤٠ م إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها ٠.٤٩٩٥. إن هذه النتائج كانت مقاربة لما ذكره (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠١) بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان عند درجتي الحرارة ٢٥ ٣٠م وانخفضت الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكايتنيز بصورة كبيرة بزيادة درجة الحرارة وصولاً إلى درجة حرارة ٤٠م واستعمل (Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤) درجة الحرارة ٢٨ م في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* في أثناء تنميته في وسط حاوٍ على جدار خلية الفطر *Botrytis cinerea* كمصدر وحيد للكربون.

تؤثر درجة الحرارة بصورة كبيرة في إنتاج الإنزيمات وقد يحدث تشابه بين درجات الحرارة المثلى للنمو ودرجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم كما أن الحد الحراري الأقصى للنمو يعتمد ويتحدد بنوع الإنزيمات أو مدى تأثير البروتينات داخل الخلية بالحرارة إذ أن الانخفاض السريع في معدل سرعة النمو عند رفع درجة الحرارة أكثر من المثلى يأتي نتيجة لفقدان الإنزيم المسيطر على سرعة النمو لطبيعته بفعل الدنتره (Denaturation) وربما إنزيمات أخرى (المظفر، ١٩٨٣; Janson and Ryden, ١٩٩٨)، ولقد وجد بأن الأحياء المحبة لدرجات الحرارة العالية تمتلك إنزيمات أكثر استقراراً لهذه الدرجات ولا تفقد طبيعتها بسهولة، ويؤثر ارتفاع وانخفاض درجة الحرارة في أكثر من عامل له علاقة بالنمو ونشاط الكائن الحي كرطوبة

الوسط وكمية الأوكسجين الذائبة فيه والطاقة الحركية للجزيئات هذا فضلاً عن حموضة الوسط التي تنعكس على سرعة التفاعلات داخل الخلية وإنتاجها للمركبات الأيضية الأولية التي من أبرزها الإنزيمات (السعد، ١٩٩٠ ;Chaplin and Bucke, ١٩٩٠).

يؤدي عامل التهوية دوراً مهماً كغيره من العوامل في التأثير على مستوى إنتاج الإنزيم فقد أظهرت النتائج بأن التهوية والمزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة قد زادت من نسبة إنتاج إنزيم الكايتنيز مقارنة بعدم التهوية باستعمال الوسط نفسه وفي درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ذاتهما وتقع أهمية التهوية والمزج إلى الحاجة للأوكسجين الذائب وتوزيع المادة الركيزة في وسط التنمية (السعد، ١٩٩٠؛ الدليمي، ٢٠٠٢).

إن النتائج التي حصلنا عليها جاءت متفقة مع بعض الدراسات التي استعملت عمليتي التهوية والمزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* (El-Katatny *et al*, ٢٠٠٠; Donzelli and Harman, ٢٠٠١; Limon *et al*, ٢٠٠٤; De Marco *et al.*, ٢٠٠٤). ولإنتاج الإنزيم نفسه من الفطر *Stachybotrys elegans* استعمل (Tweddell *et al.*, ١٩٩٤) التهوية والمزج بسرعة ١١٠ دورة/دقيقة.

فضلاً عن دراسة الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم كانت هنالك أيضاً دراسة لمعرفة تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم الكايتنيز الخام ليتسنى لنا اختيار الرقم الهيدروجيني الأمثل لوسط الـ PDA لعمل إنزيم الكايتنيز الخام عند وضعه في حفر أو خلطة مع الوسط لبيان تأثيره في نمو الفطر *R. solani*. وقد بينت النتائج بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم الخام تجاه ركيزة الكايتين الغروي يقع ضمن الحدود الحامضة والمتعادلة وسجلت أعلى فعالية إنزيمية عند الرقم الهيدروجيني ٤ بينما انخفضت الفعالية الإنزيمية عند الرقم الهيدروجيني ٨ وهذا ما وجد أيضاً في دراسات أخرى تناولت دراسة صفات إنزيم الكايتنيز المنتج من سلالات أو عزلات أخرى للفطر *T. harzianum* فقد ظهر بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل للسلالة $T_{٢٤}$ هو ٤.٥ (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠١) وللعزلة ١٠٥١ والسلالة ٣٩.١ (٤) (Harman *et al.*, ١٩٩٣; Ulhoa and Peberdy, ١٩٩٢)، وهذا قد لا يتفق جزئياً مع ما ذكره (Deane *et al.*, ١٩٩٨) بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتنيز المنتج من إحدى سلالات الفطر نفسه هو ٣.٥. وبصورة عامة يتراوح الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتنيز لمعظم الفطريات مابين ٤ – ٧ مع بعض الاستثناءات التي ظهرت عند الفطر *Candida albicans* (Dickinson *et al.*, ١٩٨٩) والفطر *Sacharomyces cervisiae* (Kuranda and Robbins, ١٩٩١) إذ كانت القيمة المثلى للرقم الهيدروجيني هي ٨ و٢.٥ على التوالي للفطرين المذكورين.

يعزى سبب تباين فعالية الإنزيم تحت أرقام هيدروجينية مختلفة إلى تأثيره في مجاميع قابلة للتأين Prototropic groups توجد في الإنزيم وفي المادة الركيزة وفي معقد الإنزيم-المادة الركيزة ومعقد الإنزيم-الناتج. كما أن من خصائص الإنزيمات هو أن لكل إنزيم رقماً هيدروجينياً مثالياً تكون عنده سرعة التفاعلات الإنزيمية على أقصاها وعند انحراف قيمة الرقم الهيدروجيني عن القيمة المثالية تقل الفعالية الإنزيمية بوضوح وباستمرار انحراف الرقم الهيدروجيني عن القيمة المثالية قد يتحطم الإنزيم (Denaturation) مما يؤثر على الفعالية الإنزيمية (Chaplin; and Bucke, ١٩٩٠ الدليمي، ٢٠٠٢).

عند دراسة ثباتية إنزيم الكايتنيز الخام بأرقام هيدروجينية مختلفة تبين بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم الخام تراوح ما بين ٤ – ٧ والذي يقع ضمن المدى الذي أشارت إليه العديد من الدراسات التي تناولت دراسة ثباتية إنزيم الكايتنيز المنتج من سلالات أخرى للفطر *T. harzianum* فقد ذكر (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠١) بأن أعلى ثباتية لإنزيم الكايتنيز المنتج من السلالة $T_{٢٤}$ تراوح ما بين الرقمين الهيدروجينيين ٤.٥ – ٧ كما توافقت مع دراسة أخرى ذكرت بأن ثباتية إنزيم الكايتنيز المنتج من إحدى سلالات الفطر *T. harzianum* تراوحت مابين ٤ – ٨ (Cabib, ١٩٨٧) بينما أشار (Deane *et al.*, ١٩٩٨) إلى أن إنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر نفسه احتفظ بـ٨٠ % من فعاليته مابين الرقمين الهيدروجينيين ٢ – ٥.٥ و٦٠% من فعاليته مابين ٢ – ٨ وانخفضت الفعالية الإنزيمية بصورة كبيرة باتجاه القيم الأكثر قاعدية مشيراً إلى أن الانخفاض في الفعالية الإنزيمية قد يعود إلى تأثير الأرقام الهيدروجينية العالية في تركيب جزيئة الإنزيم إذ قد يحدث مسخ (denaturation) لجزيئة الإنزيم في المحاليل القاعدية. وقد يعود الانخفاض في فعالية إنزيم الكايتنيز باتجاه القيم القاعدية إلى التحلل الذي يحدث لجزيئة الإنزيم بفعل إنزيم البروتييز القاعدي الذي يفرزه الفطر فقد أشار (De Macro and Felix, ٢٠٠٢) إلى أن أعلى فعالية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *T. harzianum* كانت في الأرقام الهيدروجينية ٧ و٨.

برز دور الآلية الإنزيمية للفطر *T. harzianum* في تثبيط نمو الفطر *R. solani* لدى استعمالنا للراشح الإنزيمي الخام المفصول والمركز بالاسيتون المبرد إلى ٢٠-مْ في وسط PDA برقم هيدروجيني ٤ إذ بلغت نسبة التثبيط ٦٤% وهي نسبة مقاربة لما حصل عليه (EL-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠) باستعمال الراشح الإنزيمي المركز بكبريتات الامونيوم (٨٠%) في تثبيط نمو الفطر *Sclerotium rolfsii* والتي بلغت ٦١% وكما أشير سابقاً فإن استعمال الاسيتون المبرد إلى ٢٠-مْ هو لأجل فصل الإنزيمات الموجودة في الراشح الإنزيمي الخام عن بقية المركبات الأيضية الأخرى والتي من أبرزها المضادات الحياتية الموجودة في الراشح الخام، فقد أشار (Pohl, ١٩٩٠) إلى أنه يمكن التخلص من الكثير من المركبات الموجودة مع

الإنزيمات في الراشح الإنزيمي بوساطة فصلها بالاسيتون الذي استعمل أيضاً في تركيز الإنزيم وذلك بترسيب البروتينات (الإنزيمات) بالمذيبات العضوية التي من ضمنها الاسيتون.

وبالرجوع إلى النتائج نلاحظ بأن نسبة التثبيط قد انخفضت إلى ١٣٪ باستعمال الراشح الإنزيمي الخام والسبب في ذلك قد يعود إلى ما ذكره (Schirmbock *et al.*, ١٩٩٤) بأنه على الرغم من التآزر الحاصل بين الإنزيمات والمركبات الأيضية الأخرى التي من ضمنها المضادات الحياتية الموجودة في الراشح الإنزيمي للفطر *T. harzianum* إلا أن الإنزيم يفقد ٥٠٪ من فعاليته عند إضافته مع هذه المركبات كما أشار إلى أن الإنزيم أو المضاد الحيوي يجب أن يضاف بتراكيز أعلى مما هو عليه في الراشح الإنزيمي لكي نحصل على نسبة تثبيط عالية لنمو الفطر أو إنبات أبواغه.

ذكر (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠) أن نسبة التثبيط للفطر *Sclerotium rolfsii* قد انخفضت إلى ٣٣.٧% باستعمال الراشح الإنزيمي الخام للفطر ووصلت إلى ٢٧.٥% عند استعمال الراشح الإنزيمي الخام المعامل حرارياً وهي نسبة مشابهة من حيث المبدأ لما حصلنا عليه على الرغم من عدم تماثل قيم نسب التثبيط والذي قد يعود للاختلاف مابين السلالات المستعملة وظروف الحضن فقد انخفضت نسبة التثبيط باستعمال الراشح الإنزيمي المقتول حرارياً إلى ٥٪ وهذا يعطي إشارة إلى وجود مركبات أيضية أخرى في الراشح الإنزيمي تعمل بصورة متآزرة مع الإنزيمات التي من الممكن أن تعطي نسبة تثبيط أعلى في حالة تنقيتها وتركيزها وإضافتها إلى الوسط النامية عليه مستعمرات الفطر المضاد (El-Katatny *et al.*, ٢٠٠٠).

أما بالنسبة للرقم الهيدروجيني ٧ فنلاحظ من النتائج بأن دور الفعالية الإنزيمية فيه لم يكن واضحاً بصورة ملموسة إذ لم تتجاوز نسبة التثبيط سوى ١٣٪ باستعمال كل من الراشح الإنزيمي الخام والراشح الإنزيمي المفصول والمركز بالاسيتون والسبب في ذلك قد يعود إلى تأثير إنزيمات البروتييز القاعدية والتي ترتفع فعاليتها بزيادة الرقم الهيدروجيني باتجاه القيم القاعدية فقد أشار(De Marco and Felix, ٢٠٠٢) بأن أعلى فعالية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *T. harzianum* كانت عند الرقمين الهيدروجينيين ٧ و ٨، وينتج الفطر إنزيم البروتييز مع باقي الإنزيمات المسؤولة عن التضاد في أثناء تطفله على باقي الفطريات أو تنميته في وسط حاوٍ على غزل فطري طري أو جاف أو جدار خلية فطرية (De Marco *et al.*, ١٩٩٤; Schirmbock *et al.*, ٢٠٠٤) وقد تم الكشف مسبقاً عن وجود إنزيم البروتييز في الراشح الإنزيمي الخام. ويعمل إنزيم البروتييز على هضم وتحليل باقي الإنزيمات الموجودة في الراشح الإنزيمي (Markovich and Kononova, ٢٠٠٣) المضاف للوسط PDA والذي من الممكن أن يكون تأثيره بقي ثابتاً عند فصل وتركيز الراشح الإنزيمي إذ جرى فصله وتركيزه

مع باقي الإنزيمات الموجودة في الراشح ومما يعزز ذلك هو تدني دور بقية المركبات الأيضية الموجودة في الراشح الإنزيمي الخام المعامل حرارياً إذ لم يلاحظ لها تأثير يستحق الذكر.

إضافة إلى كل ما سبق نلاحظ بأن الرقم الهيدروجيني للوسط كان له أيضاً تأثير في نمو الفطر *R. solani* إذ ظهر أن نمو الفطر في وسط الـ PDA برقم هيدروجيني ٤ لم يكن جيداً مقارنة بالرقم الهيدروجيني ٧.

الاستنتاجات Conclusions

١. إن ظروف الحضن المثلى لنمو الفطر *Rhizoctonia solani* تمثلت برقم هيدروجيني ٦ لوسط الـ PDA أما بالنسبة لدرجة الحرارة فقد كانت عند ٢٥ و٣٥م.

٢. إن ظروف الحضن المثلى لنمو الفطر *Tricoderma harzianum* في وسط PDA هي عند رقم هيدروجيني ٤ للوسط ولدرجة حرارة كانت ٢٥ م.

٣. إن الفطر *T. harzianum* أظهر كفاءة تضادية عالية ضد الفطر الممرض *R. solani* وخصوصاً عند إجراء التجربة تحت ظروف حضن تمثلت برقم هيدروجيني ٤ ودرجة حرارة ٣٥م وبفارق بسيط الحضن عند رقم هيدروجيني ٦ ودرجة حرارة ٢٥م.

٤. أظهرت آلية التنافس دوراً مهماً في زيادة كفاءة الفطر *T. harzianum* التضادية تمثلت بسرعة نمو الفطر على وسط الـ PDA التي فاقت سرعة نمو الفطر *R. solani* بإضعاف المرات عند بعض الظروف البيئية.

٥. إن لآلية التطفل دوراً مهماً في تثبيط نمو الفطر *R. solani* تمثلت بالتفاف الفطر المسيطر على الغزل الفطري للمضيف أو التصاقها به وافرازه لإنزيمي الكايتنيز والبروتيز المحللة لجدران خلايا الفطر الممرض *R. solani*.

٦. إن ظروف الحضن المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز هي عند رقم هيدروجيني ٤ لوسط الـ MSM ودرجة حرارة ٢٠م وباستعمال الغزل الفطري الجاف للفطر *R. solani* كمصدر وحيد للكاربون وبوجود التهوية والمزج بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة بعد مدة حضن ٢٤ ساعة.

٧. إن للآلية الإنزيمية دوراً كبيراً في تثبيط نمو الفطر *R. solani* إذ وصلت نسبة التثبيط باستعمال الراشح الخام لإنزيم الكايتنيز المفصول والمركز بالاسيتون المبرد إلى ٢٠-م إلى ٦٤%.

التوصيات Recommended

١. إجراء تجربة حقلية تتضمن استعمال الظروف المختبرية المثلى للنمو والتضاد في اختزال كمية لقاح الفطر الممرض في التربة.

٢. إجراء تنقية كاملة لإنزيم الكايتنيز وبيان تأثيره في نمو الفطر الممرض *R. solani* ومقارنة تأثيره مع الراشح الخام للإنزيم.

٣. الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لإنزيم الكلوكانيز وإجراء تنقية كاملة للإنزيم فيما لو ثبت إنتاج الفطر له وأيضاً إجراء تنقية كاملة لإنزيم البروتييز ودراسة صفاتها

وبيان تأثيرهما في نمو الفطر الممرض *R. solani* بصورة منفردة أو سوية مع إنزيم الكايتنيز.

٤. الكشف عن وجود مركبات أيضية أخرى في الراشح الخام للفطر *T. harzianum* باستعمال الغزل الفطري الجاف للفطر *R. solani* كمصدر وحيد للكربون وبيان طبيعتها وإجراء تنقية لها وبيان تأثيرها في نمو الفطر الممرض *R. solani* بصورة منفردة أو سوية مع باقي إنزيمات الفطر.

٥. إجراء دراسة مجهرية مفصلة باستخدام المجهر الإلكتروني لإعطاء صورة واضحة للتشوهات الحاصلة في جدران وخلايا الفطر *R. solani* جراء تطفل الفطر *T. harzianum* عليه.

المصادر العربية

الجراخ، علاء، سعد تاج الدين وعبد الله كاظم هندي. ١٩٩٦. النشاط الكايتيني لبعض السلالات البكتيرية المعزولة من التربة العراقية. مجلة جامعة بابل، مجلد ١، عدد ٣، ص: ٢١٣-٢٢٤.

الحديثي، بهاء عبد الجبار عبد الحميد، ٢٠٠٢. النشاط الإنزيمي للفطر *Trichoderma harzianumi* في التربة ونمو حاصل نبات الطماطة. أطروحة دكتوراه كلية – الزراعة - جامعة بغداد. ١٦٦ صفحة.

الدليمي، خلف صوفي داوود ٢٠٠٢ الإنزيمات المايكروبية والتقانات الحيوية. جامعة فيلادلفيا- الأردن.

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله. ١٩٨٠. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. مطبعة مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. ٤٨٨ صفحة.

السعد، مها رؤوف ١٩٩٠. مبادئ فسلجة الأحياء المجهرية. مطابع التعليم العالي في الموصل. جامعة بغداد. ٤٠٠ صفحة.

السعدي، ماجدة هادي مهدي. ٢٠٠٤ فعالية البكتريا Rhizoctonia japonicum والفطر *Trihcoderma* لأمراض تعفن جذور فول الصويا Glycine Max. L. Merill. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد. ١٢٩ صفحة.

المظفر، سامي عبد الهادي. ١٩٨٣. حركيات الإنزيمات الجزء الثاني. مطبعة الخلود - بغداد.

الوائلي، ضياء سالم علي (٢٠٠٤). دراسة مرض موت بادرات الطماطا ومكافحتها المتكاملة في مزارع الزبير وسفوان في البصرة، أطروحة دكتوراه، كلية علوم - جامعة البصرة.

تكسانة، عبد العزيز. ١٩٨٣. المقاومة الحياتية لبعض فطريات التربة المرضية باستخدام عزلة غير مرضية للفطر *Rhizoctonia solani Kuhn*. رسالة ماجستير-كلية العلوم- جامعة بغداد. ٧١ صفحة.

حميد، فاخر رحيم. ٢٠٠٢. دراسة كفاءة عزلات الفطر *Trichoderma* spp في استحثاث المقاومة ضد الفطر *Rhizoctonia solani* وتحفيز النمو في أربعة أصناف من الفطر. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد. ٨٠ صفحة.

عباس، محمد حمزه ١٩٩٨. دراسة حياتية ووقائية للفطر *Rhizoctonia solani* Kuhn المسبب لتعفن بذور وموت بادرات الحنطة. رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة البصرة. ٨٨ صفحة.

المصادر الأجنبية

Agrios, G.N. (١٩٩٧). Plant Pathology. ٤th ed. Academic Press. London. pp: ١٥٠-٢٠٣.

Ahmed, J.S. and Baker, R. (١٩٨٧). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Phytopathol. ٧٧: ١٨٢-١٨٩.

Anke, T. (١٩٩٧). Fungal Biotechnology. An international Thomson Publishing Company (ITP). London, pp: ٦٥-٧٩.

Antal, Z.; Manczinger, L.; Szakacs, G.; Tengerdy, R.P. and Ferenczy, L. (٢٠٠٠). Colony growth, *in vitro* antagonism antagonsim and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant srains of *Trichoderma* species. Mycol. Res., ١٠٤: ٥٤٥-٥٤٩.

Asaka, O. and Shoda, M. (١٩٩٦). Biocontrol of *Rhizoctoina solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilus* R B ١٤. Appl. Environ. Microbiol., ٦٢: ٣٩٧-٤٠٤.

Ashford, N.A.; Hattis, D. and Murray, A.E. (١٩٧٧). Industrial prospects for chitin and protein from shellfish wastes. MTI sea Grant report, MITSG ٧٧-٣, MIT, Cambridge, Mass.

Baath, E. and Soder-Strom, B. (١٩٨٠). Degradation of macromoles by microfung; isolated from different podzoic soil htorizons. Can. J. Bot., ٥٨: ٤٢٢-٤٢٥.

Baker, R. (١٩٨٧). Mycoparasitism, ecology and physiology. Can. J. Plant Pathology, ٨: ٢١٨-٢٢١.

Baker, R. and Griffin, G.J. (١٩٩٥). Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. Phytopathol., ٩: ٣٧٠-٣٧٨.

Barnett, H.L. and Binder, F.L. (١٩٧٣). The fungal host-parasite relationship. Phytophathol., ١١: ٢٧٣-٢٩٢.

Bell, D.K.; Wells, H.D. and Markham, C.R. (١٩٨٢). Invitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathol., ٧٢: ٣٧٩-٣٨٢.

Bemiller, J.N. and Whistler, R.L. (١٩٦٢). Alkaline degradation of amino sugars. J. Org. Chem., ٢٧: ١١٦١-١١٦٤.

Benhamou, N. and Chet, I. (١٩٩٣). Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*; Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathol., ٨٣: ١٠٦٢-١٠٧١.

Bilinsk, E.A. (١٩٨٧). Proteinases and beer production. Appl. Environ. Microbiol., ٥٣: ٤٩٥-٤٩٩.

Bolar, J.P.; Norelli, J.L.; Wong, K.; Hayes, C.K.; Harman, G.E. and Aldwinckle, H.S. (٢٠٠٠). Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduce vigor. Phytopathol., ٩٠: ٧٢-٧٧.

Bonsall, R.E.; Weller, D.M.; and Thomashow. (١٩٩٧). Quantification of ٢,٤-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas spp*. Invitro and in rhizo phere of wheat. Appl. Envirom. Microbiol., ٦٣: ٩٥١-٩٥٥.

Botha, A.M.; Nagel, M.A.C.; Westhuizem, A.J.V. and Botha, F.C. (١٩٩٨). Chitinase isoenzymes in near-isogenic wheat lines challenged with Russian wheat aphid, exogenous ethylene and mechanical wounding. Botanical Bulletin of Academia Sinica, ٣٩: ٩٩-١٠٦.

Cabib, E. (١٩٨٧). The synthesis and degredation of chitin. Advance in Enzymol., ١٨: ٢٢-٣٠.

Carling, D.E. and Leiner, R.H. (١٩٨٦). Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binudeat *Rhizoctonia solani* like fungi from aerial stem and subterraneans of potato plants. Phytopathol., ٧٦: ٧٢٥-٧٢٩.

Carling, D.E.; Baird, R.E.; Gitaitis, R.D.; Brainard, K.A. and Kuninaga, S. (٢٠٠٢). Characterization of AG-١٣, a newly reported anstomosis group of *Rhizoctonia solani*. Phytopathol., ٩٢: ٨٩٣-٨٩٩.

Chaplin, M. and Bucke, C. (١٩٩٠). Enzyme Technology. Cambridge University Press. pp: ١٢-٢١.

Cherif, M. and Benhamou, N. (١٩٩٠). Cytochemical spects of chitin break down during the parasitic action of *Trichoderma sp.* on *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis lycopersici*. Phytopathol., ٨٠: ١٤٠٦-١٤١٤.

Chet, I. and Baker, R. (١٩٨١). Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *R. solani*. Phytopathol., ٧١: ٢٨٦-٢٩٠.

Chet, I.; Harman, G.E. and Baker, R. (١٩٨١). *Trichoderma harzianum*, its hyphal interaction with *Rhizoctonia solani*; and *Pythium* spp. Microbial Ecology, ٧: ٢٩-٣٨.

Cook, R.J. and Baker, K.F. (١٩٨٣). The nature and practice of biological control of pathogens. American Phyto pathological society, St. Paul, MN, pp. ٥٣٩.

Cubeta, M.A. and Vilgalys, R. (١٩٩٧). Population biology of *Rhizoctonia solani* complex. Phytopathol., ٨٧: ٤٨٠-٤٨٤.

Cuevas, V.C.; Sorlano, J.M.; Bagunu, L.G. and Alfonso, A.L. (١٩٩٦). Control of damping of disease of soybean by *Trichoderma spp.* The Phillippine Agriculturist, ٧٨: ٢٥٥-٢٧٦.

De Marco, J.L. and Felix, C.R. (٢٠٠٢). Characterization of protease produced by *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches broom disease, BMC Biochemistry; ٣: ٣-١٠.

De Marco, J.L.; Valadares-Inglis, M.C. and Felix, C.R. (٢٠٠٤). Purification and characterization of an N-ocetylglacosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which control *Crinipellis perniciosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. ٦٤: ٧٠-٧٥.

Deane, E.E.; Whipps, J.M.; Lynch, J.M. and Peberdy, J.F. (١٩٩٨). The purification and characterization of *Trichoderma harzianum* exochitinase. Biochimica and Biophysica Acta, ١٣٨٣: ١٠١-١١٠.

Dela Cruz, J.; Hidalgo-Gallego, A.; Lora, J.M.; Benitez, T.; Pintor-Toro, J.A. and Llobell, A. (١٩٩٢). Isolation and characterization of three chitinase from *Trichoderma harzianum*. Euro. J. Biochem. ٢٠٦: ٨٥٩-٨٦٧.

Dennis, C. and Webster, J. (١٩٧١). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., ٥٧: ٢٥-٣٩.

Dickinson, K.; Keer, V.; Hitchcock, C.A. and Adams, D.J. (١٩٨٩). Chitinase activity from *Candida albicans* and its inhibition by allosamidin. J. Gen. Microbiol., ١٣٥: ١٤١٧-١٤٢١.

Dipietro, A.; Lorito, M.; Hayes, C.K.; Broadway, R.M. and Harman, G.E. (١٩٩٣). Endochitinase from *Glioladium virens*: isolation,

characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. Phytopathol., ٨٣: ٣٠٨-٣١٣.

Domsch, K.H.; Gams, W. and Anderson, T. (١٩٨٠). Compendium of soil fungi. Academic press, p. ٨٥٩.

Donzelli, B.G.G. and Harman, G.E. (٢٠٠١). Introduction of ammonium, glucose and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma aurovoride* strain p١. Applied and Environ. Microbiol., ٦٧: ٥٦٤٣-٥٦٤٧.

Dorrance, A.E.; Kleinhenz, M.D.; Mcclure, S.A. and Twttle, N,T, (٢٠٠٣). Temperature, moisture and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. Plant Disease, ٨٧: ٥٣٣-٥٣٨.

Dunlop, R.W.; Simon, A. and Sivasithamparam, K. (١٩٨٩). An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. J. Natural Products, ٥٢: ٦٧-٧٤.

Elad, Y. (١٩٩٦). Mechanism involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. Eur. J. Plant Pathol., ١٠٢: ٧١٩-٧٣٢.

Elad, Y.; Chet, I. and Katan, Y. (١٩٨٠). *Trichoduma harzianum* a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathol., ٧٠: ١١٩-١٢١.

Elad, Y.; Chet, I. and Henis, Y. (١٩٨٢). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol., ٢٨: ٧١٩-٧٢٥.

Elad, Y.; Chet, I. and Boyle, P. (١٩٨٣). Parasitism of *Trichoderma spp.* on *Rhizoctonia solani* and *sclerotium rolsfii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathol., ٧٣: ٨٥-٨٨.

Elad, Y.; Lifshitz, R. and Baker, R. (١٩٨٥). Enzymatic activity of the mycoparasite *pythium nunn* during interaction with host and non host fungi. Physiol. Plant pathol., ٢٧: ١٣١-١٤٨.

El-Katatny, M.H.; Somitsch, W; Robra, K.H.; El-Katatny, M.S. and Gubitz, G.M. (٢٠٠٠). Production of chitinase and *B*-١,٣-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phyto pathodenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technol. Biotechnol., ٣٨: ١٧٣-١٨٠.

El-Katatny, M.H.; Gudelj, M.; Robra, K.H.; Elnaghy, M.A. and Gubitz, G.M. (٢٠٠١). Characterization of chitinase and endo-*B*-١,٣-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai $T_{٢٤}$ involved in control of phytopathogenic *Sclerotium rolfsii*. Applied Microbiol. and Biotechnol., ٥٦: ١٣٧-١٤٣.

Emani, C.; Carcia, J.M.; Lopata-Finch, E. Pozo, M.J.; Urides, P.; Kim, D.; Sunilkumar, G.; Cook, D.R.; Kenerley, C.M. and Rathore, K.S. (٢٠٠٣). Enhanced fungal resistance intransgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. Plant Biotechnol. J., ١: ٣٢١-٣٣٦.

Frank, J.A. and Leach, S.S. (١٩٨٠). Comparison of tuberborne and soilborne inoculum in the *Rhizoctonia* disease of potato. Phytopathol., ٧٠: ٥١-٥٣.

Gagne, N. (١٩٩٣). Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as food processing aid. MSc. Thesis, Department of food science and Agricultural chemistry, McGill University, Montreial.

Gomori, G. (١٩٥٥). Preparation of buffer for use in enzymes studies, In Methods in enzymology. In (ed. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) Academic press. New York. Vol. ١

Gooday, G. (١٩٩٠). The ecology of chitin degradation. Microb. Ecol., ١٠: ٣٨٧-٤٣١.

Hadar, Y.; Chet, I. and Hemis, Y. (١٩٧٩). Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with a wheat-bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phyhtopathol., ٦٩: ٦٤-٦٨.

Handelsman, J. and Parke, J.L. (١٩٨٩). Mechanism in biocontrol of soil-borne plant pathogens. Plant Microbe Interactions, ٣: ٢٧-٦١.

Haran, S.; Schickler, H.; Oppenheim, A. and Chet, I. (١٩٩٦). Differential expression of *Trichoderma harzinum* chitinase during mycoparasitism. Phytopathol. ٨٦: ٩٨٠-٩٨٥.

Harman, G.E. (١٩٩٥). *Trichoderma spp.* Cornal University, Geneva, NY ١٤٤٥٦.

Harman, G.E. (٢٠٠٠). Myths and Dogmas of biocontrol change in perceptions derived from reseaech on *Trichoderma harzianum* strain T-٢٢. Plant Disease, ٨٤: ٣٧٧-٣٩٣.

Harman, G.E.; Chet, I. and Baker, R. (١٩٨٠). *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *pythium* spp. Or *Rhizoctonia solani*. Phytophathol., ٧٠: ١١٦٧-١١٧٢.

Harman, G.E.; Chet, I. and Baker, R. (١٩٨١). Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seed as a biocontrol agent. Phytopathol., ٧١: ٥٦٩-٥٧٢.

Harman, G.E.; Hayes, C.K.; Lorito, M.; Broadway, R.M.; Dipietro, A. and Tronsmo, A. (١٩٩٣). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathol., ٨٣: ٣١٣-٣١٨.

Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I. and Lorito, M. (٢٠٠٤). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Microbiol., ٢: ٤٣-٥٦.

Hine, R. (١٩٩٩). Disease of Urban plants. University of Arizona.

Hodges, L. (٢٠٠٣). Damping-off of seedling and transplants. Nebraska Cooperative Extension, GO٣-١٥٢٢-A.

Howard, M.B.; Ekbory, N.A.; Weiner, R.M. and Hutcheson, S.W. (٢٠٠٣). Detection and characterization of chitinase and other chitin-modifying enzymes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. ٣٠: ٦٢٧-٦٣٥.

Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. (١٩٨٣). Gliovirin, a new antibiotic from Gliocladium virems, and its role in the biological control of *Phythium ultimum*. Can. J. Microbiol., ٢٩: ٣٢١-٣٢٤.

Howell, C.R.; Hanson, L.E.; Stipanovic, R.D. and Puckhaber, L.S. (٢٠٠٠). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoatonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathol., ٩٠: ٢٤٨-٢٥٢.

Howell, C.R. (٢٠٠٣). Mechanisms employed by *Trichderma* species in the biological control of plant disease: The history and evolution of current concepts. Plant Disease, ٨٧: ٤-١٠.

Hunter, M. and Bodman, K. (٢٠٠٠). Beneficial microbes in soil-less potting media, IDS contracting Australia. ١٣٠٠ ٧٢٤ ١٣١.

Hwang, J. and Benson, D.M. (٢٠٠٣). Expression of induced resistance in poinsietta cuttings against *Rhizoctonia* stem rot by treatment of stock plants with binucleat *Rhizoctonia*. Biol. Control., ٢٧: ٧٣-٨٠.

Inbar, J. and Chet, I. (١٩٩٤). A newly isolated lectin from the plant-pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitim. Microbial., ١٤٠: ٦٥١-٦٥٧.

Inbar, J. and Chet, I. (١٩٩٥). The role of recognition in the induction of specific chitinase during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Microbial., ١٤١: ٢٨٢٣-٢٨٢٩.

Inglis, G.D. and Kawchuk, L.M. (٢٠٠٢). Comparative degradation of Oomycete, ascomycete and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. Can. J. Microbil., ٤٨: ٦٠-٧٠.

Jackson, A.M.; Whipps, J.M. and Lynch, J.M. (١٩٩١). Effect of temperature, pH and water potential on growth of four with disease biocontrol potential. World J. Microbiol. Biotechnol., ٧: ٤٩٤-٥٠١.

James, B.N. and David, S.B. (١٩٨٤). Forest nursery practices in the south southern. J. of Applied Forestry, ٨: ٦٧-٧٥.

Janson, J.C. and Ryden, L. (١٩٩٨). Protein purification-principles, High-resolution methods, and application. ٢nd ed. A John Wiley and Sons, Inc. publication. New York.

Johnson, S.B. and Leach, S.S. (٢٠٠٤). *Rhizoctonia* disease on potatoes. University of Maine Cooperative Extension, Bulletin, ٢٢٧٣.

Kapat, A.; Zimand, G. and Elad, Y. (١٩٩٨). Effect on two isolated of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinera*. Physiol. Mol. Plant Pathol., ٥٢: ١٢٧-١٣٧.

Keyhani, N. and Roseman, S. (١٩٩٦). Molecular cloning, isolation and characterization of periplasmic chitodextrinate. J. Biol. Chem., ٢٧١: ٣٣٤١٤-٣٣٤٢٤.

Koneman, E.W.; Roberts, G.D. and Wright, S.E. (١٩٧٩). Practical laboratory mycology. ٢nd ed. The Williams and Wilkins Co., USA, pp: ١٦٥-١٦٧.

Kredics, L.; Antal, Z. and Manczinger, L. (٢٠٠٠). Influence of water potential on growth, enzyme secretion and in vitro enzyme activities of *Trichoderma harzianum* at different temperature. Curr. Microbiol., ٤٠: ٣١٠-٣١٤.

Kredics, L.; Antal, Z.; Manczinger, L.; Szekeres, A.; Kevei, F. and Nagy, E. (٢٠٠٣). Influence environmental parameters on *Trichoderma strains* with biocontrol potential. Food Technol. Biotechnol., ٤١: ٣٧-٤٢.

Kubicek, C.P.; Mach, R.L.; Peter baner, C.K. and Lorito, M. (٢٠٠١) *Trichoderma* from genes to biocontrol. J. of Plant Pathol., ٨٣: ١١-٢٣.

Kucuk, C. and Kivance, M. (٢٠٠٣). Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turk. J. Biol., ٢٧: ٢٤٧-٢٥٣.

Kulling, C.; Mach, R.; Lorito, M. and Kubicek, C. (٢٠٠٠). Enzyme diffusion from *Trichoderma atrovivide* (*T. harzianum*) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of

Trichoderma ech ٤٢ gene expression before mycoparasitic contact. Appl. Environ. Microbiol., ٦٦: ٢٢٣٢-٢٢٣٤.

Kuranda, M.J. and Robbins, P.W. (١٩٩١). Chitinase is required for cell separation during growth of *saccharomyces cervisiae*. J. Biol. Chem., ٢٦٦: ١٩٧٥٨-١٩٧٦٧.

Lewis, J.A. and papavizas, G.C. (١٩٨٧). Permeability changes in hyphae of *Rhizoctonia solani* induced by germling preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Phytopathol., ٧٧: ٦٩٩-٧٠٣.

Lieckfeldt, E.; Samuels, G.J.; Nirenberg, H.I. and Orlando. (١٩٩٩). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? Appl. And Environ. Microbiol., ٦٥(٦): ٢٤١٨-٢٤٢٨.

Ligocka, A.; Paluszak, Z.L. Sadowski, S. and Dziedic, T. (٢٠٠٢). Enzymatic and antagonistic potential observed in flax-root-infecting fungi. Electronic J. of polish Agricultural Universities, Agronomy, Vol. ٥, Issue. ١.

Limon, M.C.; Chacon, M.R.; Mejias, R.; Delgado-Jarana, J.; Rincon, A.M.; Codon, A.C. and Bentiz, T. (٢٠٠٤). Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT ٢٤١٣ by addition of cellulose binding domain. Appl. Microbiol. Biotechnol., ٦٤: ٦٧٥-٦٨٥.

Lo, C.T.; Nelson, E.B.; Hayes, C.K. and Harman, G.E. (١٩٩٨). Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain ١٢٩٥-٢٢ in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. Phytopathol., ٨٨: ١٢٩-١٣٦.

Lorito, M.; Harman, G.E.; Hayes, C.K.; Broadway, R.M.; Tronsmo, A.; Woo, S.L. and Dipietro, A. (١٩٩٣). Chitinolytic enzymes

produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathol., ٨٣: ٣٠٢-٣٠٧.

Lorito, M.; Hayes, C.K.; Dipietro, A.; Woo, S.L. and Harman, G.E. (١٩٩٤). Purification, characterization and synergistic activity of a glucan ١,٣-*B*-glucosidase and an N-acetyl-*B*-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathol., ٨٤: ٣٩٨-٤٠٥.

Lorito, M.; Frakas, V.; Robuffat, S.; Bado, B. and Kubicek, C.P. (١٩٩٦). Cell wall synthesis is amajor target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. J. Bacteriol., ١٧٨: ٦٣٨٢-٦٣٨٥.

Lortio, M.; Woo, S.L.; Fernadez, J.G.; Collucci, G.; Harman, G.E.; Pintor-Toros, J.A.; Filippone, E.; Muccifora, S.; Lawrence, C.B.; Zoina, A.; Tuzun, S. and Scala, F. (١٩٩٨). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Pro. Natl. Acad. Sci. USA., ٩٥: ٧٨٦٠-٧٨٦٥.

Lu, Z.; Tombolini, R.; Woo, S.; Zeilinger, S.; Lorito, M. and Jansson, J.K. (٢٠٠٤). Invitro study of *Trichoderma*-pathogen-plant interaction, using constitutive and inducible fluorescent protein reporter system. Appl. and Environ. Microbiol., ٧٠: ٣٠٧٣-٣٠٨١.

Mach, R.L.; Perter bauer, C.K.; Payer, K.; Jaksits, S.; Woo, S.L.; Zeilinger, S.; Kullnig, L.M.; Lorito, M. and Kubicek, C.P. (١٩٩٩). Expression of two Major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzixnum* p١) is triggered by different regulatory signals. Appl. and Environ. Microbiol., ٦٥: ١٨٥٨-١٨٦٣.

Makherjee, P.K.; Latha, J.; Hadar, R. and Horwitz, B.A. (٢٠٠٣). TMKA, amitogen-actirated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark,. J. Bactriol. Eucaryotic Cell, ٢: ٤٤٦-٤٥٥.

Manocha, M.S. (١٩٩٠). Cell-cell interaction in fungi. J. of Plant Disease Prot., ٩٧: ٦٥٥-٦٦٩.

Markovich, N.A. and Kononova, G.L. (٢٠٠٣). Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense. Appl. Biochem. and Microbial., ٣٩: ٣٤١-٣٥١.

Mauch, F.; Mauch-Mani, B. and Boller, T. (١٩٨٨). Antifungal hydrolyases in pea tissue. II Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and *B*-١,٣-glucanase. Plant Physiol., ٨٨: ٩٣٦-٩٤٢.

Mazzola, M.; Wong, O. and Cook, P.J. (١٩٩٦). Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG-٨ on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissue by PCR. Phytopathol. ٨٦: ٣٥٤-٣٦٠.

Mercedes dela, M.; Limon, C.M.; Meijas, R.; Mach, R.L.; Pintor-Toro, J.A. and Kubicek, C.P. (٢٠٠٠), Regulation of chitinase ٣٣ (chit ٣٣) gene expression in *Trichodernum harzianum*. Curr. Gen. ٣٠: ١٢٦-١٣٠.

Metcalf, D.D. and Wilson, C.R. (٢٠٠١). The process of antagonism of *Selerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. Plant Pathol., ٥٠: ٢٤٩-٢٥٧.

Montealegre, J.R.; Reyes, R.; Perez, L.M.; Herrera, R.; Silva, P. and Besoain, X. (٢٠٠٣). Selection of bioantagonistic bacteria to be

used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Environ. Biotchnol., ٦: ١-٨.

Morra, M.J. (١٩٩٧). Assessmental of Extracellular enzymatic activity in soil. In: Manual of environmental microbiology (ed. Hurs, C.J.; Knudsen, G.R.; Mclnerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V.) American Society for Microbiology, Washington. pp. ٤٥٩-٤٦٥.

Moubasher, A.H. (١٩٩٣). Soil fungi in Qatar and other Arab contries. Published by the Center for scientific and Applied Research. University of Qatar, Qatar.

Naczk, M. and Shahidi, F. (١٩٩٠). Chemical composition and chitin content of crustacean offal. In: Advance in Fisheries technology and biotechnology for increased profitability, (ed. Voigt, M.N. and Botta, J.R.). Atlantic Fisheries Technological conference and seafood Biotechnology Workshop Technomic publishing Company, USA, pp: ٢٩٩-٣٠٤.

Nelson, B; Helms, T.; Christianson, T. and Kural, L. (١٩٩٦). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* from soybean. Plant Disease, ٨٠: ٧٤-٨٠.

Parameter, J.R. (١٩٧٠). *Rhizoctonia solani*. Biology and Pathology Univ. of California press Bekeley. ٢٢٥pp. (C.F Sneh, *et al.* ١٩٩٦).

Papavizas, G.C. (١٩٨٥). *Trichoderma* and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol. Phytopathol., ٢٣: ٢٣-٥٤.

Pohl, T. (١٩٩٠). Concentration of proteins and removal of solutes, Method in Enzymology. Academic press, ١٨٢: ٧٨.

Rifail, M.A. (١٩٦٩). A revision of the genus *Trichoderma* common. Mycol. Inst. Mycol., ١١٦: ١-٥٦.

Rocha-Ramirez, V.; Omero, C.; Chet, I.; Horwitz, B.A. and Herrera-Estrella, A. (٢٠٠٢). *Trichoderma atroviride* G-protein alph-subunit gene tgal is involved in mycoparasitic coiling and condiation. Eucaryotic Cell, ١: ٥٩٤-٦٠٥.

Roco, A. and Perez, L.M. (٢٠٠١). Invitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Altranaria alternata* in the presence of growth regulators. Electronic J. of Biotechnol., ٤: ٦٨-٧٣.

Rousseau, A.; Benhamou, N.; Chet, I. and Piche, Y. (١٩٩٦). Mycoparasitism of the extramatrical phase of Glomus intraradics by *Trichoderma harzianum*. Phytopathol., ٨٦: ٤٣٤-٤٤٣.

Samuels, G.J. (١٩٩٦). *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. Mycol. Res., ١٠٠: ٩٢٣-٩٣٥.

Schirmbock, M.; Lorito, M.; Wang, Y.L.; Hayes, C.K.; Arisan-Atac, I. Scala, F.; Harman, G.E. and Kubicek, C.P. (١٩٩٤). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotic: Molecular Mechanisms involved in the antagonists action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic of fungi Appl. and Environ. Microbiol., ٦٠: ٤٣٦٤-٤٣٧٠.

Schwartz, H.F. (٢٠٠٤). Root rots of dry beans. Colorado State University Cooperative Extension. No. ٢. ٩٣٨.

Selitrennikoff, G.P. (٢٠٠١). Antifungal proteins. Applied and Environ. Microbiol., ٦٧: ١-١٥.

Sivan, A.; Elad, Y. and Chet, I. (١٩٨٤). Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythinm aphanidermatum*. Phytopathol., ٧٤: ٤٩٨-٥٠١.

Sivan, A. and Chet, I. (١٩٨٩_a). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes from *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol., ١٣٥: ٦٧٥-٦٨٢.

Sivan, A. and Chet, I. (١٩٨٩_b). The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* of rhizosphere colonization. Phytopathol., ٧٩: ١٩٨-٢٠٣.

Somogyi, M. (١٩٥٢). Notes on sugars determination. J. Biol. Chem. ١٩٥٢: ١٩-٢٣.

Specht, L.P. and Leach, S.S. (١٩٨٧). Effects of crop rotation of *Rhizoctonia* disease of white potato. Plant Dis., ٧١: ٤٣٣-٤٣٧.

Sutrisno, A.; Ueda, M.; Abe, Y.; Nakazawa, M. and Miyatake, K. (٢٠٠٤). A chitinase with high activity toward partially N-acetylated chitosan from a new, Moderatly thermophilic, chitin-degrading bacterium. *Ralstonia* sp. A- ٤٧١. Appl. Microbiol. Biotechnol., ٦٣: ٣٩٨-٤٠٦.

Tanner, R.S. (١٩٩٧). Cultivation of bacteria and fungi. In: Manual of environmental microbiology (ed. Hurs, C.J.; Knudsen, G.R.; Mclnerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V.) American Society for Microbiology, Washington. pp. ٥٢-٦٠.

Taylor, G.; Jabaji-Hare, S.; Charest, P.M. and Khan, W. (٢٠٠٢). Purification and characterization of an extra cellular exochitinase, beta-N-acetylhexosaminidase from the fungal mycoparasite *stachybotrys elegans*. (٢٠٠٢). Can. J. Microbiol., ٤٨: ٣١١-٣١٩.

Tikhonov, V.E.; Lopez-Llorca, L.V.; Salinas, J. and Jansson, H. (٢٠٠٢). Purification and characterization of chitinase from the nemato phagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. Fungal Genetics and Biology, ٣٥: ٦٧-٧٨.

Tronsmo, A. (١٩٨٩). *Trichoderma harzianum* used for biological control of storage rot on carrots. Norwegian J. of Agricul. Sci., ٣: ١٥٧-١٦١.

Tronsmo, A. and Dennis, C. (١٩٧٨). Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichderma* species. Trans. Br. Mycol. Soc., ٧١: ٤٦٩-٤٧٤.

Tweddell, R.J.; Jabaji-Hare, S.H. and Charest, P.M. (١٩٩٤). Production of chitinase and *B*-١,٣-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Appl. and Environ. Microbiol., ٦٠: ٤٨٩-٤٩٥.

Ulhoa, C.J. and Peberdy, J.F. (١٩٩٢). Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. Enzyme and Microb Technol., ١٤: ٢٣٦-٢٤٠.

Van Loon, L.C.; Baker, P.A. and Pieterse, C.M. (١٩٩٨). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Ann. Rev. Phytopathol., ٣٦: ٤٥٣-٤٨٣.

Wells, H.D. (١٩٨٨). *Trichoderma* as a biocontrol agent. Plant disease, ١: ٧٢-٨٢.

Wells, H.D.; Bell, D.K. and Jaworsk, C.A. (١٩٧٢). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathol., ٦٢: ٤٤٢-٤٤٧.

Whipps, J.W. (١٩٨٧). Effect of media on growth and interactions between arrange of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New Phytol., ١٠٧: ١٢٧-١٤٢.

Wilhite, S.E.; Lumsden, R.D. and Straney, D.C. (١٩٩٤). Mutantional analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungs *Gliocladium virens* in relation to suppression of *pythium* damping-off. Phytopathol., ٨٤: ٨١٦-٨٢١.

Yedidia, I.; Benhamou, N. and Chet, I. (١٩٩٩). Induction of defense response in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol., ٦٥: ١٠٦١-١٠٧٠.

Zaldivar, M.; Velasquez, J.C.; Contreas, I. and Perez, L.M. (٢٠٠١). *Trichoderma auroviride* ٧-١٢١, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential used in waste cellulose degradlation and/or biocontrol. Electronic J. of Biotechnol. Environ. Biotchnol, ٤: ١-١٢.