قدرة الفطر *Trichoderma harzianum* على انتاج انزيم الكايتينيز Chitinase

خالد حسن طه نضال يونس محمد بسام يحيى ابراهيم
قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات

الخلاصة

ببنت النتائج ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج اعلى مستوى من إنزيم الكايتينيز Chitinase كانت ٢٥° سيليزية إذ بلغت فاعلية الانزيم ٢.٧٤ وحدة /مايكرومول/دقيقة وكانت درجة دالة الاس الهيدروجيني الملائمة لإنتاج أعلى مستوى من إنزيم الكايتينيز Chitinase عند ٥ pH وفاعلية الانزيم ٢.٢٥ وحدة /مايكرومول/دقيقة وسجلت أعلى مقدرة تحليلية لإنزيم الكايتينيز Chitinase في راشح المزرعة الخام للفطر *T. harzianum* عند استخدام الغزل الفطري الرطب إذ بلغت كمية سكر N-acetylglucosamin المتحرر ٢٨٠ مايكروغرام/مل وباختلاف معنوي عن الفطرين *R.solani* و*F.solani* عند استخدام الغزل الفطري الرطب والجاف كما بلغ أدنى مستوى لكمية سكر N-acetylglucosamin المتحرر ٢٠٠ مايكروغرام/مل . ومستوى سكر N-acetylglucosamin المتحرر ٤٠ مايكروغرام /مل عند استخدام chitine كمصدر للكاربون . وبلغ اعلى مستوى التأثير المثبط لإنزيم الكايتينيز Chitinase المنقى باستخدام كبريتات الامونيوم للفطريات الممرضة الثلاث للفطر *M. phaseolina* وباختلاف معنوي عن الفطرين *R.solani* و *F.solani* والتي بلغت نسب التثبيط فيهما ٣٥.١٨ و ٣٣.٣٣ % على التوالي . ٤٧.٠٣ %

المقدمة

أن عملية التطفل المباشر من قبل الفطر.*Trichoderma* sp تعد عملية معقدة تتضمن سلسلة من الأحداث التي تبدأ بالتعرف على الفطر العائل ومن ثم الهجوم والاختراق ثم قتله وتشترك في هذه الآلية عدة إنزيمات تعمل على تحلل جدران الفطريات التي يتطفل عليها .*Trichoderma* sp ومن تلك الانزيمات كايتينيز Chitinases (Aziz وآخرون١٩٩٣ و Lorito واخرون ١٩٩٣ و Harman وآخرون١٩٩٦). إذ يتعرف الفطر .*Trichoderma* sp على وجود الفطريات العائلة له في محيطه الحيوي عن بعد بوساطة تحسس نواتج تحليل الجدر الخلوية نتيجة عمل مجموعة إنزيمات CWDEs Cell-Wall- Degrading Enzymes ومنها Chitinases, و Glucanases وProteases إذ يفرز مبدئيا كميات قليلة من الإنزيم Exochitinases إلى محيطه الحيوي وعندما تتحطم جدران الفطريات الأخرى وتطلق ناتج تحللها عدة مواد منها Oligomers التي تعمل في استحثاث إنتاج إنزيمات Exochitinases بكميات اكبر ومن ثم يبدأ الفطر .*Trichoderma* sp بالتطفل المباشر على عائله (Harman وآخرون٢٠٠٤). وفضلا عن ذلك فان تنشيط المقاومة المستحثة الجهازية في النباتات مرتبط مع البروتينات المتعلقة بالدفاع Defense-Related ومن هذه البروتينات انزيم الكايتينيز Chitinases (Dyakov وآخرون ،٢٠٠٧) . ويعد الفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid احد اهم المسببات المرضية المستوطنة للتربة Soil borne pathogen إذ يسبب مرض التعفن الفحمي لاكثر من ٥٠٠ عائل نباتي من بينها نباتات اقتصادية من ذات الفلقة الواحدة والفلقتين (Su وآخرون، ٢٠٠١) كما يعد من الفطريات التي يصعب السيطرة عليها بسبب فترة بقاءه الطويلة في التربة بهيئة أجسام حجرية سوداء Microsclerotia لها المقدرة في البقاء تحت ظروف الجاف لمدة تصل إلى اربع سنوات فتكون مصدر للإصابة الأولية للجذور إلا انها تفقد حيويتها خلال مدة لا تزيد عن ٧-٨ اسابيع في الترب الرطبة (Abawi وOlaya ، ١٩٩٦) .إن الهدف من هذه الدراسة هو لتحديد الظروف التي توثر على إنتاج إنزيم الكايتينيز Chitinases مختبريا ودور هذا الإنزيم في المقدرة التطفلية والتضادية للفطر .*T.harzianum* مع الإشارة القدرة التحليلة لهذا الإنزيم .

مواد البحث وطرائقه

عزلة المقاوم الحيوي :استخدمت العزلة Th(k20)N22 وهي عزلة مطفرة من الفطر *Trichoderma harzianum* (طه والبهادلي،١٩٩١ وإبراهيم ،٢٠٠٩) .

تاريخ تسلم البحث ٢٠١٠/١٠/١٧ وقبوله ٢٠١٠/١٢/٨

الفطريات الممرضة : استخدمت الفطريات *Macrophomina phaseolina* ، *Fusarium Rhizoctonia solani solani* تم الحصول عليها من قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل . تمت تنميتها عل الوسط الغذائي السائل Potato Dextrose Broth (PDB) المكون من مستخلص ٢٠٠غم من البطاطا و ٢٠غم دكستروز Dextrose / لتر ماء مقطر وتم توزيع الوسط 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 سبق تنميتها على الوسط الغذائي PDA بعمر خمسة أيام ثم حضنت الدوارق في درجة حرارة ٢٥° ±٢° لمدة ١٠ أيام . رشحت المزارع السائلة خلال ورق ترشيح نوع Whatman No.1 وذلك للحصول على الكتلة الحيوية للفطريات الممرضة ثم حفظت في درجة حرارة ٤°سيليزية لحين استخدامها في التجارب اللاحقة .

تاثير درجات الحرارة على إنتاج الكايتينيز Chitinase : : تم تنمية العزلة Th(K20)N22 على وسط MSM المدعم بـ٠.٥% chitine وضبطت دالة الاس الهيدروجيني عند ٦ وفي درجات الحرارة ١٥ ، ٢٠ ،٢٥ ،٣٠ ،٣٥ ±٢° لمدة ٥ أيام رشحت المزارع السابقة خلال ورق ترشيح نوع Whatman No.1 وذلك للحصول على راشح مزرعة الفطر ثم حفظ الراشح في درجة حرارة -١٠°سيليزية لحين تقدير فاعلية الانزيم .

تاثير دالة الاس الهيدروجيني على إنتاج الكايتينيز Chitinase : تم تنمية العزلة Th(K20)N22 على وسط MSM المدعم بـ٠.٥% chitine في المستويات التالية لدالة الاس الهيدروجيني ٣، ٤ ، ٥ ،٦ ،٧ ،٨ لمدة ٥ أيام عند درجة حرارة ٢٥° ±٢° لمدة ٥ أيام. رشحت المزارع السابقة خلال ورق ترشيح نوع Whatman No.1 وذلك للحصول على راشح مزرعة الفطر ثم حفظ الراشح في درجة حرارة -١٠°سيليزية لحين تقدير فاعلية الانزيم .

تقدير فاعلية إنزيم الكايتينيز Chitinase : 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 3,5 –dinitrosalicylic (DNS 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 .

القدرة التحليلية لإنزيم الكايتينيز Chitinase : تم تنمية العزلة Th(K20)N22 على وسط MSM المدعم Chitine كمصر كاربوني عند درجة حرارة ٢٥° ±٢° لمدة ٥ أيام. وعند انتهاء فترة التحضين وزع راشح مزرعة الفطر في دوارق مخروطية الشكل سعة ١٠٠مل وبمعدل ١٠مل/دورق .ثم جرى تلقيح الدوراق المخروطية بالغزل الفطري للفطريات *M. phaseolina* و *Rhizoctonia solani* و *F. solani* بواقع ١ ملغم / مل وزن جاف او ١٠ ملغم /مل وزن رطب حضنت الدوراق عند درجة حرارة ٣٧ ±٢° لمدة ٢٤ ساعة جرى بعد ذلك تقدير كمية السكر المتحر بتقدير كمية N-acetylglucosamin الناتجة عن تحلل المادة الاساس . أما معاملة المقارنة فقد أشتملت على راشح العزلة Th(K20)N22 المعامل حراريا لتثبيط الانزيم .

عزل وتنقية إنزيم الكايتينيز Chitinase :تم عزل الانزيم بترسيب البروتين من راشح مزرعة العزلة Th(K20)N22 تنمية الفطر*Trichoderma sp* على وسط MSM المدعم بالكايتين كمصر كاربوني عند درجة حرارة ٢٥° ±٢° لمدة ٥ أيام . باستخدام كبريتات الامونيوم إذ تمت إضافة كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة وبتشبع (٠-٧٥ %) وحسب طريقة Robyt و White (١٩٨٧).

تقدير الفاعلية الحيوية لانزيم الكايتينيز Chitinase المنقى :تم تقدير الفاعلية الحيوية لانزيم الكايتينيز Chitinase المنقى باستخدام الفطريات *M. phaseolina* و *R.solani* *F. solani* وحسب طريقة Wang وآخرون (٢٠٠٦) المحورة وذلك باضافة نسبة ١٠ % من الانزيم المنقى الى الوسط الغذائي PDA صبت الوسط في أطباق بتري معقمة قطر ٩ سم ولقحت بأقراص قطر كل منها ٠.٥ سم مأخوذة من مزرعة حديثة للفطريات *M. phaseolina* و *R.solani* و *F.solani* . حضنت الأطباق في درجة حرارة ٢٥° ±٢° . وتم حساب متوسط أقطار المستعمرات الفطرية بقياس متوسط قطرين متعامدين يمران بمركز الطبق بعد وصول نمو الفطر في معاملة المقارنة التي احتوت على الوسط PDA إلى حافة الطبق. استخرجت النسبة المئوية للتثبيط من المعادلة :

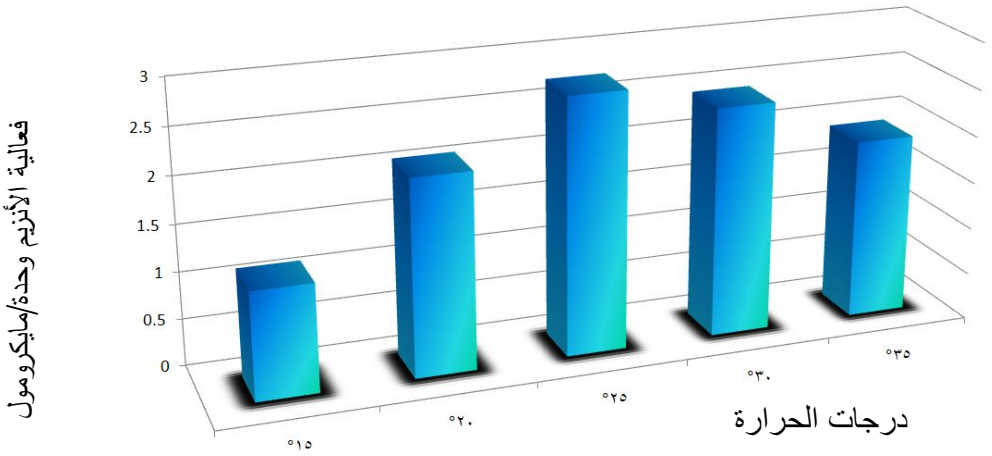
النسبة المئوية للتثبيط = (قطر المستعمرة في معاملة المقارنة - قطر مستعمرة المعاملة) / قطر المستعمرة في معاملة المقارنة × ١٠٠

قطر المستعرة في معاملة المقارنة

نفذت التجارب باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD وقورنت المتوسطات باستخدام اختبار دنكن المتعدد المدى وبمستوى احتمال ٥% .

المناقشة

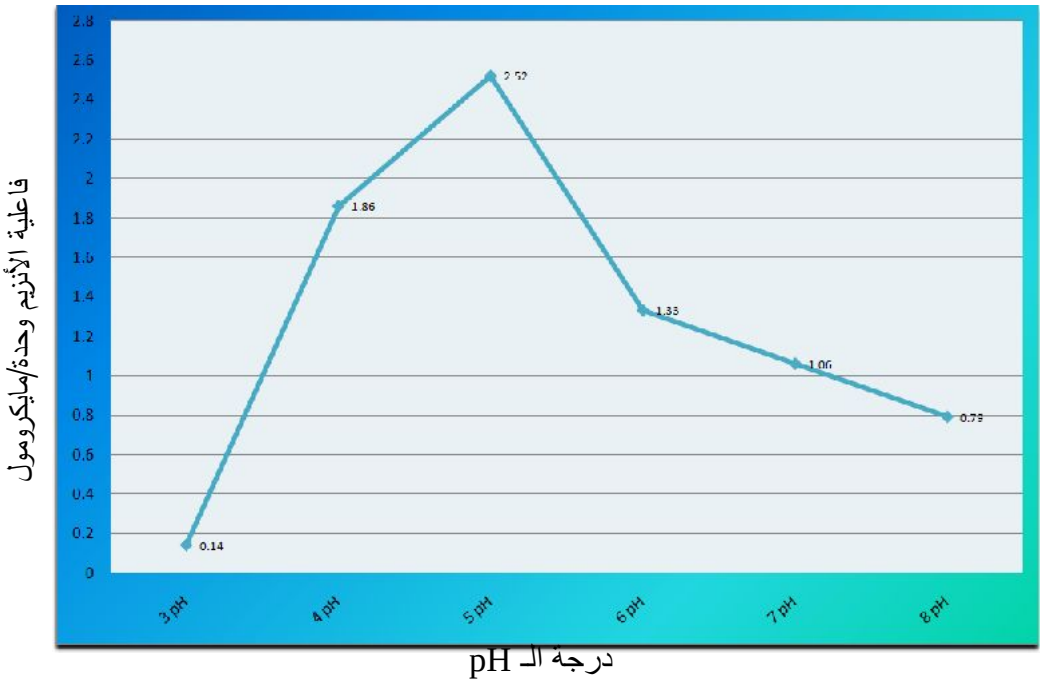
تبين النتائج الموضحة في الشكل (١) ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج اعلى مستوى من إنزيم الكايتينيز Chitinase كانت ٢٥ °سيليزية (±٢°) إذ بلغت فاعلية الانزيم ٢.٧٤ وحدة /مايكرومول/دقيقة والتي اختلفت معنوياًعن بقية درجات حرارة التحضين الأخرى أما النتائج الموضحة في الشكل (٢) فتوضح ان درجة دالة الاس الهيدروجيني الملائمة لإنتاج أعلى مستوى من إنزيم الكايتينيز Chitinase كانت عند pH ٥ وكانت فاعلية الانزيم ٢.٢٥ وحدة /مايكرومول/دقيقة ومن ثم انخفضت تلك الفاعلية بزيادة مستوى دالة الأس الهيدروجيني لتصل الى ٠.٧٩وحدة /مايكرومول/دقيقة عند pH ٨.



الشكل (١) تأثير درجات الحرارة على إنتاج الكايتينيز Chitinase

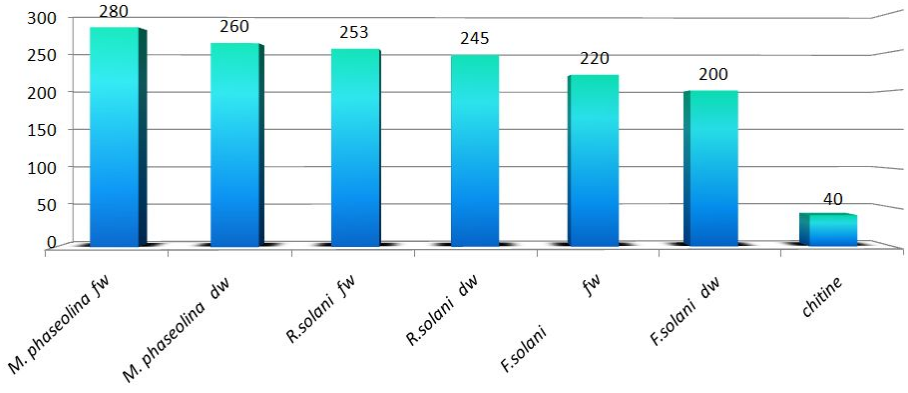
وأشارت العديد من الدراسات ان مستوى دالة الاس الهيدروجيني المثالي لإنتاج أقصى كمية من إنزيم الكايتينيز Chitinase تقع مابين ٦-٥.٥ pH وان مستوى دالة الاس الهيدروجيني يعد من العوامل المحددة لمستوى انتاج انزيم الكايتينيز Chitinase وان مستوى انتاج الانزيم يتاثر بدالة الاس الهيدروجيني (El-Katatny وآخرون ٢٠٠٠ و وآخرون ٢٠٠١) .

ويوضح الشكل (٣)اختلاف المقدرة التحليلية لإنزيم الكايتينيز Chitinase في راشح مزرعة العزلة Th(K20)N22 الخام باختلاف نوع الفطر الممرض وطبيعة الغزل الفطر الرطب والجاف وسجلت أعلى مقدرة تحليلية لإنزيم الكايتينيز Chitinase في راشح المزرعة الخام للفطر *M. phaseolina* عند استخدام الغزل الفطري الرطب إذ بلغت كمية سكر N-acetylglucosamin المتحرر ٢٨٠ مايكروغرام /مل وباختلاف معنوي عن الفطرين *R.solani* و *F.solani* عند استخدام الغزل الفطري الرطب والجاف وبلغ أدنى مستوى كمية سكر N-acetylglucosamin المتحرر ٢٠٠ مايكروغرام /مل .



الشكل (٢) : تأثير دالة الأس الهيدروجيني على إنتاج الكايتينيز Chitinase

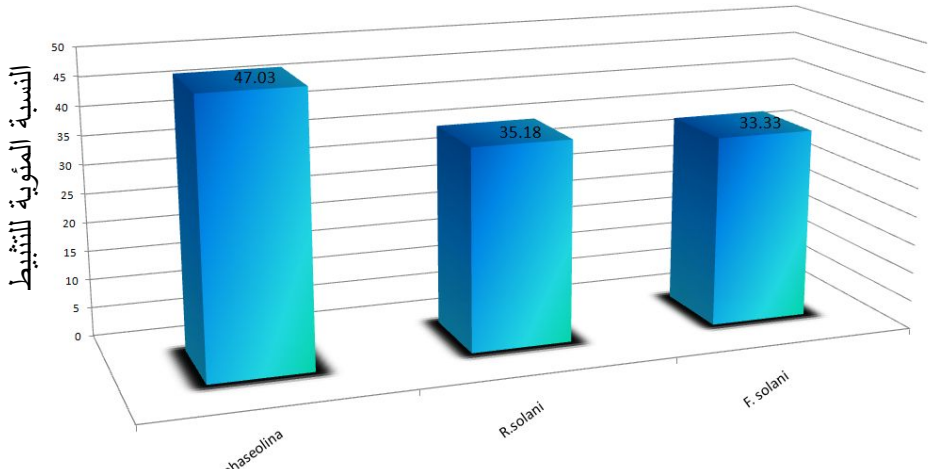
وبلغ مستوى سكر N-acetylglucosamin المتحرر ٤٠ مايكروغرام /مل عند استخدام chitine كمصدر للكاربون (El-Katatny وآخرون ٢٠٠٠) ويحتوي راشح المزرعة الخام للفطر *Trichoderma* sp. على انزيم الكايتينيز Chitinase الذي يعمل على اطلاق سكر N-acetylglucosamin من



مكونات الغزل الفطري للفطريات الممرضة ومنها الفطريات *Sclerotium rolfsii* و *R.solani* و *Botrytis cinerea* وهذا يشير الى المقدرة التحليلية العالية لهذا الإنزيم وان هذه المقدرة تقترن بالقدرة التطفلية للفطر *Trichoderma* sp ونشاطه وفعاليته كمقاوم حيوي . ويتأثر مستوى إنتاج انزيم الكايتينيز Chitinase وبشكل معنوي بوجود الغزل الفطري لفطريات الممرضة في الوسط الذي تتم تنمية الفطر *Trichoderma* sp. عليه ويزداد مستوى إنتاج انزيم الكايتينيز Chitinase (De la Cruz وآخرون ١٩٩٢ وEl-Katatny وآخرون ٢٠٠٣) ان نواتج التحلل وخاصة N-acetylglucosamin لها قدرة تنظيمية لمستوى تخليق الانزيم وفي الأوساط المدعمة بالغزل الفطري الرطب يزداد مستوى إنتاج انزيم الكايتينيز Chitinase عن مستوى انتاجه في الاوساط المدعمة بالغزل الفطري الجاف وقد يعود ذلك إلى وجود بعض المواد الايضية التي ينتجها الفطر الممرض كرد فعل على التطفل .ويوضح الشكل (٤) التأثير المثبط لإنزيم الكايتينيز Chitinase المنقى باستخدام كبريتات الامونيوم للفطريات الممرضة الثلاث وبلغ اعلى مستوى للتثبيط ٤٧.٠٣ % للفطر *M. phaseolina* وباختلاف معنوي عن الفطرين *R.solani* و *F.solani* والتي بلغت نسب التثبيط فيهما ٣٥.١٨ و ٣٣.٣٣ % على التوالي (Baek وآخرون ١٩٩٠، وLimon وآخرون ١٩٩٩،) . واشار Joans واخرون (١٩٩٩) الى المقدرة التثبيطية لانزيم الكايتينيز Chitinase للغزل الفطري للفطر *R.solani* فضلا ً عن ان نواتج تحلل الجدر الخلوية بفعل انزيم الكايتينيز Chitinase ومنها مركبات Oligomers تعد كمستحثات وإشارات لاستحثاث دفاعات النبات وهذا يعز فاعلية الفطر *Trichoderma* sp. كمقاوم إحيائي . إذ يعد انزيم الكايتينيز Chitinase احد أدوات التطفل الفعالة من خلال تحطيمه الجدار الخلوي لان الكايتين يشكل المكون الأساس لجدر الفطريات. فضلاً عن دوره في التطفل فان له دوراً أخر بتثبيطه نمو الغزل الفطري للفطريات الممرضة التي يتطفل عليها الفطر *Trichoderma* sp. ويستحث إنتاج إنزيم الكايتينيز Chitinase وبشكل معنوي عندما تتم تنمية الفطر *Trichoderma* sp. في أوساط مدعمة بالغزل الفطري للفطريات التي يتطفل عليها الفطر *Trichoderma* sp. (Brunner، ٢٠٠٣، Howell , ٢٠٠٣، و Harman و Chet، ١٩٩٦)

تركيز N-acetylglucosamin مايكروغرام/مل

الشكل (٣) : القدرة التحليلية لانزيم الكايتينيز Chitinase



الشكل (٤): الفاعلية الحيوية لإنزيم الكايتينيز Chitinase المنقى

THE ABILITY OF *Trichoderma harzianum* TO PRODUCE CHITINASE

KHALID H.TAHA Nidhal Y. M. Al-Morad BASSAM Y.IBRAHEEM
Dept. of Plant Protection, College of Agric and Forestry. Univ. of Mosul .Iraq

ABSTRACT

The result showed that optimum temperature for maximum activity of Chitinase was 25 Cº with 2.74 unit/µm/min. while optimum pH for maximum activity Chitinase was 5 with 2.25 unit/µm/min . Significant activities of chitinase was produced by *T. harzianum* in culture media amended with fresh mycelium of *M. phaseolina* , where the releasing of reducing sugar N-acetylglucosamin was 280 µg/ml which Significantly differ from *T. harzianum* culture media amended with fresh and dry mycelium of *R.solani* and *F.solani* where the releasing of reducing sugar N-acetylglucosamin was 200 µg/ml. Production of chitinase using a medium containing chitin reached 40 µg/ml . Maximium chitinase inhibition activity, purified by ammonium sulphate, was recorded for *M. phaseolina* mycelium growth 47.03% , which Significantly differ with of *R.solani* and *F.solani* where the inhibition activity was 35.18 and 33.33% respectively

المصادر

إبراهيم ، بسام يحيى(٢٠٠٩).استحداث طرز إحيائية من الفطر *Trichoderma* spp. لتحسين كفاءتها كعوامل للمكافحة الإحيائية وتحفيز نمو للنبات . أطروحة دكتوراه ،كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل .

طه ، خالد حسن و علي حسين البهادلي (١٩٩٣). 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 A01N ، تصنيف عراقي ٣ .

Abawi, G. S. and M. A. Pastor–Corrales (1989). Charcoal rot screening procedure and virulence of *Macrophomina phaseolina* isolates on dry edible beans. Turrialba 39: 200 – 207.

Aziz, N. H.; M. Z. El-Fouly; A. A. El-Essawy and M.A.Khalaf (1997). Influence of been seedling root exudates on the rhizosphere conolazation by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. Bot.Bull.Acad. 38:33-39.

Baek, J.M.; Howell, C.R. and Kelerney, C.M. (1999). The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani.* Current Genetics 35:41-50.

Brunner,K.; C.K. Peterbauer ; R.L. Mach; M. Lorito; S. Zeilinger and C.K. Kubicek (2003). The Nag1 *N*-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol, Curr. Genet. 43 : 289–295.

De la Cruz, J.; Rey, M.; Lora, J.M.; Hidalgo-Gallego, A.; Domínguez, F.; Pintor-Toro, J.A.; Llobell, A. and Benítez,T. (1992). Carbon source control on ß-glucanase, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. Archives in Microbiology 159:316-322 .

Dyakov, Yu. T. ; V. G. Dzhavakhiya and T. Korpele (2007). Comprehensive and Molecular Phytopathology Elsevier Publications. 483 pp.

El-Katatny MH, Gudelj M, Robra KH, Elnaghy MA, Gubitz GM (2001). Characterization of a chitinase and an endo-β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Appl Microbiol Biotechnol 56:137-143.

El-Katatny,M.H.; Ahmed M. Hetta, Gehan M.Shaban and Hesham M. El-Komy (2003).Improvement of Cell Wall Degrading Enzymes Production by Alginate Encapsulated *Trichoderma* spp. Food Technol. Biotechnol. 41: 219–225 .

El-Katatny,M.H.; W. Somitsch1; K.-H. Robra1; M. S. El-Katatny and G. M. Gübitz1 (2000). Production of Chitinase and □-1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technol. Biotechnol. 38:173–180.

Harman, S.; Schikler, H.; Oppenheim, A. and Chet, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathology 86:981-985.

Harman , G . E.; C.R. Howell ; A.Viterbo ; I. Chet and M. Lorito (2004). *Trichoderma* species-opportunistic a virulent plant symbionts. Nature Reviews 2:43-56.

Howell CR (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of currentconcepts. Plant Dis 87:4-10.

Limon, M. C., Pintor-Toro, J. A., and Benítez, T. (1999). Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. Phytopathology 89:254-261.

Lorito M.; Harman, G.E.; Hayes, C.K.; Broadway, R.M.;Troncoso, A.; Woo, S.L. and di Pietro, A. (1993). Chitynolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiase. Phytopathology 83:302-307.

Robyt,F.J.and White,J.B.(1987).Biochemical techniques theory and practice .Books Cole Publishing C0.,USA,141,235-236.

Su, G., Suh, S.O., Schneider, R.W., and Russian, J.S. (2001). Host specialization in charcoal rot fungus *Macrophomina phaseolina* phytopathology 91: 120-126.

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