مجلة زراعة الرافدين
ISSN:1815 – 316X (Print)
ISSN:2224-9796 (Online)
المجلد (٣٩) العدد (٤) ٢٠١١

تأثير المقاوم الحيوي . *Trichoderma* spp في مستوى فاعلية انزيمات بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز وكايتينيز في نباتات اللوبيا *Vigna unguiculata* المصابة بنيماتودا تعقد الجذور *Meloidoygne javanica*

أسماء منصور عبد الرسول بسام يحيى إبراهيم
قسم وقاية النبات/ كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل /الموصل / العراق

الخلاصة

اظهرت نتائج استخدام عزلتين من عامل المقاومة الاحيائية *Trichoderma* spp وهما عزلة مطفرة Thk20 للفطر *Trichoderma harzianum* وعزلة من النوع *Trichoderma viride* قدرته في استحثاث المقاومة في نبات اللوبيا ضد الإصابة بالنيماتودا *Meloidoygne javanica* المسببة لتعقد الجذورمن خلال رفع مستويات إنزيمات بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز وكايتينيز. إذ تفوقت العزلة Thk20 في رفع فاعلية انزيم بيروكسيديز مقارنة ببقية المعاملات إذ بلغت ١,٨٣ وحدة / غم وزن رطب تلتها المعاملة بالعزلة *T. viride* وتفوق العزلة Thk20 في رفع فاعلية إنزيم بولي فينول أوكسيديز مقارنة ببقية المعاملات إذ بلغت ٥,٥٨ وحدة/غم وزن رطب والتي لم تختلف معنويا عن المعاملتين بالعزلة*T. viride* والمعاملة (*M. javanica + T. viride*) إذ بلغت ٥,١٢ و٥,٢١ وحدة / غم وزن رطب على التوالي .وتفوقت المعاملة (*M. javanica* + Thk20)) في رفع فاعلية انزيم كايتينيز في جذور نبات اللوبيا مقارنة ببقية المعاملات وبفارق معنوي إذ بلغت ١٠,٧٤وحدة / غم وزن رطب تلتها المعاملة (*M. javanica + T. viride*) والعزلتين Thk20 و *T. viride* والتي لم تختلف معنويا فيما بينها أذ بلغت فاعلية الإنزيم فيها ٧,٤٥ و ٥,٣٤ و ٥,٢٣ وحدة / غم وزن رطب على التوالي .

المقدمة

تستطيع النباتات ان تحصل على مقاومة جهازية وموضعية بوساطة العديد من العوامل الاحيائية التي تتضمن الفطريات والبكتريا غير الممرضة و فطريات وبكتريا المحيط الجذري وهذا النوع من المقاومة يسمى بالمقاومة المستحثة ويشمل ذلك استحثاث الاستجابات الدفاعية للنبات على مستوى النظم النسيجية والأعضاء وبناء الفايتوالكسين Phytoalexins في أجزاء النبات البعيدة عن موضع الإصابة وبناء البروتينات Defense-Related Proteins أو اختصاراًPR proteins وتعد هذه البروتينات المستحث بناؤها بالعامل المستحث (elicitor) نتيجة الإصابة مع البروتينات المتكونة في النبات سابقا من الوسائل الدفاعية ومنها إنزيمات Chitinase و peroxidase و Polyphenoloxidase وPhenyl alanine ammonia (Van Loon واخرون،١٩٩٨) فضلا عن تراكم الكالس والفينولات واللكنين بعد مواقع الإصابة والتي تعمل كحواجز لمنع انتشار الإصابة ولهذا يعد تحفيز المقاومة الجهازية في النباتات احد طرق المكافحة الإحيائية لمسببات الأمراض المتوطنة في التربة ويمكن أن تسهم في خفض استعمال المركبات الكيميائية المستخدمة في حماية النبات (Yedidia وآخرون، ٢٠٠٠). ويعد الفطر *Trichoderma* من الفطريات غير الممرضة والتي تستوطن منطقة المحيط الجذري وتساهم في كبح العديد من المسببات المرضية في تلك المنطقة وفي غضون السنوات الأخيرة انصب الاهتمام بدور الفطر *Trichoderma* spp في استحثاث المقاومة في النبات لكونها متممة للآليات الأخرى والتي تتضمن التطفل والتضاد والمنافسة (Djonovic،٢٠٠٥) إذ أدت معاملة نباتات الخيار بابواغ الفطر *T. harzianum* بطريقة رش المجموع الخضري أو معاملة التربة إلى خفض شدة الإصابة بالفطر *Botrytis cinerea* والى زيادة محتوى الجدران الخلوية من السيليلوز وكذلك رفع مستوى إنزيمي peroxidase وchitinase في أنسجة الجذور والأوراق (Woo وآخرون ،١٩٩٩) وزيادة فاعلية إنزيمات cellulase و chitinase β-1,3-glucanase, و eroxidase في النباتات المعاملة بالفطر *Trichoderma* spp مقارنة بالنباتات غير المعاملة (El-Katatny وآخرون ،٢٠٠٠ و Yedidia

تاريخ تسلم البحث ٢٠١١/٦/٢٦ وقبوله ٢٠١١/١٠/١٠

وآخرون ،٢٠٠٠) وأدت معاملة بذور القطن بالفطر*T. virens* إلى زيادة محتوى الجذور من terpenoid و peroxidase مقارنة بالبذور غير المعاملة (Howellوآخرون ،٢٠٠٠) وقد وجد بان فاعلية إنزيمي بيروكسيديز peroxidase وبولي فينول اوكسديز Poly phenol oxidase مرتبطة طرديا مع المقاومة المستحثة في العائل ضد الفطرين *Rhizoctonia* sp. و *Pythium* sp. (Karthikeyanوآخرون ٢٠٠٦) وفضلاً عن ذلك يشتركان في تخليق اللكنين والسوبرين وأكسدة الفينولات الطبيعية الموجودة في أنسجة النبات لإنتاج الكينونات والتي بدورها تمر بتفاعلات بلمرة مؤدية الى إنتاج الميلانينات Melanins والتي تمتلك فاعلية مضادة للكائنات الحية المجهرية أما انزيم الكيتينيز فينتج بتراكيز منخفضة في النبات ومن اهم وظائفه هي حماية النبات من المسببات المرضية وذلك بتحليل الكايتين المركب الأكثر شيوعا في جدر خلايا الفطريات والنيماتودا (Onaga و Taira1،٢٠٠٨) ويزداد تركيزه نتيجة للاستحثاث بعدة مستحثات إحيائية وغير احيائية فقد وجد أن مستوى انزيم chitinase قد ازداد بمقدار ٢٥٠ ضعف في نباتات التبغ بعد سبعة ايام من التلقيح بالفطر *Phytophthora parastitic* (Yeyan ، ١٩٨٩ وRoberts واخرون ١٩٩٢).

وتعد نيماتودا تعقد الجذور أحد اهم واخطر خمسة مسببات مرضية اقتصادية في العالم وتسبب خسائر اقتصادية فادحة للمحاصيل الزراعية وقد كانت و ماتزال موضوع بحث مستفيض من قبل العديد من الباحثين منذ عقود طويلة (ابو غريبه ،٢٠١٠) وتتعرض نباتات اللوبيا كغيرها من المحاصيل للإصابة بالعديد من المسببات المرضية ومنها نيماتودا تعقد الجذور والعائدة للجنس spp *Meloidoygne* وتودي إصابة اللوبيا بهذا الجنس الى خسائر قد تصل الى أكثر من ٩٠% من الحاصل (Ononuju و Nzenwa،٢٠١١).وقد سجل النوع *M. javanica* على نباتات اللوبيا في العراق من قبل قاسم (١٩٨٠) و Stephan (١٩٨٨).

وتهدف الدراسة الحالية الى التعرف على دور الفطر *Trichoderma* في استحثاث المقاومة في نباتات اللوبيا ضد الإصابة بالنيماتودا.sp *Meloidoygne* المسببة لتعقد الجذور من خلال رفع مستويات إنزيمات بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز وكايتينيز.

مواد البحث وطرائقه

عزلات عامل المكافحة الإحيائية وصفاتها الاحيائية: استخدمت في الدراسة عزلتين من الفطر *Trichoderma* spp. وهما :

١- العزلة (Thk20)وهي عزلة مطفرة من الفطر*T. harzianum* تم الحصول عليها من د. خالد حسن طه / قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل .

٢- العزلة (Tv) من الفطر *T. viride* عزلة مصرية / المركز القومي للأبحاث / جمهورية مصر العربية تم الحصول عليها من د. عصام محمد سليمان /كلية التربية / جامعة الموصل.

١- تقدير الكتلة الحيوية : حضر الوسط الغذائي السائل Potato Dextrose Broth (PDB) المكون من مستخلص ٢٠٠غم من البطاطا و ٢٠غم Dextrose / لتر ماء مقطر وزع في دوارق مخروطية الشكل سعة ٢٥٠مل وبمعدل ١٠٠مل/دورق. عقم الوسط الغذائي بجهاز المؤصدة في درجة حرارة ١٢١مْ وضغط ١,٥ جو لمدة ٢٠ دقيقة.بردت الدوارق ولقح كل منها بقرص قطر ٠,٥ سم من الوسط الغذائي PDA المنمى عليه عزلات عامل المكافحة الإحيائية.*Trichoderma* spp بعمر خمسة أيام وبواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة ، ثم حضنت الدوارق عند درجة حرارة ٢٥°سيليزية (±٢°) لمدة ١٠ أيام و لغرض تقدير الكتلة الحيوية (غم كتلة حيوية وزن جاف / ١٠٠ مل من الوسط الغذائي السائل) لعزلتي الفطر *Trichoderma* spp. . رشحت المزارع السابقة خلال ورق ترشيح نوع Whatman No.1 معلومة الوزن مسبقاً ثم جففت أوراق الترشيح في فرن كهربائي في درجة حرارة ٧٠° سيليزية ولحين ثبات الوزن.(Anonymous ،١٩٨٠).

٢- تقدير دالة الأس الهيدروجيني pH :استخدم راشح مزارع الفطر الناتج عن تنمية عزلتي عامل المكافحة الإحيائية *Trichoderma* spp. على وسط PDB بعمر ١٠ أيام لغرض تقدير دالة الأس الهيدروجيني pHباستخدام جهاز pH meter .

٣-عدد الابواغ : استخدمت مزارع لعزلتي عامل المكافحة الإحيائية.*Trichoderma* spp نامية على الوسط PDA بعمر١٠ أيام لغرض تقدير عدد الابواغ المنتجة /سم^{٢} من مساحة مزرعة عزلتي المكافحة الإحيائية حيث استخدم ثاقب فليني بقطر ٠,٥سم للحصول على أقراص من حافة مزرعة عامل المكافحة الإحيائية نقلت الأقراص إلى دوارق زجاجية تحتوي ٥٠ مل ماء مقطر مضاف إليه مادة ناشرة Tween 20 بواقع ١مل /١٠٠ مل ماء مقطر وضعت الدوارق فوق محرك مغناطيسي Magnetic stirrer لمدة ٥ دقائق لتفكيك الكتل البوغية ورشح العالق البوغي بتمريره من خلال قمع صغير معقم يحتوي على شاش معقم للتخلص من الشوائب والخيوط الفطرية والحصول على العالق البوغي ثم جرى بعد ذلك تقدير عدد الابواغ باستخدام شريحة العد Haemocytometer واستخدمت ثلاثة أطباق لكل عزلة من عزلات المقاوم الحيوي.

تهيئة لقاح نيماتودا تعقد الجذور*M. javanica* **:** استخدم لقاح نيماتودا تعقد الجذور*M. javanica* والتي شخصت بالاعتماد على الصفات التي تميز بها في النمط العجاني perineal pattern (Taylor و Netscheir ،١٩٧٤) بعزل كتل البيض من جذور نباتات اللوبيا المصابة ووضعها في أطباق بتري معقمة والحاوية على ماء مقطر ومعقم وتحضينها في درجة حرارة ٣٠°سيليزية (±٢°) لحين الفقس والحصول على يافعات الطور الثاني للنيماتودا .

تجربة البيت البلاستكي :هيأت المعاملات التالية لتجربة البيت البلاستكي

١- زراعة بذور لوبيا معاملة بالعزلة Thk20 في تربة معقمة .
٢- زراعة بذور لوبيا معاملة بالعزلة Tv في تربة معقمة .
٣- زراعة بذور لوبيا معاملة بالعزلة Thk20 في تربة ملوثة بالنيماتودا .
٤- زراعة بذور لوبيا معاملة بالعزلة Tv في تربة ملوثة بالنيماتودا .
٥- زراعة بذور لوبيا في تربة ملوثة بالنيماتودا .
٦- زراعة بذور لوبيا في تربة معقمة (مقارنة) .

عقمت التربة باستعمال الفورمالديهايد وضعت التربة المعقمة في أصص بلاستيكية سعة ١كغم تربة وعوملت بذور اللوبيا (صنف محلي) بمعلق ابواغ الفطر *Trichoderma* sp. بتركيز ٤× ١٠ ^{٦} مع إضافة المولاس بتركيز ٥% كمادة لاصقة إذ نقعت البذور في المعلق البوغي لمدة ساعة ثم رفعت وتركت في ظروف المختبر لمدة ٢٤ ساعة قبل الزراعة، اما معاملة المقارنة فنقعت البذور في الماء المقطر مع إضافة المولاس بتركيز ٥%. لوثت التربة بعد ١٥ يوم من الزراعة بيافعات الطور الثاني للنيماتودا *M. javanica* الحديثة الفقس والمأخوذة من مصدر التلويث المعد سابقاً وبواقع ٢٠٠٠ ± ٥ يافعة/أصيص . وبعد مرور ٢٠ يوم من الزراعة تم تقدير ما يأتي :

١- **تقدير فاعلية انزيمي بيروكسيديز** Peroxidase **و بولي فينول اوكسيديز** Polyphenoloxidaes**:** تم اخذ ٠,٥غم من جذور بادرات كل معاملة بعد تنظيفها بالماء الجاري . سحقت الجذور مع ٢ مل من دارىء الفوسفات ذي الأس الهدروجيني pH = ٧ في هاون خزفي (Howell وآخرون ،٢٠٠٠) . ثم وضع خليط أنسجة الجذور والمحلول الدارىء في أنابيب اختبار سعة ١٠ مل. خضعت الأنابيب إلى عملية انتباذ بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة ثم حفظ الجزء الطافي على درجة صفر°سيليزية لحين استخدامها في التجارب اللاحقة **أ- تقدير البروتين**:استخدمت طريقة Lowry لتقدير البروتين باستخدام كاشف فولن Folin عند طول موجي (٦٥٠ نانوميتر) واستخدام البومين مصل البقر (BSA) كمحلول قياسي .

ب-قياس فاعلية انزيم بيروكسيديز Peroxidase**:** قيست فاعلية إنزيم بيروكسيديز بإجراء اختبار كوايكول Guaiacol (Howell وآخرون ،٢٠٠٠)

ج- قياس فاعلية إنزيم بولي فينول اوكسيديز Polyphenoloxidaes **:**اتبعت الطريقة التي ذكرها Shi وآخرون (٢٠٠٢) في التقدير وذلك بمتابعة الزيادة الحاصلة في الامتصاص الضوئي Absorbance وعند طول موجي ٤٢٠ نانوميتر باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer والناتج من أكسدة مادة كاتيكول Catechole كركيزة للإنزيم.

٢- قياس فاعلية إنزيم **Chitinase:** اخذ ٠,٥ غم من جذور بادرات كل معاملة بعد تنظيفها بالماء الجاري . سحقت الجذور مع ٢,٥ مل من الماء اللايوني Deionized Water وتركت لمدة ٤ ساعات

في درجة حرارة ٤ سيليزية خضعت الأنابيب الحاوية على خليط أنسجة الجذور و الماء اللايوني إلى عملية انتباذ بسرعة ٤٠٠٠ دورة / دقيقة .ثم اخذ الراشح وأضيف اليه كبريتات الامونيوم إلى حد التشبع ثم جمع الراسب وأذابته باستخدام الدارىء Tris-HCL pH = ٥،٧ و حفظ على درجة صفر سيليزية لحين استخدامها في التجارب اللاحقة .اتبعت طريقة Wang وآخرون (٢٠٠٦) في تقدير فاعلية إنزيم الكايتينيز Chitinase أذ تم تقدير كمية N-acetylglucosamin الناتجة عن تحلل المادة الاساس Colloidal chitin التي تكون معقد ملون مع كاشف DNS) 3,5 –dinitrosalicylic acid). عند الطول الموجي ٥٤٠ نانوميتير . والوحدة الانزيمية هي كمية الانزيم التي تعمل على تحويل مايكرومول من المادة الاساس Colloidal chitin الى المادة الناتجة N-acetylglucosamin في الدقيقة .

٣- تقدير محتوى الفينولات الكلي في جذور نبات اللوبيا: تم التقدير تبعا لطريقة Zieslin و Ben-Zaken (١٩٩٣) ، وذلك بسحق ١ غم من جذور نبات اللوبيا في ١٠ مل من الميثانول بتركيز ٨٠%، ثم يسخن مستخلص الجذور لمدة ٢٠ دقيقة في حمام مائي بدرجة٧٠ °سيليزية ،وبعد ذلك يرشح المستخلص باوراق Whatman No.1. ثم يوخذ ١ مل من مستخلص الجذور ويضاف اليه ٥ مل من الماء المقطر و٢٥٠ مايكروليتر من كاشف فولن ١ عيارية، ويترك المزيج لحين تطور اللون الازرق ومن ثم قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي ٧٢٥ نانوميتر، واستخدمت مادة كاتيكول Catechole لتحضير المنحنى القياسي لتقدير محتوى الفينولات الكلي ملغم/ غرام وزن رطب.

التحليل الإحصائي:استخدم التصميم العشوائي الكامل CRD في تنفيذ التجارب المختبرية وحللت النتائج وفق نظام SAS واختبرت المتوسطات باستخدام اختباري T و دنكن المتعدد المدى وبمستوى احتمال ٠.٠٥

النتائج والمناقشة

الصفات الحيوية لعزلتي المقاوم الإحيائي : تبين النتائج في (الجدول ،١) تفوق العزلة Thk20 في وزن الكتلة الحيوية ٠,٦٦ غم مقارنة بالعزلة Tv ٠,٥٤ غم في حين تفوقت العزلة Tv في انتاج الابواغ اذ بلغ عدد الابوغ المنتجة في وحدة المساحة ضمن المستعمرة ١٠×٢,٦ ^{٨} بوغ/سم^{٢} في حين بلغ العدد ١٠×١,٣٩ ^{٨} بوغ/ سم^{٢} في العزلة Thk20. ان زيادة الكتلة الحيوية تدل على قدرة عامل المكافحة الاحيائية في استغلال الوسط استغلالاً امثلاً مما يعزز ازدياد فرص وجوده في بيئته ومن ثم قدرته في النشاط والتكاثر، كما ان التبويغ العالي للمقاوم الحيوي يعطيه ميزة في زيادة من فرص نجاح استخداماته في المكافحة من خلال زيادة مساحة انتشاره وطول مدة بقاءه ومن ثم زيادة كفاءته في مجمل فعالياته الحيوية، كما يعزز ذلك فرص إحداث متغيرات حيوية كفوءة حول الجذر كالتطفل والتضاد (Harman وآخرون، ٢٠٠٤ و Ibraheem، ٢٠٠٩). كذلك أظهرت النتائج في(الجدول ، ١) قدرة عزلتي عامل المكافحة الإحيائية في خفض دالة الاس الهيدروجيني للوسط لكن بتفوق العزلة Tv في قيمة الخفض في دالة الاس الهيدروجيني إذ بلغت قيمة دالة الاس الهيدروجيني ٤,٠٧ مقارنة بقيمة ٥,٠٧ في العزلة Thk20 ، إن قدرة الفطر *Trichoderma* في خفض الأس الهيدروجيني للوسط يدل على قدرته على زيادة حموضة وسطه الحيوي بانتاجه للاحماض العضوية ومنها الفوليك والهيوميك والاوكزاليك والتي تعمل على زيادة حموضة الوسط وبخاصة في الأوساط التي يكون فيها مصدر الكاربون سكريات بسيطة ويمثل ذلك أهمية بالغة في زيادة جاهزية بعض المغذيات في التربة وبخاصة عنصر الفسفور إذ تعمل تلك الأحماض في إذابته وزيادة جاهزيته ومن ثم تيسيره للنبات بشكل مباشر عبر امتصاصه من الجذور أو بشكل غير مباشر عبر الفطر *Trichoderma* sp. ومن ثم الحصول عليه من المقاوم الحيوي بعد موت خلاياه الموجودة في المحيط الجذري أو المستوطن لخلايا الجذر. كما يعمل الوسط الحامضي الذي يحدثه المقاوم الحيوي في محيط الجذر على زيادة فاعلية النقل الايوني والكاتيوني للعناصر والجذور اللازمة للنبات فضلا عن ان الاس الهيدروجيني المنخفض يعمل على تثبيط نمو البكتريا الممرضة للجذور(Harman ،٢٠٠٠ و Benitez وآخرون ٢٠٠٤ وIbraheem ،٢٠٠٩).

الجدول (١) بعض الصفات الحيوية لعاملي المكافحة الإحيائية .

الصفات / المقاوم الحيوي	الكتلة الحيوية (غم وزن جاف/١٠٠مل)	لوغاريتم عدد الابواغ	قيمة دالة الاس الهيدروجيني pH
عزلة Thk20	٠,٦٦	١٠×١,٣٩ ^	٥.٠٧
عزلةTv	٠,٥٤	١٠×٢,٦ ^	٤,٠٧

قدرة عزلتي عامل المكافحة الاحيائية *Trichoderma* spp. **في استحثاث المقاومة :**تبين النتائج (الجدول،٢) قدرة عزلتي المقاوم الحيوي في استحثاث المقاومة في نبات اللوبيا وذلك من خلال رفع فاعلية الانزيمات بيروكسديز وبولي فينول اوكسيديز والتي وصلت اقصاها ١,٨٣ وحدة / غم وزن رطب في المعاملة بالعزلة Thk20 إلا أنها لم تختلف معنويا عن المعاملة بالعزلة Tv لوحدها ،كذلك حدت المعاملة بعزلتي المقاوم الحيوي من تأثير النيماتودا *M. javanica* لتسجل زيادة في فاعلية الإنزيم وبلغت قيمتها ١,٨٢ و١,٤ وحدة / غم وزن رطب بوجود النيماتودا مع العزلتين Thk20 وTv على التوالي دون أن تختلفا معنويا عماحققتها العزلتين من زيادة في فاعلية الإنزيم عند وجودهما المنفرد ، بينما سجلت المعاملة الخاصة بالنيماتودا لوحدها اقل قيمة بلغت ٠,٧٣ وحدة/غم وزن رطب .وفيما يخص محتوى جذور اللوبيا من البروتين فقد وصل أعلاه ٧,٤ ملغم/غم وزن رطب في معاملة المقاوم الحيوي Tv مع النيماتودا وبتفوق معنوي على جميع المعاملات الأخرى نلتها المعاملة الخاصة بعزلة المقاوم الحيوي Thk20 مع النيماتودا فيما وصل أدناه ٢,٢٧ ملغم /غم وزن رطب في المعاملة الخاصة بالنيماتودا لوحدها دون أن تختلف معنويا عن معاملة المقارنة والتي سجلت أعلى قيمة للفاعلية النوعية ٠,٣٤ الا أنها لم تختلف معنويا عن بقية المعاملات باستثناء المعاملتين النيماتودا +عزلة Thk20 والنيماتودا + العزلة Tv تبين النتائج (الجدول ،٣) قدرة عزلتي المقاوم الحيوي على رفع فاعلية إنزيم بولي فينول اوكسيديز والتي وصلت اقصاها ٥,٥٨ وحدة / غم وزن رطب في المعاملة بالعزلة Thk20 الا انها لم تختلف معنويا عن المعاملة بالعزلة Tv لوحدها أو مع النيماتودا *M. javanica* إذ بلغت ٥,١٢ و٥,٢١ وحدة / غم وزن رطب ، كذلك حدت المعاملة بعزلة Tv من تأثير النيماتودا *M. javanica* لتسجل زيادة في فاعلية الإنزيم بلغت قيمته ٥,٢١ وحدة / غم وزن رطب بوجود النيماتودا دون ان تختلف معنويا عما حققته العزلة من زيادة في فاعلية الإنزيم عند وجودها المنفرد بينما سجلت المعاملة الخاصة بالنيماتودا لوحدها اقل قيمة بلغت ٣,١١وحدة / غم وزن رطب .وفيما يخص محتوى جذور اللوبيا من البروتين فقد وصل أعلاه ٢٠,٨٤ ملغم/غم وزن رطب في معاملة المقاوم الحيوي Tv مع النيماتودا وبتفوق معنوي على جميع المعاملات الأخرى تلتها المعاملة الخاصة بالنيماتودا لوحدها ١٧,٢٧ ملغم / غم وزن رطب وباختلاف معنوي عن معاملة المقارنة . فيما وصل أدناه ١٠,٦٥ ملغم /غم وزن رطب في معاملة المقارنة، فيما سجلت أعلى قيمة للفاعلية النوعية ٠.٣٤ في المعاملة الخاصة بالعزلة Thk20 والتي اختلفت معنويا عن بقية المعاملات باستثناء المعاملة الخاصة بالعزلة Tv .

الجدول (٢): تأثير المقاوم الحيوي في المحتوى البروتيني والفاعلية الكلية والنوعية لانزيم بيروكسيديز في جذور نباتات اللوبيا.

المعاملات	البروتين الكلي ملغم / غم وزن رطب	إنزيم بيروكسيديز	
		الفاعلية الكلية وحدة / غم وزن رطب	الفاعلية النوعية
المقاوم الحيوي عزلةThk20	٥,٨٤ ج	١,٨٣ أ	٠,٣١ أ
المقاوم الحيوي عزلة Tv	٥,٠٣ ج	١,٥٢ أ ب	٠,٣٠ أ ب
النيماتودا +عزلة Thk20	٦,٢٥ ب	١,٨٢ أ	٠,٢٩ ب
النيماتودا +عزلة Tv	٧,٤٠ أ	١,٤ أ ب	٠,١٨ ج
النيماتودا لوحدها	٢,٢٧ د	٠,٧٣ د	٠,٣٢ أ
المقارنة	٣,٦٨ د	١,٢٦ ج	٠,٣٤ أ

* المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لكل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى ولمستوى احتمال٥%.

تبين النتائج (الجدول،٤) أن أعلى فاعلية لانزيم كايتينيز قد سجلت في المعاملة الخاصة بعزلة المقاوم الحيوي Thk 20 مع النيماتودا *M. javanica* والتي وصلت ١٠,٧٤ والتي اختلفت معنويا عن بقية المعاملات وتلتها المعاملة الخاصة بالعزلة Tv مع النيماتودا *M. javanica* إذ بلغت ٧,٤٥ وحدة / غم وزن رطب ، وفيما يخص محتوى جذور اللوبيا من البروتين فقد وصل اعلاه ٤١,٣٨ ملغم / غم وزن رطب في المعاملة الخاصة بعزلة المقاوم الحيوي Tv مع النيماتودا *M. javanica* وبتفوق معنوي على جميع المعاملات الأخرى تلتها المعاملة الخاصة المعاملة الخاصة بعزلة المقاوم الحيوي Thk20 مع النيماتودا ٣٣,٥٦ملغم /غم وزن رطب وباختلاف معنوي عن معاملة المقارنة . فيما وصل أدناه ١٠,٦٥ ملغم /غم وزن رطب في معاملة المقارنة ،فيما سجلت أعلى قيمة للفاعلية النوعية ٠,٣٢ في المعاملة الخاصة بالعزلة Thk20 مع النيماتودا والتي اختلفت معنويا عن بقية المعاملات .

الجدول (٣): تأثير المعاملات في المحتوى البروتيني والفاعلية الكلية والنوعية لانزيم بولي فينول اوكسيديز في جذور نباتات اللوبيا.

المعاملات	البروتين الكلي ملغم / غم وزن رطب	انزيم بولي فينول اوكسيديز	
		الفاعلية الكلية وحدة / غم وزن رطب	الفاعلية النوعية
المقاوم الحيوي عزلةThk20	١٦,٤١ ب	٥,٥٨ أ	٠,٣٤أ
المقاوم الحيوي عزلة Tv	١٦,٥١ ب	٥,١٢ أ ب	٠,٣١ أب
النيماتودا +عزلة Thk20	١٤,١٧ ج	٤,١١ ج	٠,٢٩ب
النيماتودا +عزلة Tv	٢٠,٨٤ أ	٥,٢١ أ ب	٠,٢٥ ج
النيماتودا لوحدها	١٧,٢٧ ب	٣,١١ د	٠,١٨ د
المقارنة	١٠,٦٥ د	٢,١٣ هـ	٠,٢٠ د

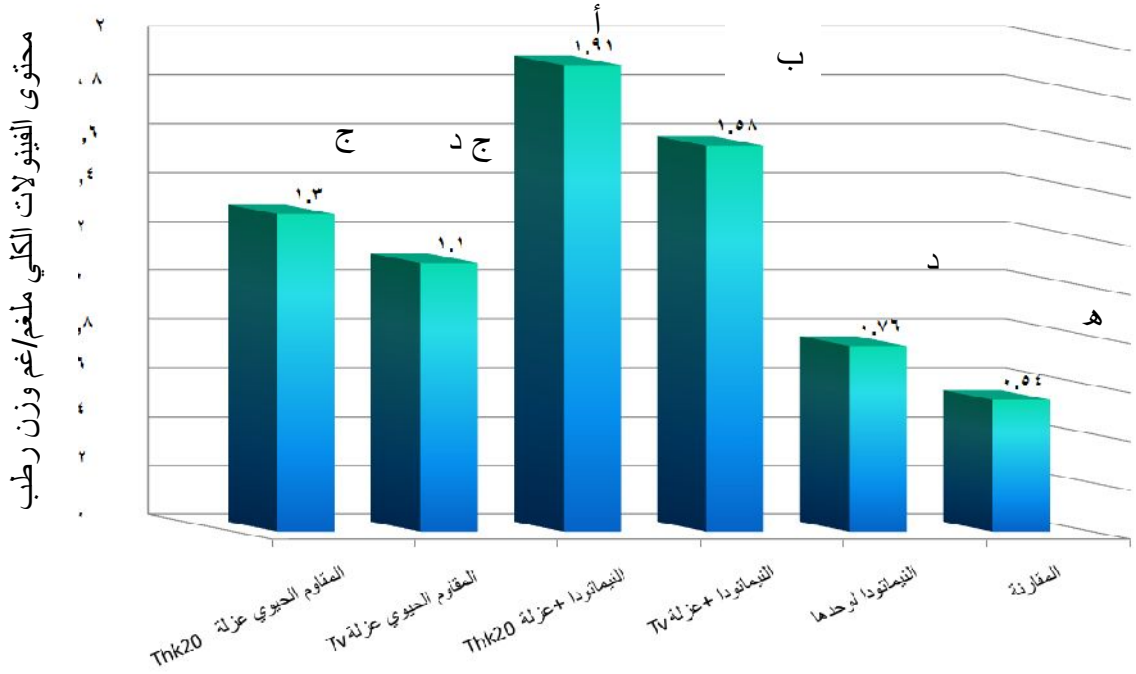
* المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لكل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى ولمستوى احتمال٥%.

الجدول (٤): تأثير المعاملات في المحتوى البروتيني والفاعلية الكلية والنوعية لانزيم كايتينيز في جذور نباتات اللوبيا.

المعاملات	البروتين الكلي ملغم / غم وزن رطب	إنزيم كايتينيز	
		الفاعلية الكلية وحدة / غم وزن رطب	الفاعلية النوعية
المقاوم الحيوي عزلة Thk20	٢٣,٢١ ج	٥,٣٤ ج	٠,٢٣ج
المقاوم الحيوي عزلة Tv	٢٤,٩٠ ج	٥,٢٣ج	٠,٢١ج
النيماتودا +عزلة Thk20	٣٣,٥٦ ب	١٠,٧٤ أ	٠,٣٢أ
النيماتودا +عزلة Tv	٤١,٣٨ أ	٧,٤٥ ب	٠,١٨د
النيماتودا لوحدها	٢٦,٤٣ ج	٤,٢٣د	٠,١٦د
المقارنة	١٦,٦٩د	٤,٣٤د	٠,٢٦ب

* المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لكل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى ولمستوى احتمال٥%.

ويبدو من الشكل (١) ان وجود المقاوم الحيوي عزلة Thk20 حققت زيادة في كمية الفينولات الكلية بلغت قيمتها ١,٩١ملغم / غم وزن رطب في جذور نبات اللوبيا المصابة بالنيماتودا *M. javanica* تلتها المعاملة بعزلة المقاوم الحيوي Tv مع النيماتودا *M. javanica* ١,٥٨ ملغم / غم وزن رطب بينما انخفض المحتوى الكلي للفينولات إلى أدنى قيمة له ٠,٧٦ملغم / غم وزن رطب في جذور اللوبيا المصابة بالنيماتودا في غياب عامل المقاوم الحيوي وباختلاف معنوي عن معاملة المقارنة .



الشكل (١): تأثير المعاملات في محتوى الفينولات الكلي في جذور نباتات اللوبيا.

ومن النتائج السابقة يتبين أن لعزلتي المقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. القدرة على استحثاث إنتاج إنزيمي بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز ، إذ أشارت الدراسات إلى اقتران الفاعلية العالية لهذين الإنزيمين مع مستوى عال من المقاومة في النبات وزيادة المحتوى من المواد الفينولية كاستجابة أولية لغزو المسببات للنبات من خلال أكسدة الفينولات إذ يعمل إنزيم بيروكسيديز Peroxidase على أكسدة الفينول وO-dihydroxyphenol ويعمل إنزيم وبولي فينول اوكسيديز Polyphenoloxidase على أكسدة الكاتيكول فضلاً عن دوره بالمشاركة في تخليق اللكنين والسوبرين بعد تكثيفه للمركبات الفينولية في موقع الإصابة (Karthikeyan وآخرون ، ٢٠٠٦ و Hassan وآخرون ، ٢٠٠٧) وفضلاً عن ذلك يعمل الإنزيم مع إنزيم بيروكسيديز مع بيروكسيد الهدروجين في تكسير الإنزيمات التي ينتجها المسبب المرض وتعمل نواتج تحطم الإنزيمات كإشارات استحثاثية في النبات استجابة للإجهاد الحيوي المتمثل بوجود المسببات المرضية و إطلاق آليات الاستحثاث التتابعي للوسائل الدفاعية الكيماوية ومنها بناء المركبات الدفاعية المستحثة Phytoalexins الفايتواليكسينات من خلال أكسدة الفينولات وتحويلها إلى مواد أكثر سمية للمسببات المرضية وذلك في مساري حامض الشيكميك Shikimic acid وحامض الميفالونيك Mevalonic acid فضلا عن الدفاعات التركيبية إذ يتفاعل الإنزيم مع بعض بروتينات الجدار الخلوي لتكوين روابط عرضية ومركبات متعددة مما يزيد من صلابة الجدار الخلوي (Van Breusegem ٢٠٠١، وHibar واخرون ،٢٠٠٧) .فضلا عن قدرة عزلتي المقاوم الحيوي *Trichoderma* spp. على الحد وبشكل كبير من التأثير الكابح لفاعلية إنزيمي بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز النتاتج عن وجود النيماتودا حيث تعمل النيماتودا على كبح فاعلية انزيمي بيروكسيديز وبولي فينول اوكسيديز بشكل كبير (Sahebani واخرون ،٢٠٠٧) .ان ردودِ الأفعال الدفاعِية تعتمدُ مبدئيا على نوعِ المستحث elicitor وعلى الطراز الوراثي للنباتِ وعلى نوعِ التفاعل بين النبات والممرض او فطريات المحيط الجذري (Jayalakshmi ،٢٠٠٩) وفي جذور نباتات الطماطة المصابة بالنيماتودا تستحث الجينات الدفاعِية ومن ضمنها جينات انزيمات peroxidase وchitinase موضعيا في خلال ١٢ ساعة مِنْ التلويث ، ولكن تلك الجينات تستحث جهازيا عند المعاملة بالفطر *T. harzianum* (Williamson وHussey ١٩٩٦، Yedidia واخرون ،١٩٩٩ وDesender واخرون ، ٢٠٠٧) .كما ان زيادة البروتينات الكلية في المعاملات يعود الى زيادة البروتينات المتعلقة بالدفاع والتي تزداد في حالات استحثاث المقاومة الجهازية نتيجة لعوامل الاستحثاث المختلفة (Hoffland واخرون ،١٩٩٥) .

مجلة زراعة الرافدين ISSN:1815 – 316X (Print) ISSN:2224-9796 (Online) المجلد (٣٩) العدد (٤) ٢٠١١

EFFECT OF TREATMENT WITH *TRICHODERMA* SPP ON THE LEVEL OF PEROXIDASE, POLYPHENOLOXIDAES AND CHITINASE IN COWPEA PLANTS *VIGNA UNGUICULATA* EFFECTED BY ROOT-KNOT NEMATODAS *MELOIDOYGNE JAVANICA*

Asma'a M.Abdul-rasool Bassam Yahya Ibraheem
Dept.of Plant Protect.،Coll.of Agric.and Forestry،Mosul Univ.Mosul،Iraq

ABSTRACT

Two isolates of biocontrol agent *Trichoderma* spp involved a mutant isolate *Trichoderma harzianum* Thk20 and *Trichoderma viride* were used in this study Results revealed the ability of two isolates in inducing systemic disease resistance in cowpea plants against root knot nematode *Meloidogyne javanica* throughout increasing the activity of peroxidase, polyphenoloxidas and chitinase enzymes in cowpea roots. Isolates Thk20 caused highest activity of peroxidase 1.83 unit/g f.w. and polyphenoloxidase 5.58 unit / g f.w comparing with other treatments, at the same time this isolate did not differ significantly with the *other isolate* and the treatment (*M. javanica* + *T. viride*) where enzyme activity were 5.12 and 5.21 unit / g f.w respectively . The treatment (*M. javanica* + Thk20) caused the highest activity of chitinase enzyme in cowpea roots with 10.74 unit / g f.w followed by (*M. javanica* +*T. viride*), Thk20 and *T. viride* in which enzyme activity was 7.45, 5.34 and 5.23 unit / g f.w respectively.

المصادر

ابو غريبه، وليد ابراهيم (٢٠١٠). نيماتودا النبات في الدول العربية – الجزء الثاني . الجامعة الاردنية ،كلية الزراعة – دار وائل للنشر والتوزيع . ٨٢٤٢ صفحة .

قاسم،أكرم حمدي(١٩٨٠).تشخيص الديدان الثعبانية المسببة لمرض تعقد الجذور التي تصيب الخضروات وغربلة بعض اصناف الخضروات المهمة لايجاد مدى مقاومتها وقابليتها للاصابة بـ لوحدها ومصاحبتها للفطر *Meloidogyne javanica* *Fusarium solani* . رسالة ماجستير ،كلية الزراعة والغابات ،جامعة الموصل .

Anonymous "Association of Official Analytic Chemists" (1980). Official Methods of Analysis. 13th ed., , Washington, DC.

Benitez, T.; A.M. Rincon; M.C. Limon and A.C.Codon(2004). Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. Int. Microbiol. 7: 249-260.

Desender, S.; D. Andrivon. and F.Val, (2007). Activation of defense reactions in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol.65:1061-1070.

Djonovic ,S.(2005). Role Of Two Secreted Proteins From *Trichoderma virens* in Mycoparasitism And Induction Of Plant Resistance .Ph.D. Dissertation, Texas A&M University .217pp.

El-Katatny, M.H; W. Somitsch; K.H. Robra; M.S. El-Katatny and G.M. Gübitz (2000). Production of chitinase and β-1,3-glycanase by *Trichoderma*

harzianum for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technol. Biotechnol. 38: 173-180.

Harman , G . E .(2000) . Myths and dogmas of biocontrol change in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22 . Plant Dis. 84: 377 -393 .

Harman G.E; Ch.R. Howell; A. Viterbo; I. Chet and M. Lorito (2004). *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. Natur. Rev. Microbiol. 2: 43-58.

Hassan, E.; M. Maggie ; Saieda S. Abd El-Rahman ; I.H. El-Abbasi and M.S. Mikhail (2007).Changes in peroxidase activity due to resistance induced against fababean chocolate spot disease. Egypt J. Phytopathol. 35: 35-48 .

Hibar ,K.;M. Daami and M.El Mahjoud (2007) . Induction of resistance in tomato plants aginst *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici* by *Trichoderma* spp.. Tunisian J. Plant protect.2:47-58.

Hoffland, E., Pieterse ; C.M.J., Bik, L. and J.A. Van Pelt, (1995). Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 46, 309–320.

Howell, C. R.; L.E. Hanson ; R.D. Stipanovic and L.S. Puckhaber (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology, 90: 248 – 252.

Ibraheem, B.Y. (2009). Induced Biotypes from the Fungus *Trichoderma* Types to Improve Biocontrol and Enhancement Plant Growth Parameters. Ph.D. Thesis. College of Agriculture and Forestry, Mosul Univ., Iraq (In Arabic with English abstract).

Jayalakshmi, S.K; S. Raju; S. Usha Rani; V.I. Benagi and K. Sreeramulu (2009). *Trichoderma harzianum* L_1 as potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against with disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cieeri*. Australian J. of Crop Sci. 3: 44-52.

Karthikeyan , M.; K. Radhika ; S. Mathiyagan; R. Bhaskaran; R. Samiyappan and R.Velazhan(2006). Induction of phenolic and defense-related enzyme in coconut(*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agent . Baz. J. Plant Physiol .18:367-377.

Onaga, S. and T. Taira1(2008).A new type of plant chitinase containing LysM domains from a fern (*Pteris ryukyuensis*): Roles of LysM domains in chitin binding and antifungal activity. Glycobiology 18 : 414–423

Ononuju ,C. C. and P. O. Nzenwa (2011). Nematicidal effects of some plant extracts on egg hatchability and control of *Meloidogyne* spp. in cowpea(*Vigna unguiculata* (L.) Walp).African Journal of Plant Science :5 176-182

Roberts ,C.A.;S.A.Marek;T.L.Niblack and A.L.Karr(1992).Parasitic *Meloidogyne* and mutualistic Acremonium increase chitinase in tall fescue. Journal of Chemical Ecology,18:1107-1116

Sahebani, N.; J. Zad ; A. Sharifi-Tehrani and A. Kheiri (2007).A Study of Changes in Polyphenol Oxidase Activity in Interaction between Rootknot Nematode (*Meloidogyne javanica*) and Tomato Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*) J.Sci. & Technol. Agric. & Natur. Resour.,. 12:81-88.

Shi, C.; Y. Dai; X. Xu; Y. Xie and Q. Liu (2002).The purification of polyphenol oxidase from tobacco .Protein Experiment and Purification 24:51-55.

Stephan,Z.A.(1988).Newly reported hosts of root –knot nematodas in Iraq .International Nematology Net Work newsletter,5:36-43.

Taylor ,D. P. and C. Netscheir (1974). An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica, 20: 268-269.

Van Breusegem, F.; E. Varnova; L .F. Dat and D. Inze (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Sci. 161: 405-414.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. and C.M.J. Pieterse (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36, 453–483.

Wang,S.;Lin,T.;Yen,Y.;Liao,H.and y. Chen (2006).bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase .Carbohydde.Res.341:2507-2515.

Williamson, V. M. and R.S. Hussey(1996).Nematode pathogensis and resistance in Solanaceae: where is the specificity. Cellular Microbiology. 9: 21-30.

Woo, S. E., Donzelli, B., Scala, F., Mach, R., Harman, G. E., Kubicek, C. P., Delsorbo, G. and M. Lorito(1999). Disruption of ech 42 (endochitinase encoding) gene affect biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* PI. Mol. Plant Microbe. Interact. 12: 419- 429.

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., and I. Chet (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiol. Biochem. 38, 863-873.

Yedidia, I.; N. Benhamou and I. Chet (1999). Induction of defense response in plants. The Plant Cell 8:1735-1745.

Yeyan, Z. (1989).Induction Purification and Characterization of Chitanase In Cucumber (*Cucumia sativus*) and Carrot (*Daucus carota*). Ph.D. Thesis Beijing Agricultural University

Zieslin, N. and R.Ben-Zaken (1993). Peroxidase activity and presence of phenolic substrates in peduncles of rose flower. Plant Physio.Biochem.31:333-339.