اختبار قابلية بعض عزلات TRICHODERMA HARIZIANUM على افراز بعض السموم الفطرية الترايكوثسينات TRICHOTHECIN (T_2 –TOXIN)

ابراهيم خضير ياس
قسم السيطرة النوعية
الشركة العامة لتصنيع الحبوب بغداد

عز الدين خزعل نجم
قسم السيطرة النوعية
الشركة العامة لتصنيع الحبوب
جامعة البصرة

وسن جعفر ابراهيم
قسم علوم الحياة
كلية التربية/ميسان

الخلاصـــــة

تم اختبار قابلية بعض عزلات من الفطر *TRICHODERMA HARIZIANUM* العزلة البرية tH-WT والعزلات المطفره المستحثة بالمطفر الكيمياوي NTG (tH-1-6 , TH-1-4 , TH-2-1 , TH-2-2 , TH-2-3) على افراز بعض السموم الفطرية الترايكوثسينات من نوع t2-TOXIN باستخدام كروماتوكرافي الطبقة الرقيقه (tHIN LAYER CHROMATOGRAPHY) واظهرت النتائج أن هذه العزلات غير قادرة على افراز هذه السموم مما يؤكد امكانية استخدامها بامان في برامج المقاومة الحياتية .

المقدمة INTRODUCTION

السموم الفطرية عبارة عن مركبات ايضية ثانوية sECONDARY METABOLITE حلقية تفرز عن بعض أنواع الفطريات مثل *ASPERGILLUS* ، *PENICILLIUM* ، *FUSARIUM* .... وغيرها في الاغذية والأعلاف مسببه ظهور أعراض التسمم الغذائي (هوارد،١٩٩٠) و (yAMZAKI URAGUCHI ، ١٩٧٨) و (rODRICKS وجماعته ، ١٩٧٧) .

تشمل السموم الفطرية العديد من المركبات والتي تختلف عن بعضها بالتركيب الكيمياوي وتأثيراتها السمية ومنها الافلاتوكسين، باتيولين، روبراتوكسين، ترايكوثسينات (whlie و morehouse ، ١٩٧٨) .

اشارت بعض البحوث أن بعض انواع الفطر trichoderma غير قادرة على افراز الترايكوثسينات (السراجي وجماعته، ١٩٩٦) و (ابراهيم وجماعته، ١٩٩٨) واشارت بحوث أخرى أن بعض انواع أخرى الفطر trichoderma تفرز الترايكوثسينات فقط ولا تفرز انواعاً اخرى، فقد ذكر (mirocha وجماعته ١٩٧٧) أن مركب trichodermin يفرز من T.lignorum و t.viride وان المركب Trichothecin يفرز من T. roseum .

استطاع عدد من الباحثين تحديد نوع وكمية السموم الفطرية المفرزة من قبل الفطريات باستخدام العديد من الطرق ومنها hplc , tlc , gc (chelkowski وجماعته ، ١٩٩٤) و (visconti وجماعته ١٩٨٤) و (Botalico وجماعته ، ١٩٨٩).

توسع الباحثون مؤخراً في استخدام بعض الاحياء المجهرية او منتجاتها الارضية في الصناعة بشكل كبير فقد قام السراجي (١٩٩٦) بانتاج انزيم مخثر للحليب من الفطر trichoderma. hamatum وانتج البروتييز القاعدية من بكتريا bacillus subtilis (radhi واخرون ١٩٩٥) كما استطاع mahdi (١٩٩٧) انتاج المضاد الحيوي الكلورتتراسيكلين من البكتريا الخيطية

ISSN-1994-697X

Urgent

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Streptomyces Aureofaciens . أن الكائن المجهري المنتخب للاستخدام في هذا المجال يجب أن يكون غير قادر على انتاج السموم (الحيدري والمصلح، ١٩٨٩) .

وفي دراسة سابقة قام بها ابراهيم (٢٠٠١) استخدم الفطر Trichoderma harizianum (العزلة البرية والعزلات المطفرة) بنجاح في المقاومة الحياتية ضد الفطر rizoctonia Solani . تهدف الدراسة الحالية إلى اختبار عزلات الفطر (Th- wt والعزلات المطفرة) Trichoderma harizianum على افراز بعض السموم الفطرية الترايكوثسينات من نوع T2 - toxin وذلك لضمان امكانية استخدامه في المقاومة الحياتية للحد من الفطر الممرض rizoctonia Solani والمسبب لمرض ذبول البادرات في عدد من المحاصيل ومنها الحنطة وبالتالي امكانية زيادة انتاج هذا المحصول اضافة إلى تقليل كلفة الانتاج لقلة استخدام المبيدات الفطرية وتقليل التلوث البيئي .

المواد وطرائق العمل Material & Methods

أولاً :- السلالات

استخدمت العزلة البرية للفطر Trichoderma harizianum (Th-wt) المعزولة والمصنفة من قبل حمودي (١٩٩٩) قسم علوم الحياة / كلية التربية جامعة البصرة .

استخدمت السلالات المطفره(th-1-6, th-1-4, th-2-3, th-2-2, th-2-1) باستخدام مادة النتروزوكواندين ntg بتركيز ٠,٠٦ % لزيادة مقاومتها للمضاد الفطري benomyl ذات قابلية عالية على مقاومة الفطر rizoctonia solani (ابراهيم ، ٢٠٠١) .

استخدام الفطر Fusarium solani المشخص في قسم علوم الحياة/ كلية التربية جامعة البصرة، كمعاملة مقارنة للكشف عن انتاج بعض السموم الفطرية .

ثانياً :- وسط انتاج السموم الفطرية

اعتمدت الطريقة التي ذكرها logrieco وجماعته (١٩٩٠) حيث حضر معلق الذرة وذلك بوزن ٧ غم ذرة صفراء / ١٠٠ مل ماء مقطر وتركت لمدة ١٨ ساعة ثم خلطه في خلاط كهربائي ووزع في دوارق مخروطية سعة ٢٥٠ مل وبواقع ٧٥ مل لكل دورق ثم عقمت بدرجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند / انج٢ لمدة ٤٥ دقيقة ثم بردت ولقحت بالفطر Th - wt والسلالات المطفرة Fusarium solani كل على حدة وبثلاث مكررات ووضعت الدوارق في هزاز بسرعة ١٢٠ دوره/دقيقة وحضنت بدرجة حرارة ١٨-٢٠ْم لمدة ٧ و ٢١ يوم ثم كشف على السموم الفطرية .

ثالثاً :- الكشف عن السموم الفطرية الترايكوثيسينات

استخدمت طريقة Charles و Steyn (1979) للكشف عن السموم الفطرية باستخدام كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة (tlc) حيث اخذ ١٠٠ مل من وسط انتاج السموم الفطرية بعد انتهاء مدة الحضن ووضع في خلاط كهربائي واضيف أليه ٤٠٠ مل من مزيج كلوروفورم – ميثانول (١:١) ثم رسبت المواد الصلبة غير الذائبة بجهاز الطرد المركزي، رشح الخليط واخذ الراشح وبخر وجفف واضيف له ٢٠٠ مل من خليط الهكسان – ميثانول (١:١) .

استبعدت طبقة الهكسان واخذت طبقة الميثانول وبخرت لحد الجفاف، اذيب المتبقي في ٢٠٠ مل من خليط كلورفورم – ماء (١:١) ثم اخذت طبقة الكلورفورم واضيف اليها كاربونات الصوديوم لحد الاشباع ثم ركزت إلى (٢-٥) مل .

اجري الكشف عن السموم الفطرية أن وجدت في طبقة الكلورفورم المركزة باستخدام صفائح الطبقة الرقيقة (tlc plates) المجهزة من شركة Merk (٢٠×٢٠) سم من نوع without fluorescence factor

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

رسم خط القاعدة على بعد ٢ سم من طرف الصفيحة ووضعت العينات بشكل نقاط (Spots) على خط القاعدة ووضعت الصفائح في اناء الفصل الذي يحتوي على مذيب كلوروفورم – ميثانول بنسبة ٩٧-٣ مل وترك المذيب ليصعد إلى ، اسم ، جففت الصفائح باستخدام الـ drier–hair ثم رشت بالمظهر واستخدم نوعين من المظهرات هي 2-4- dnp (2-4- dinitro Phenyl Hdroazine) وبالمظهر Vanilline ثم وضعت في فرن oven على درجة ١١٠ ْ م لمدة ١٠ دقائق وفحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية ٣٦٦ نانوميتر ففي حالة وجود السم الفطري يكون لون آل Spot برتقالياً في حالة المظهر الأول ورصاصي لماع في حالة المظهر الثاني .

النتائج والمناقشة :-

يبين الجدول (١) أن الفطر Trichoderma harizianum العزلة البرية Th - wt والسلالات المطفرة (th-1-6, th-1-1, th-2-3, th-2-2, th-2-1) غير قادرة على انتاج السموم الفطرية الترايكوثسينات نوع T2 - toxin مقارنة مع الفطر Fusarium Solani في وسط نقيح الذرة وهذا يتفق مع ما اشار أليه العديد من الباحثين المشتغلين في هذا المجال فقد ذكر mirocha واخرون (١٩٧٧) أن المركب trichodermin يفرز من الفطر Trichoderma Lignorum وviride Trichoderma والمركب Trichothecin يفرز من Trichoderma Roseum كما في دراسة لثلاثة عشر نوعاً من السموم الفطرية قام بها charles و Steyn (١٩٧٩) اشار إلى أن المركب T2 toxin - تفرزه انواع تابعة لجنس Fusarium فضلاً عن Trichoderma viride اضافة إلى ذلك لم تشير جميع البحوث المتوفرة من أن الفطر Trichoderma harizianum قادر على انتاج أي نوع من انواع السموم الفطرية (morehouse , wyllie, 1978) و (visconti وجماعته, 1992)

ومن خلال نتائج البحث نأكد على سلامة استخدام الفطر Trichoderma harizianum (العزلة البرية والسلالات المطفره بالـ ntg) في المقاومة الحياتية ضد الفطر rizoctonia solani.

جدول (١)

نتائج كروموتوكرافي الطبقة الرقيقة لاختبار قابلية العزلة البرية والسلالات المطفرة للفطر T. harizianum مقارنة مع الفطر F. solani

العزلة Strain	المظهر 2-4- DNP	المظهر Vanilline	قيمة rf	
F. solani	برتقالي	رصاصي	0.5	قادر على انتاج الترايكوثسينات
العزلة البرية T. harizianum	–	–	–	غير قادر على انتاج الترايكوثسينات
Th –2-1	–	–	–	غير قادر على انتاج الترايكوثسينات
Th –2-2	–	–	–	غير قادر على انتاج الترايكوثسينات
Th –2-3	–	–	–	غير قادر على انتاج الترايكوثسينات
Th –1-4	–	–	–	غير قادر على انتاج الترايكوثسينات
Th –1-6	–	–	–	غير قادر على انتاج الترايكوثسينات

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المصادر العربية..

ابـراهيم، وسـن جعفـر (1998) انتـاج وتحـسين انـزيم البروتييـز المخثـر للحليـب مـن الفطـر Trichoderma hamatum. رسالة ماجستير. جامعة البصرة، كلية الزراعة، قسم الصناعات الغذائية والألبان.

ابراهيم، وسن جعفر(٢٠٠١) زيادة قابلية الفطر Trichoderma harzianum. لمقاومة المضاد الفطري Benomyl باستخدام المطفر الكيمياوي NTG . مجلة المعلم الجامعي ، (٢٩٨).

الحيـدري، نظـام كـاظم عبـد الامير والمـصلح، رشـيد محجـوب (1989) الاحيـاء المجهريـة الصناعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد ، مطبعة دار الحكمة.

السراجي، انتصار حسن محمد (1996) انتاج انزيم مخثر للحليب من الفطر Trichoderma hamatum ودراسة خواصه واستخدامه في صناعة الجبن الطري. رسالة دكتوراه. جامعة البصرة، كلية الزراعة، قسم الصناعات الغذائية والالبان.

حمـودي ، عبـد الحميد محمد (1999) تـشخيص الفطـريات المتواجـدة فـي جـذور الحنطـة وتأثيرهـا علـى الفطرين الممرضيـن Fusarium gramnearum و Rhizoctonia solani . رسالة دكتوراه . جامعة البصرة، كلية التربية، قسم علوم الحياة.

هوارد، أز ، روبـرتس (1990) سـلامة الغـذاء . ترجمـة عـادل جـورج سـاجدي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة البصرة، مطبعة الجامعة.

المصادر الاجنبية

Botalico , A; Logrieco , A. & Visconti , A. 1989. Fusarium spp. And their micotoxins in infected corn in Italy. Mycopathologia, 107:85 - 92.

Chales , P. & Steyn , P.S. 1979. Screening methods for detection of thirteen common mycotoxins. J. of chromatography, 175 : 325 - 331.

Chlekowski , J. , Lew , H. ,& Pettersson , H. 1994 Fusarium poae (Peck) wollenw – Occuvence in maize ears , nivalenol Production and mycotoxin accumulation in cobs. Mycotxin Research, 10 : 166 – 120 .

Logrieco, A., Chelkowski, J. , Bottalico , A. & Visconti, A. 1990 . Further data on specific trichothecene production by Fusarium Sect. sporotrichiella strains. Mycol. Res. , 94 (5) : 587 – 589 .

Mahdi , K.H. 1997 . Isolation, identification and development of Streptomyces aureofaciens highly producing chlortetracycline strains from soils of southern Iraq. Ph. D. thesis; Basrah Univ. , Scie. Coll. , Iraq.

Mirocha, C.J., Pathre, S.V. & Christensen , C.M. 1977. Chemistry stachybotrysin mycotoxins; in (Wylie , T.D. & Morehouse, L.G. , eds.,

ISSN-1994-697X

Urgent

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Mycotoxic Fungi , Mycotoxins and mycotoxicoses , Vol .1) . Marcel Dekker . New yourk, pp. 365–420.

Radhi , R.O. , Al – Delaimy , K. J. & Hadwan , H.A. 1995. Production of Alkaline protease from Bacillus subtilis and its application in hides bating. Iraq J. Microbiol. , 7 (1) : 43 – 51 .

Rodricks, J.; Hesseltine , C. & Mehlman, M. 1977. Mycotoxins in Human and Animal health, pathotox publishers; Park Forest south.

Visconti, A., Mirocha, C. , Logrieco, A. , Bottalico, A. & Michele, S. 1989. Mycotoxins produced by Fusarium acumiratum isolation and characterization of acuminatin : anew trichothecene. J. Agric. Food Chem. , 37 (5) : 1348 –1351.

Visconti, A. , Fiorenza , M. , Michele , S. , Bottalico , C. & Giacomo, L. 1992. Toxicity of some Fusarium section Sporotrichiella strains in relation to mycotoxin production .Applied and Envi. Microbiol., 769 – 772.

Wylie , T.& Morehouse , L. 1978 . Mycotoxin Fungi Mycotoxins, mycotoxicoses. Vol. 3 . Marcel dekker INC, USA.

Yamazaki,M.& Uraguchi, 1978. Toxicology, Biochemistry and Pathology of mycotoxins. Halsted (Wiley) , New Yourk.

Urgent

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Testing the ability of some isolates of Trichoderma harzianum to produce Trichothecen (T2 – toxin).

Ibrahim Kider Yas
Dept of Qua. Control
General Comp. Of
Grain Processing
Baghdad

Azalldeen K. N.
Dept of Qua. Control
General Comp. Of
Grain Processing
Missan

Wasan J. I.
Dept. of Biol.
Coll. Of Edu.
Univ. of Basrah
Missan

Abstract

Testing the ability of some isolates of Trichoderma harzianum to produce Trichothecen (wild type Th – wt) and their mutant NTG induced (Th-2-1, Th-2-2, Th-2-3, Th-1-4 & Th – 1-6)to produce mycotoxins Trichothecens (T2-toxin) by using Thin layer chromatography. The results appeared that this Strains where unable to produce this type of mycotoxins therefore we can used this Strains in biocontrol programs with safety.

Urgent

ISSN-1994-697X

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com