التأثير التطفيري للبينوميل والفنكلوزولين في فطر *Trichoderma viride* وإنتاج انزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة ♦

رغد نبهان العزو رياض خليل البرهاوي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

ABSTRACT

This study was conducted aiming to obtain an efficient fungal isolate in cellulase and single cell protein production from a local isolate *Trichoderma viride* by the mutation effect of Benomyl and Vinclozolin.

It was found that Benomyl has a lethal effect on the isolate at all concentrations of the fungicide and spores suspension used, at the same time it was found that Vinclozolin has an obvious mutational effect on the parental isolate at the concentration 2.0 mg active material/ml of standard medium, the parental isolate showed clear morphological changes in colony shapes, colors, ability for growth in addition to the profound changes in fungal mycelia which was confirmed by the application of slide culture technique.

A qualitative and quantitative tests have been carried out to explore the efficiency of the new mutant for cellulase and single cell protein production in solid and liquid media, it achieved cellulase specific activity and single cell protein (3.604 micromole/min/mgm protein and 29.474 % protein in dry weight) respectively.

الخلاصة

اجري البحث بهدف الحصول على عزلة فطرية كفوءة في انتاج انزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة بوساطة عزلة محلية من فطر *Trichoderma viride* بفعل التأثير التطفيري لمبيدي الفطريات البينوميل والفنكلوزولين .

لم يتم الحصول على عزلة طافرة بفعل مبيد البينوميل اذ كان له تأثير قاتل بكافة تراكيز المبيد ولجميع تراكيز العالق البوغي المستخدمة ، في حين لوحظ ان لمبيد الفنكلوزولين تأثيراً تطفيرياً واضحاً على عزلة الفطر الأبوية وبالتركيز 2.0 ملغم مادة فعالة / مل وسط قياسي ، والتي ابدت فيه العزلة الابوية تغيرات مورفولوجية واضحة ومميزة عمّا كانت عليه مثل تعرضها للمبيد ، اذ شملت تبدلات في كل من شكل المستعمرة ولونها وقابليتها على النمو وانتاج الابواغ فضلاً عن التغيرات الدقيقة للغزول الفطرية والتي امكن ملاحظتها من خلال الفحص المجهري باستخدام طريقة الزرع على الشريحة.

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 – 5 أيلول 2007

وقد تم اجراء اختبار نوعي لمعرفة كفاءة العزلة الجديدة الطافرة في انتاج انزيم السليوليز في الاوساط الصلبة ، كما اجري اختبار كمي بأستخدام الاوساط السائلة لتحديد كفاءة العزلة في انتاج انزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة اذ حققت فعالية نوعية لانزيم السليوليز قدّرت بـــ (3.604) مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين ونسبة بروتين 29.474 % في الوزن الجاف .

المقدمة

يعد فطر *Trichoderma viride* أكثر أنواع الـ *Trichoderma* أهميةً في إنتاج انزيم السليوليز Cellulase لكونه من افضل المصادر في تحليل السيليلوزات التي تعد أكبر المصادر الكاربونية على سطح الكرة الأرضية والتي تستخدم لإنتاج الكلوكوز والكحول وبروتين الخلية الواحدة وأنواع أخرى من منتجات التخمر(1 ، 2 ، 3) .

وقد تم إنتاج العديد من العزلات الطافرة المقاومة للمبيدات من هذا الفطر ، وان أول محاولة من هذا النوع تمت في الولايات المتحدة الأمريكية أمكن فيها إنتاج طرز حيوية من *T.viride* و*T.harzianum* مقاومة للبينوميل بتراكيز تتراوح بين 0.05 – 0.5 ملغم / مل من الوسط الغذائي باستخدام الأشعة فوق البنفسجية بعد أن كانت حساسة له بالتراكيز 0.1 – 0. 5 ملغم / لتر (4 ، 5) ، كما استطاع Abd-Elmoity وآخرون (6) من الحصول على عزلات مطفرة . وفي العراق حصل طه والبهادلي (7) على عزلات مقاومة لتراكيز عالية من مبيد البينوميل وذلك بتطفيرها بأشعة كاما ، كما تم استخدام أشعة كاما للحصول على طفرات من الفطرين *T. hamatum* Bonord و *T.harzianum* Rifai مقاومة لفعل البينوميل بتراكيز تتراوح بين 5 – 40 ملغم / لتر (8) ، وقد توصل Nakkeeran وآخرون (9) الى الحصول على سلالات طافرة من الفطر *T.viride* وذلك بتعريض كونيديا الفطر للمطفرات الفيزيائية والكيميائية مثل UV rays و Gamma rays و N-methyl – N-nitro – N-nitrosoguanidine. كما لوحظ أنه باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ومادة Nitrosoguanidine (MNNG) تم الحصول على سلالات طافرة من الفطر *T.reesei* WX-112 تتمتع بإنتاجية عالية من أنزيم الـ Cellulase تقدر بـــ 1.95 مرة أكثر من السلالة الأبوية (10). لذا يهدف البحث الى الحصول على عزلة طافرة بفعل تأثير مبيدي البينوميل والفنكلوزولين ومقارنتها مع عزلة الفطر الابوية *T.viride* من حيث قابليتها على النمو وانتاج انزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة .

المواد وطرائق العمل

1- الفطر المستخدم

أجريت جميع التجارب باستخدام عزلة محلية من فطر *Trichoderma viride* والتي تم الحصول عليها من الدكتور نديم احمد رمضان في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل .

2- الأوساط الزرعية

أ. وسط أكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar

كان الغرض من استخدام هذا الوسط حفظ الفطر وتنشيطه (11) .

ب. الوسط القياسي Standard medium

أجريت جميع التجارب باستخدام هذا الوسط (12) وكانت الغاية من استخدام هذا الوسط لأغراض التفريق فضلا عن ملاحظة التغيرات المورفولوجية للمستعمرات والفحص المجهري .

3- المبيد الفطري البينوميل Benomyl (BEN)

استخدم المبيد الفطري Benomyl (Benlate) المجهز من قبل شركة Du Pont/USA وبالتراكيز (0.025 و0.05 و0.1 و0.2 و0.3 و0.4 و0.5 و0.75 و1.0 و1.25 و1.5 و2.0 و2.5) ملغم مادة فعالة / مل وسط قياسي . وبتراكيز العالق البوغي (110 و210 و310 و410 و510) (8).

4- المبيد الفطري الفنكلوزولين Vinclozolin (VIN)

استخدم المبيد الفطري Vinclozolin (Ronilan) المجهز من قبل شركة BASF/Germany وبالتراكيز (1.5 و2.0 و2.5 و3.0 و3.5 و4.0) ملغم / مل وسط قياسي .

5- أقلمة العزلة الطافرة

تمت أقلمة العزلة الطافرة الناتجة من الفطر *T.viride* وذلك بنشر العالق البوغي لهذه الطافرة في أطباق بتري تحتوي على الوسط الزرعي القياسي الحاوي على نفس التركيز المؤثر من المبيد الذي ظهر به التأثير المطفر وكررت العملية خمس مرات وبفترة تحضين 5 ايام بكل مرة وعند درجة حرارة 28 ± 1 مْ (8) المحورة .

6-تشخيص التغيرات الحاصلة للعزلة الطافرة

تم تشخيص التغيرات المورفولوجية التي طرأت على الفطر جراء استخدام مبيد الفنكلوزولين وذلك باستخدام طريقة Slide Culture Technique (13) .

7- تسمية العزلة الطافرة

سميت العزلة الطافرة وذلك بإعطاءها رمزاً أولياً يتكون من الحروف الإنكليزية الثلاثة الأولى الكبيرة من اسم الصفة التي يدل عليها وهي المقاومة للمبيد المستخدم ثم اتبعت بالتركيز ذات التاثير التطفيري ضمن الجدول ذات العلاقة.

8- دراسة النشاط الأنزيمي :

أ.الكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز باستخدام كاشف يود – حامض الهيدروكلوريك HCl-Iodin

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Yeoh وآخرون (14) لتحضير الوسط الزرعي الخاص بهذا الاختبار . يستدل على إنتاج الأنزيم باستخدام الكاشف يود- حامض الهيدروكلوريك HCl-Iodin فقد أضيف المحلول الكاشف الى الطبق الحاوي على المستعمرة الفطرية النقية وترك لعشرة دقائق ثم سكب المحلول وترك الطبق لدقائق ، ولوحظ ظهور هالة فاتحة اللون حول المستعمرة الفطرية دلالة على تحول الكاربوهيدرات المعقدة الى سكريات بسيطة .

ب. الكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز بدون استخدام كاشف يود – حامض الهيدروكلوريك

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Hankin و Anagnostakis (15) للكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز وبدون استخدام كاشف يود- حامض الهيدروكلوريك باستخدام وسط الكاربوكسي مثيل سليلوز Carboxy methyl cellulose medium ، وتم تحديد قابلية العزلة الطافرة على انتاج انزيم السليوليز وذلك باستخدام المعادلة الآتية :

$$\text{قابلية العزلة الطافرة من الفطر } T.viride \text{ لإنتاج أنزيم السليوليز} = \frac{\text{قطر هالة التحلل}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية}}$$

9- الوسط الغذائي الخاص لإجراء الاختبار الكمي Quantitative test لبيان إنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة .

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Mandels و Sternberg (12) لتحضير الوسط الغذائي الخاص بهذا الاختبار ، بعد التلقيح وضعت الدوارق في الحاضنة عند درجة حرارة 28 ± 1 مْ ولمدة أسبوع ، بعدها سحبت الدوارق من الحاضنة وتم تسجيل الأس الهيدروجيني النهائي وقدرت الكتلة الحيوية والنشاط الأنزيمي للسليوليز مقّدراً بالفعالية النوعية للانزيم كما قدرت كمية البروتين .

10- طرائق التحليل

أ. تقدير الوزن الجاف

أجريت عملية الترشيح للوسط الغذائي باستخدام ورقة ترشيح مجففة وموزونة مسبقا من نوع (Whatman No. 1) ثم جففت في فرن كهربائي عند درجة 70 مْ ولمدة 24 ساعة بعدها تم قياس الكتلة الحيوية بفارق الوزن بين الكتلتين باستخدام ميزان حساس (Shimadzu AW 320) .

ب. قياس فعالية أنزيم السليوليز

تم قياس فعالية أنزيم السليوليز اعتماداً على قياس أحد نواتج التفاعل وهو سكر الكلوكوز D-glucose المتحرر من ورقة الترشيح حسب الطريقة الموصوفة من قبل Mandels و Sternberg (15) طريقة Filter paper assay ، وقد أستخدمت وحدة مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين لتقدير الفعالية النوعية للانزيم ، وتم حساب تركيز سكر الكلوكوز المتحرر بالاعتماد على المنحني القياسي المحضر باستخدام سكر الكلوكوز بوصفه سكراً قياسياً .

ج. استخلاص وتقدير البروتين

قدرت كمية البروتين في الوزن الجاف باستخدام طريقة Lowry وآخرون (16) وتضمنت الطريقة تفاعل البروتين مع الكاشف المستخدم وهو كاشف الفولن Folin - ciocalteu's reagent المنشط بعنصر البروم وتم تقدير تركيز البروتين في المستخلص الانزيمي اعتمادا على المنحنى القياسي .

11- التحليل الإحصائي

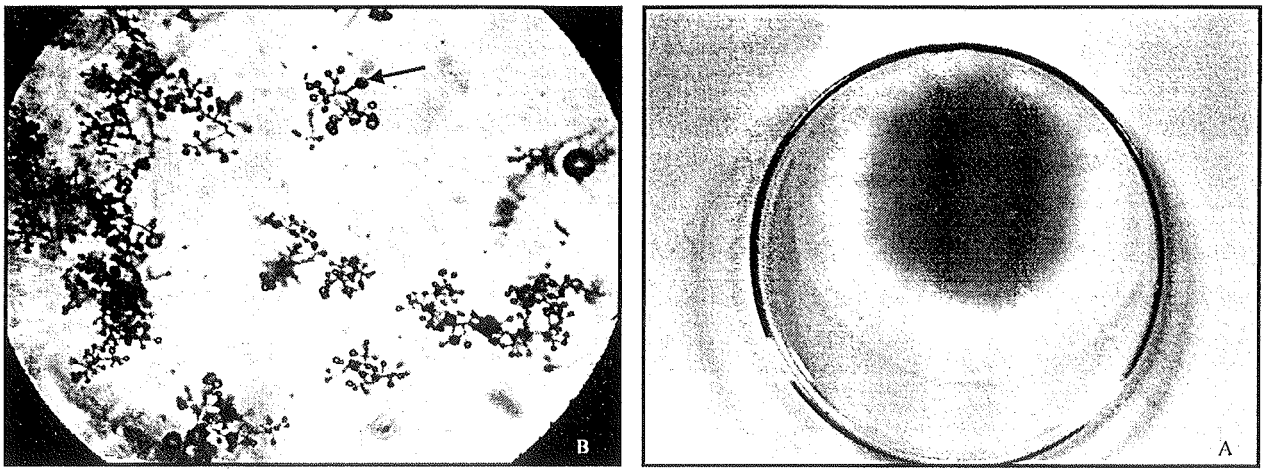
أجريت تجربة عاملية باستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Random Design (C.R.D.) وحللت النتائج إحصائياً واختبرت باستخدام طريقة دنكن Duncan method (17) لمعرفة ما اذا كان هنالك فرق معنوي بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 للتجارب التي تم إجراؤها.

النتائج والمناقشة

عدت عزلة الفطر المحلية *T.viride* عزلة أبوية في جميع الاختبارات التي اجريت إذ استخدمت بتركيز 7 x 410 بوغ / مل ، وقد تميزت مستعمرات الفطر باللون الاخضر والاخضر الفاتح على الوسط القياسي ، أما بالفحص المجهري فقد تبين انها قد نمت بشكل أبواغ اعتيادية موزعة على الحامل البوغي المتفرع .

الأثر الطفري للمبيدات

تم اختبار تأثير تراكيز متصاعدة من مبيدي الفطريات البينوميل والفنكلوزولين في عزلة محلية من الفطر *T.viride* (العزلة الأبوية) من حيث نموها وإنتاجها للأبواغ فضلا عن التغيرات المورفولوجية المصاحبة لتأثير المبيد . وقد تم حساب متوسط العدد الحي للمستعمرات النامية ومنه تم استخراج النسب المئوية للقتل لتحديد مدى الاختزال في عدد الأبواغ نتيجة سمية المواد الكيميائية المستخدمة .



الشكل (1) : العزلة الأبوية *T.viride*

A : المستعمرة الابوية للفطر *T.viride* النامية على الوسط الزرعي القياسي .

B: صورة بالمجهر توضح الأبواغ الاعتيادية .

دقة الصورة 72 بكسل / انج .

وقد وجد من خلال هذه الاختبارات أن عزلة الفطر الأبوية كانت حساسة جداً للمبيد البينوميل Benomyl بكافة التراكيز المستخدمة للمبيد ولجميع تراكيز العالق البوغي ولفترة تحضين استغرقت 10 ايام ، وكانت النتيجة متطابقة عند تكرار التجربة عدة مرات ، وقد تم إثبات ان لهذا المبيد تأثيراً ساماً قاتلاً للعزلة الأبوية وليس له أي تأثير تطفيري . وترجع حساسية عزلة الفطر الأبوية *T.viride* للمبيد الفطري Benomyl إلى تفاعله مع خيوط المغزل ، وهذا ما أكدته إحدى النظريات للفعل القاتل للمبيد (18) . وقد جاءت النتائج مقاربة لما توصل اليه طه (19) ، كما لم يتمكن البينوميل من تطفير العزلة المحلية النامية عليه على الرغم من انه يعد من المبيدات الناشطة والتي من الممكن ان تحدث تطفيراً للفطريات وتنتج طرزاً حيوية جديدة عن طريق احداث طفرات جينية أو كسراً في الكروموسومات أو انقساماً بدون ارتباط المادة الوراثية أو انقساما بحدوث عبور في المادة الوراثية (20) ، وقد يعود السبب في النتيجة التي تم الحصول عليها في هذا البحث لكون التراكيز المستخدمة عالية جداً بحيث سببت ضرراً كبيراً في المادة الوراثية بحيث لم تستطع خلية الفطر اعادة بنائها بالشكل الذي يؤمن ديمومتها .

تظهر نتائج الجدول (1) قدرة العزلة الأبوية على مقاومة تراكيز المبيد Vinclozolin لكل مل من الوسط القياسي ، ومن خلال المشاهدة العيانية لوحظ ان

المستعمرات النامية على جميع تراكيز المبيد قد أبدت تغيرات ومعالم مورفولوجية مختلفة عما كانت عليه قبل تعرضها للمبيد ، وقد تم اختيار المستعمرات النامية على التركيز 2.0 ملغم من المبيد Vinclozolin نتيجة لوضوحها وتميزها عن المستعمرات النامية على تراكيز المبيد الاخرى من حيث شكل المستعمرة ولونها وقابليتها على النمو ، ولكن ما تم استبيانه ان تراكيز المبيد الأخرى ابتداءً من التركيز 3.0 ملغم / مل كان لها تأثيراً تثبيطياً لنمو المستعمرة، الشكل (2) . وعلى هذا الأساس اخذت المستعمرات النامية على التركيز 2.0 ملغم من المبيد والتي عدت طافرات مزعومة وتمت اقلمتها على نفس التركيز 2.0 ملغم / مل من المبيد لكي تتشبع بالمبيد ثم يصل المبيد الى هدفه الرئيس في الخلية وهو الـ DNA ، وللتأكد من ثبات الصفة المستحدثة في هذه الطافرات تمت تنميتها عدة مرات على وسط زرعي خالٍ من المبيد ولاثبات ان الطفرة الوراثية قد حدثت في الـ DNA وليس تغيرا فسيولوجيا في الخلية . وبعد ذلك شخصت فلوحظ انها قد نمت بشكل أبواغ كلاميدية طرفية وبعدد قليل ، الشكل (2) ، وقد أعطيت الرمز (VIN2.0) .

كما لوحظ ان متوسط اعداد المستعمرات النامية قد أخذت بالتناقص التدريجي بازدياد تراكيز المبيد ، في حين ازدادت النسبة المئوية لقتل الأبواغ بزيادة هذه التراكيز ، الجدول (1) .

وجاءت النتائج متفقة مع ما توصل اليه Chastagner (21) من الحصول على سلالات مقاومة من الفطر *Botrytis tulipae* عن طريق وضع الـ Conidia لهذا الفطر على وسط Potato Dextrose Agar (PDA) الحاوي على المبيد الفطري Vinclozolin حيث لاحظ هذا الباحث ان معدل النمو لهذه السلالات المقاومة بلغ حوالي نصف نموها قبل تعرضها للمبيد . وهذه النتيجة ايضا تعد مقاربة لما توصل اليه Li وآخرون (22) بأن التركيز 4000 مايكروغرام مادة فعالة لكل مل من المبيد Vinclozolin قد أحدث تثبيطاً كاملاً لنمو غزول الفطر *Ulocladium atrum* . وتظهر الاختلافات النوعية الكبيرة في مقاومة عزلة الفطر للمبيد الفطري Vinclozolin والذي يعد من المبيدات الفعالة والمتخصصة لمكافحة الفطريات الناقصة وبالأخص فطري *Botrytis* و *Sclerotinia* (23) حيث يشير ذلك الى وجود خصوصية في تأثير المبيد على الأنواع المختلفة .

الجدول (1) : تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الفطري Vinclozolin في متوسط أعداد مستعمرات العزلة الأبوية *T.viride*

تراكيز المبيد (ملغم/مل)	متوسط أعداد المستعمرات الثانوية في تركيز العالق البوغي 102	%للأبواغ المقتولة	متوسط أعداد المستعمرات الثانوية في تركيز العالق البوغي 103	%للأبواغ المقتولة	متوسط أعداد المستعمرات الثانوية في تركيز العالق البوغي 104	%للأبواغ المقتولة	متوسط أعداد المستعمرات الثانوية في تركيز العالق البوغي 105	%للأبواغ المقتولة	
1.5	30.333 (2.51)	96.490	18.333 (2.08)	80.907	6.666 (2.08)	37.467	0*	100	
2.0	24.0 (2.64)	97.222	11.666 (1.52)	87.850	4.333 (0.57)	59.352	0	100	VIN2.0
2.5	17.333 (3.05)	97.994	6.333 (1.52)	93.404	2.333 (1.52)	78.114	0	100	
3.0	12.333 (2.08)	98.572	4.0 (1.0)	95.834	1.666 (1.15)	84.371	0	100	
3.5	8.666 (2.51)	98.997	2.333 (1.15)	97.570	1.0 (1.15)	90.619	0	100	
4.0	4.333 (1.52)	99.498	0.333 (0.57)	99.653	0 (0)	100	0	100	

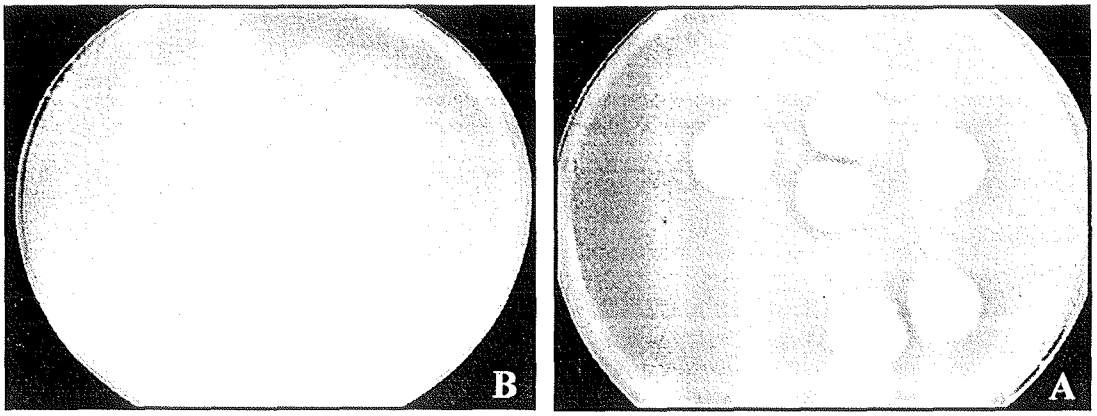
VIN2.0 : يشير الى رمز العزلة الطافرة الناتجة من المبيد الفطري Vinclozolin والمتبوعة بالتركيز المؤثر للمبيد (2.0 ملغم/مل) .

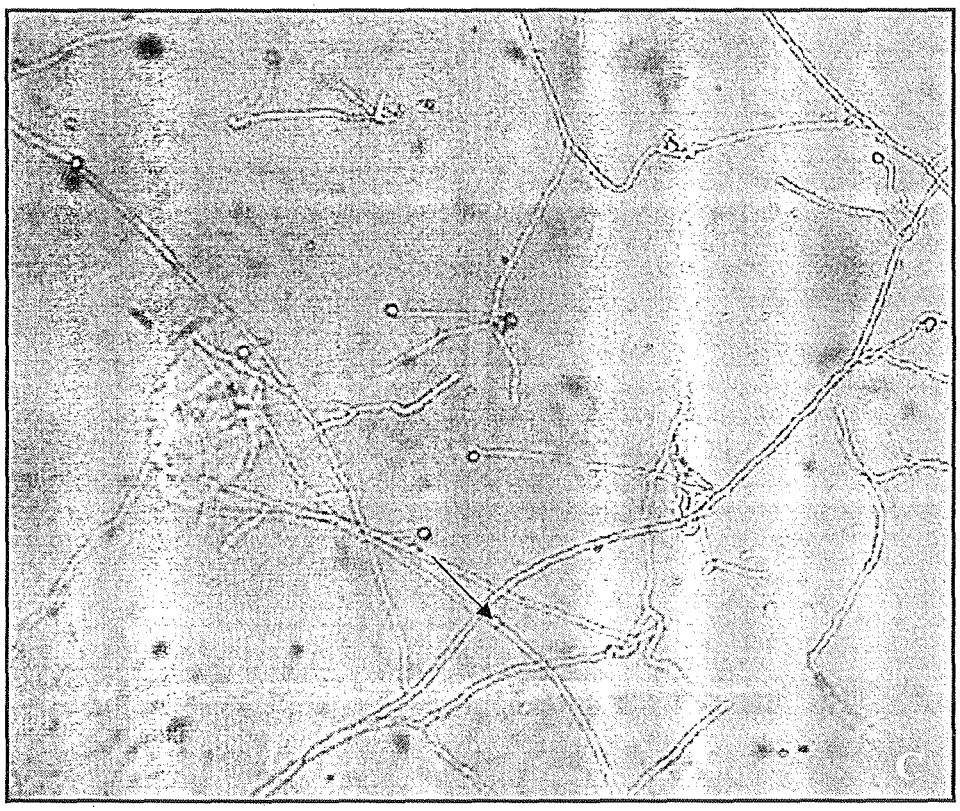
*0 : يشير الى عدم وجود نمو .

– : 101 بوغ / مل أظهرت نمواً كثيفاً ومتداخلاً للمستعمرات لم يتمكن من عدها .

– : كل رقم يمثل معدلاً لثلاث مكررات ، والارقام بين الاقواس تمثل الانحراف المعياري (SD ±) .

– : فترة التحضين 5 أيام ، ودرجة حرارة التحضين 28 ± 1 °م .





الشكل (4) : العزلة الناتجة من المبيد الفطري Vinclozolin (VIN2.0)

A : نمو المستعمرات المقاومة للمبيد على الوسط القياسي الحاوي على تركيز المبيد (2.0 ملغم / مل) .

B : التاثير التثبيطي لنمو المستعمرات المقاومة للمبيد على الوسط القياسي الحاوي على تركيز المبيد (3.5 ملغم / مل) .

C : صورة بالمجهر توضح طبيعة الأبواغ الكلاميدية .

دقة الصورة 72 بكسل / انج .

كفاءة العزلة الطافرة لإنتاج أنزيم السليوليز Cellulase باستخدام كاشف يود – حامض الهيدروكلوريك أو بدونه

لقد كشف عن كفاءة عزلات الفطر لإنتاج أنزيم السليوليز وكما موضح في الجدول (2) ، إذ لوحظ أن العزلة الطافرة VIN2.0 مع العزلة الأبوية *T.viride* قد أعطت كشفاً موجباً بقدرتها على إنتاج الأنزيم مع وجود اختلافات واضحة بينها في هذه الكفاءة اذ ان العزلة الطافرة قد قل نشاطها الانزيمي مقارنة مع العزلة الابوية اذ اظهرت نشاطا انزيميا ضعيفا (+) ، الشكل (3) . وكان ذلك في الطريقة الاولى وبشكل عام ، اما في الطريقة الثانية فقد لوحظ حدوث اختلاف في النسب المتحققة وكما يأتي: 3.986 و 5.327 وعلى التوالي وباستخدام كلتا الطريقتين للكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز طريقة Yeoh وآخرون (14) وطريقة Hankin و Anagnostakis (15) إذ كانت النتائج متماثلة في كلتا الطريقتين . وبصورة عامة نلاحظ وجود علاقة طردية بين قطر هالة التحلل وكفاءة العزلة في إنتاج الأنزيم فكلما ازدادت قدرة العزلة على إنتاج أنزيم السليوليز ازداد قطر هالة التحلل . وغالباً ما تستخدم طريقة الوسط الصلب الحاوي على مادة الـ CMC وهي المادة السليلوزية الذائبة في الماء في الكشف النوعي عن أنزيم السليوليز (24 ، 25) . وعلى ضوء النتائج السابقة اتضح ان العزلة الطافرة كانت ضعيفة في انتاجيتها للانزيم ويعود ذلك لكون الضرر المتسبب عن مبيد الفنكلوزولين في الـ DNA كبيراً جداً وانعكس ذلك على إنتاجيتها للأنزيم . فقد ذكر De Serries (26) ان المواد الكيميائية التي تسلك سلوك المطفرات قد تكون اكثر اهمية واحداثا للخلل الوراثي والتغيرات الدائمية في جزيئة الـ DNA من الاشعاع .

الجدول (2) : كفاءة عزلات الفطر لإنتاج أنزيم السليوليز Cellulase باستخدام طريقة الاوساط الصلبة

عزلات الفطر	الكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز	
	باستخدام كاشف الايودين	بدون استخدام كاشف الايودين
العزلة الأبوية *T. viride*	++	(0.014) 5.327
VIN2.0	+	(0.005) 3.986

– كل قيمة تمثل معدلاً لثلاث مكررات ، والقيم بين الأقواس تمثل الانحراف المعياري (±SD) .

+ يمثل كفاءة العزلة لإنتاج أنزيم السليوليز ، وتكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية بقطر (2.5–4.0) ملم .

++ يمثل كفاءة العزلة لإنتاج أنزيم السليوليز ، وتكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية بقطر (4.0–5.5) ملم .

الشكل (3) : إنتاج أنزيم السليوليز من قبل عزلات الفطر *T. viride*

A : العزلة الابوية *T.viride*

B : العزلة الطافرة VIN2.0 الناتجة من المبيد الفطري Vinclozolin (2.0 ملغم / مل)

كفاءة العزلة الطافرة لإنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة باستخدام الوسط السائل

أظهرت نتائج دراسة كفاءة عزلة الفطر الطافرة الناتجة بعد معاملتها بمبيد الفنكلوزولين أن هناك تبايناً معنوياً واضحاً بين هذه العزلات في معدلات نموها وكفاءتها لإنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة مقارنة مع العزلة الأبوية *T.viride* ، فقد تباينت عزلات الفطر في مقدار الوزن الجاف وهو تعبير عن الكتلة الحيوية للعزلة + بقايا السليلوز معنوياً وبشكل عام ، اذ تحقق اعلى وزن جاف (0.474) غم / 100 مل بالنسبة للعزلة الطافرة VIN2.0 مقارنة مع العزلة الابوية (0.178) غم / 100 مل . أما بالنسبة للأس الهيدروجيني النهائي للوسط الغذائي فقد لوحظ فروقات معنوية في عزلات الفطر عن الأس الهيدروجيني الابتدائي 6.0 ، الجدول (3) . بصورة عامة فقد لوحظ ان قيم الاس الهيدروجيني النهائي قد ارتفعت عن الاس الهيدروجيني الابتدائي ، اذ ان اعلى قيمة معنوية للاس الهيدروجيني النهائي قد بلغت (7.038) وذلك مع العزلة الابوية *T.viride* مقارنة مع العزلة الطافرة VIN2.0 (6.853) . أما فيما يتعلق بإنتاج العزلة لبروتين الخلية الواحدة فمن الواضح وجود فروقات معنوية فيما بينها في قدرتها على إنتاج البروتين ، إذ بلغ أعلى نسبة للبروتين في الوزن الجاف للعزلة الطافرة VIN2.0 (29.474 %) . أما العزلة الأبوية *T.viride* فكانت تحوي أقل نسبة بروتين في وزنها الجاف (23.774 %) . أما بالنسبة للنشاط الأنزيمي لعزلة الفطر في إنتاج أنزيم السليوليز فقد لوحظ وجود فروقات بينها في إنتاج الأنزيم بالمقارنة مع العزلة الأبوية ، الجدول (3) ولقد جاءت النتائج التي تم الحصول عليها مطابقة لنتائج الوسط الصلب لكفاءة هذه العزلات في إنتاج أنزيم السليوليز ، اذ حققت العزلة الابوية اقصى انتاج لانزيم السليوليز مقدرا بالفعالية النوعية للانزيم بلغت (5.014) مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين ، اما اقلها انتاجا فهي العزلة الطافرة VIN2.0 والتي اثبت التقدير النوعي للكشف عن انزيم السليوليز في الوسط الصلب ان هذه العزلة كانت ضعيفة في انتاجها لانزيم السليوليز ، وان التقدير الكمي لانزيم السليوليز اثبت ان العزلة

الطافرة VIN2.0 لها القابلية على انتاج انزيم السليوليز ولكنها ضعيفة حيث كانت قيمة الفعالية النوعية للانزيم (3.604) مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين . وتعزى النتائج المستحصلة الى وجود اختلاف بين قدرة هذه العزلة على استغلال الوسط الزرعي ومدى ملائمة الأس الهيدروجيني للوسط الغذائي لهذه العزلة وهذا مما أثر في كفاءتها لإنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة ، لذلك فان عملية إنتاج أنزيم السليوليز تختلف باختلاف العزلة الفطرية الطافرة التي تم الحصول عليها من العزلة الأبوية وهذا ما أكده Mandels (27) .

الجدول (3) : كفاءة عزلات الفطر لإنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة باستخدام الوسط السائل

عزلات الفطر	الوزن الجاف (غم / 100 مل)	الاس الهيدروجيني النهائي	% للبروتين في الوزن الجاف	الفعالية النوعية للأنزيم (مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين)
العزلة الابوية *T. viride*	0.178 b(0.018)	7.038 a(0.042)	23.774 b(0.191)	5.014 a(0.011)
VIN2.0	0.474 a(0.027)	6.853 b(0.047)	29.474 a(0.333)	3.604 b(0.002)

- القيم المتبوعة بأحرف مختلفة عمودياً تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد المدى ، وكل قيمة هي معدل لثلاث مكررات ، والقيم بين الاقواس تمثل الانحراف المعياري (±SD) .
- فترة التحضين 7 ايام ، تركيز السليلوز 10 غم / لتر ، والأس الهيدروجيني الابتدائي 6.0 ، ودرجة حرارة التحضين 28 ± 1 م ، ومدة التحضين للنشاط الأنزيمي 60 دقيقة ، وحجم المستخلص الفطري 0.5 مل .

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود ، التقنية الحيوية. مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر ، الموصل، العراق. 886 صفحة . (1990).

2- van Wyk, J. P. ; Mohulatsi, M., Bio. Resour Technol., 86: 21 – 23. (2003).

3- Wiseman, A., "Handbook of Enzyme Biotechnology". 2nd Ed., Eills Horwood Limited, New York, U.S.A., 457. (1985).

4- Papavizas, G. C. ; Lewis, J. A. and Abd-Elmoity, T. H., Phytopathology, 72 : 126–132. (1982).

5- Papavizas, G. C. and Lewis, J. A., Phytopathology, 73 : 407 – 411. (1983).

6- Abd–Elmoity, T. H. ; Papavizas, G. C. and Shatla, M. N., Phytopathology, 72 : 396 – 400. (1982).

7- طه ، خالد حسن وعلي حسين البهادلي ، تحضير مساحيق حاوية على طرز جديدة كبديل عن المبيدات باستخدام أشعة كاما. براءة اختراع من قسم الملكية الصناعية ، الجهاز

المركزي للتقييس والسيطرة النوعية ، وزارة التخطيط ، التصنيف الدولي AOIN التصنيف العراقي 3. (1993).

8- طه ، خالد حسن ، المجلة العراقية للعلوم الزراعية (زانكو). 8 (1) : 74 – 86. (2005, b).

9- Nakkeeran, S. ; Renukadevi, P. and Marimuthu, T., Archives of Phytopathology and Plant Protection, 38: 209 – 225. (2005).

10- Hao, X.C.; Yu, X.B. and Yan, Z.L., Food Technol. Biotechnol., 44: 89-94. (2006).

11- أحمد ، محمد علي ومحمد عبد الرزاق النواوي ، الفطريات الصناعية. الطبعة الأولى ، الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة ، مصر. 624 صفحة. (1999).

12- Mandels, M. and Sternberg, D., J. Ferment. Technol., 54: 267 – 286. (1976).

13- Aneja, K. R., "Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology". 4th Ed., New Age International (P) Limited publishers, pp. 83 – 88. (2003).

14- Yeoh, H. H. ; Khew, E. and Lin, G., Mycologia, 77 : 161 – 162. (1985).

15- Hankin, L. and Anagnostakis, S. L., J. Gen. Microbiol., 98 : 109 – 115. (1977).

16- Lowry, O. H. ; Rosebrough, N. J. ; Farr, A. L. and Randall, R. J., J. Biol. Chem., 193 : 265 – 275. (1951).

17- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H., "Principles and Procedures of Statistics". 2nd Ed., McGraw – Hill Company, Inc., London, U.K., 481. (1980).

18- Davidse, L. C., Annu. Rev. Phytopathology, 24:43–65. (1986).

19- طه ، خالد حسن ، المجلة العراقية للعلوم الزراعية (زانكو) ، 8 : 65 – 73. (2005, a).

20- Hastie, A. C., "Genetic Effects of Fungicides", Proc. IX Int. Congr. Pl. Prot, Washington. U.S.A. (Abstract) 351. (1979).

21- Chastagner, G. A., Acta Hort. (ISHS). 177 : 453–460. (1986). http://www. actahort. org/ books/ 177/177-64 htm.

22- Li, G. Q ; Huang, H. C. and Acharya, S. A., Can. J. Bot., 80: 892 – 898. (2002).

23- العروسي ، حسين وسمير ميخائيل ومحمد علي عبد الرحيم ، مكافحة الأمراض النباتية. مكتبة المعارف الحديثة ، الأسكندرية ، مصر 280 صفحة. (2003).

24- Mandels, M. ; Andreotti, R. and Roche, C., Biotechnol. Biocng. Symp., 6 : 21–33. (1976).

25- Ewad, M. J. S. ; Al – Tai, A. M. ; Abdul – Nour, B. A. ; Al – Attiyah, S. S. and Baban, R. S., J. Biol. Sci. Res., 20: 241–254. (1989).

26- De Serries, F. J., "Some Aspects of Chemical Mutagensis and Human Population Monitoring. An overview. In Chemical Mutagensis and Human Population Monitoring", In K. C. Bora; G. P. Douglus, and E. R. Nestman (eds.). Oxford, Elsevers Biomedical, U.K. pp. 107 – 110. (1982).

27- Mandels, M., Biotechnol and Bioeng. Symp., 5 : 81 – 105. (1975).