مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد العشرون - المجلد الأول - علوم الحياة - تشرين أول 2022 م
doi.org/10.52866/esj.2022.01.20.09

تثبيط عوامل ضراوة الفطر *M.phaseolina* المسبب لمرض التعفن الفحمي في زهرة الشمس بإستخدام بعض العوامل الكيميائية و الإحيائية

عوف عبدالرحمن احمد الجبوري ، عبدالله عبدالكريم حسن
جامعة تكريت / كلية الزراعة - قسم وقاية النبات
Awfabd91@tu.edu.iq
البحث مستل من أطروحة الباحث الاول*

مستخلص:

أُجريت التجربة في مختبرات قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة تكريت للعام 2021–2020 لإختبار التأثير التثبيطي لبعض العوامل الكيميائية والحيوية على الإنزيمات المرضية التي ينتجها الفطر *Macrophomina phaseolina* والتي شملت إنزيم السليليز والبكتينيز والبروتيز ، وبينت النتائج تفوق حامض الستريك عند التركيز ٪5 على بقية المعاملات في تثبيطه للفعالية الإنزيمية إذ بلغت الفعالية الإنزيمية للسليليز والبكتينيز في هذه المعاملة 1.17 و 1.12 وحدة/ مل بينما تفوق ملح الـ SDS عند التركيز ٪5 على بقية معاملات التجربة في تثبيطه لإنزيم البروتيز و الذي بلغت عنده الفعالية الإنزيمية 4.66 وحدة/ مل بينما بلغت الفعالية الانزيمية في معاملة المقارنة 5.09 و 3.01 و 9.97 وحدة/ مل للإنزيمات الثلاث سليليز وبكتينيز وبروتيز على التوالي ، أما فيما يخص المعاملات الحيوية فلم يكن هنالك ثبيطاً كبيرة لفعالية الإنزيمات و تفوقت معاملة راشح البكتريا *Pseudo-monas fluorescens* على معاملة راشح بكتريا *Bacillus subtilis* إذ بلغت فعالية الانزيمات سليليز و بكتينيز و بروتيز 2.52 و 2.5 و9.06 وحدة/ مل على التوالي لراشح بكتريا *P. fluorescens* مقارنة بـ 2.86 و 2.77 و 9.59 وحدة/ مل على التوالي لراشح *B. subtilis* بينما بلغت الفعالية الانزيمية في معاملة المقارنة 5.09 و 3.01 و 9.97 وحدة/ مل للإنزيمات الثلاث على التوالي.

الكلمات المفتاحية : التعفن الفحمي، إنزيم السليليز ، انزيم البكتينيز، انزيم البروتيز، *Macrophomina phaseolina* .

Scaling the virulence factors of *M.phaseolina*, the cause of charcoal rot disease in sunflowers, by using some chemical and biological factors

Awf A.Ahmed Al-Jbory and Abdullah A. Hasan
Tikrit University / College of Agriculture, Plant Protection Department
Email: Awfabd91@tu.edu.iq

Abstract :

The experiment was conducted in the laboratories of the Plant Protection Department - College of Agriculture - Tikrit University for the year 2020-2021 to test the inhibitory effect of some chemical and biological factors on the pathological enzymes produced by the fungus *Macrophomina phaseolina*, which included cellulase, pectinase and protease enzymes, and the results showed the superiority of citric acid when The concentration of 5% on the rest of the treatments inhibited the enzyme activity, as the enzyme activity of cellulase and pectinase in this treatment reached 1.17 and 1.12 units/ml, while the SDS salt at the concentration of 5% was superior to the rest of the experiment treatments in inhibiting the protease enzyme, which had an enzyme activity of 4.66 Unit/ml, while the enzyme activity in the comparison treatment was 5.09, 3.01 and 9.97 units/ml for the three enzymes cellulase, pectinase and protease, respectively. As for the biological treatments, there was no significant inhibition of the enzymes' effectiveness. The treatment of *Pseudomonas fluorescens* filters was superior to the *Bacillus subtilis* filters. The activity of cellulase, pectinase and protease enzymes reached 2.52, 2.5 and 9.06 units/ml respectively for *P. fluorescens* filters. Compared with 2.86, 2.77 and 9.59 U/ml respectively for B. subtilis filter, while the enzyme activity in the control treatment was 5.09, 3.01 and 9.97 U/ml for the three enzymes, respectively.

Key words: charcoal rot, cellulase enzyme, pectinase enzyme, protease enzyme, *Macrophomina phaseolina*.

المقدمة.

يعد مرض التعفن الفحمي المتسبب عن الفطر *Macrophomina phaseolina* أحد أهم الامراض التي تسبب خسائر إقتصادية كبيرة و يصيب هذا الفطر مدى واسع من نباتات ذوات الفلقة الواحدة مثل الذرة البيضاء و الصفراء وغيرها و نباتات ذوات الفلقتين مثل زهرة الشمس و السمسم و فول الصويا و الخيار و البطيخ و فستق الحقل و غيرها (23)(13) و إن أول تسجيل لهذا المسبب المرضي على زهرة الشمس كان في سريلانكا وذلك في عام 1927 بعد ذلك سجل في كل من الأورغواي ويوغسلافيا و استراليا عام 1966 وسجل في السنغال والأرجنتين عام 1967 وفي الهند سجل هذا المسبب في عام 1973 ، أما في المنطقة العربية فقد سجل في مصر عام 1980 (14) وقد سجل (7) مرض التعفن الفحمي لاول مرة في العراق على نبات السمسم في منطقة أبو غريب ببغداد و بعدها سجل المرض على محاصيل أخرى مثل زهرة الشمس و فول الصويا و الماش و القطن و الباقلاء(3) كما سجل مرض التعفن الفحمي على الذرة الصفراء في العراق حسب (2).

ومن أهم الأسباب التي تؤدي الى ظهور أعراض المرض هو إنتاج الفطر الممرض للإنزيمات الهاضمة مثل إنزيم السليليز و البكتينيز التي تعمل على تحليل السليلوز والبكتين في جدران خلايا النبات العائل وبالتالي إنسداد حزم الأوعية الناقلة بنواتج التحلل الإنزيمي والأجسام الحجرية الصغيرة والغزل الفطري فضلاً عن إنتاج الفطر لبعض السموم النباتية مثل الـ Phaseolenone والـ Botryodiplodin وغيرها التي تعمل على قتل خلايا الأوعية الناقلة وظهور أعراض التنخر والتأثير على نفاذية أغشية الخلايا حيث يكون لهذه العوامل و تأثيرها مجتمعةً أو منفردة أهمية كبرى في إحداث الإصابة و تكشف أعراض المرض (5)(6)(11) كذلك أشار (20) أن إفراز المسبب المرضي للإنزيمات المحللة للسليلوز والبروتين يساعد على إحداث الإصابة على النبات العائل في مراحل نموه المبكرة كما يمكنه من إحداث تعفنات البذور وموت البادرات وكذلك تعفن الجذور وبالنظر الى دور هذه الإنزيمات الهام في إحداث الإصابة و تطور أعراض المرض فقد هدفت هذه الدراسة الى معرفة تأثير بعض العوامل الكيميائية و الاحيائية على تثبيط الفعالية الإنزيمية لعدد من الإنزيمات التي ينتجها الفطر الممرض.

المواد و طرائق العمل.

1. عزل وتشخيص المسبب المرضي *M.phaseolina*

تم إجراء العزل من حقول محافظة صلاح الدين إذ اخذت أجزاء من الجذور و قواعد السيقان لنباتات زهرة الشمس التي تظهر عليها اعراض الإصابة بمرض التعفن الفحمي، وغسلت بالماء الجاري لمدة 30 دقيقة، ثم قطعت الى اجزاء صغيرة بطول 0.5 سم و عقمت سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (1 ٪ كلور حر) لمدة 3 دقائق ، بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم و جففت على ورق ترشيح و زرعت بواقع 4 قطع لكل طبق بتري بقطر 9 سم حاوي على ألوسط الغذائي PDA (Agar Dextrose Potato) والمضاف إليه المضاد الحيوي Tetracycline بمعدل 100 ملغم / لكل لتر للحد من نمو البكتريا .وتم تحضين الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 سيليزية لمدة 3 أيام، و بعد نمو المستعمرات الفطرية ثمت عملية التنقية بنقل قطعة صغيرة من أطراف الخيوط الفطرية و وضعت في مركز طبق بتري حاوي على الوسط الغذائي PDA وتم التشخيص المظهري للفطر اعتماداً على صفات

المستعمرة الفطرية مثل لون وشكل المستعمرة وطبيعة الغزل الفطري والتراكيب التي يكونها وباستخدام المفتاح التصنيفي المعتمد من قبل(21).

2. تقدير انزيم السليليز

1.2. تنمية الفطر *M.phaseolina* على وسط تشابك دوكس CD المدعم بـ CMC لتقدير انزيم السليليز.

قُدر إنزيم السليليز المنتج من عزلة الفطر *M.phaseolina* المعزول من نبات زهرة الشمس التي تفوقت في إمراضيتها على باقي عزلات الفطر في تجربتي نسبة إنبات البذور في الاطباق وكذلك أعطت أعلى نسبة و شدة إصابة في تجربة الاصص ، إذ إستخدمت 5 دوارق زجاجية سعة 500 مل وأضيف اليها الوسط السائل تشابك دوكس CD الخالي من اي مصدر للسكريات و المدعم بـ 5 غم من مادة كاربوكسي مثيل سليلوز من مادة البكتين النقي كمصدر وحيد للكاربون إذ حضر هذا الوسط حسب (15) وذلك من خلال إذابة 0.02 غم من كبريتات الحديد $FeSO_4$ و0.5 غم من كبريتات المغنسيوم $MgSO_4$ و0.5 غم من كلوريد البوتاسيوم KCl و 1غم من فوسفات البوتاسيوم أُحادية الهيدروجين K_2HPO_4 و1 غم من كبريتات الامونيوم و 5 غم من نترات الصوديوم NaCl في 1000 مل ماء مقطر و أضيف اليه 5 غم من كاربوكسي مثيل سيليلوز CMC وقسم الوسط الى 5 دوارق المعقم في بيكر زجاجي و وضع على جهاز التحريك المغناطيسي Stirrer Magnetic و ضُبطت درجة الحرارة على 90 م° مع مراعاة التحريك المستمر حتى الإذابة التامة للـ CMC بدون حدوث تكتل بواقع 200 مل وسط لكل دورق، وعُقمت بالمؤصدة Autoclave حسب الظروف المعروفة عند درجة حرارة 121م° وضغط 1.5 كغم / سم^2 لمدة 15 دقيقة وبعد إنتهاء التعقيم بُردت الأوساط ولقحت الدوارق بعدها بقطعة (1 سم^2) من مستعمرة نشطة للفطر *M.phaseolina* بعمر 3 أيام، ثم حُضنت تلك الدوارق الملقحة عند درجة حرارة 25 ±2 م° و لمدة 7 ايام مع مراعاة التحريك المستمر للأوساط لنحصل على نمو متجانس (18).

2.2. تحضير إنزيم السليليز الخام.

بعد مرور فترة التحضين المذكورة في نهاية الخطوة السابقة رُشح وسط تشابك دوكس CD بإستخدام ورق ترشيح المعروف بـ Whattman N0.1 إذ وضع في قمع بخنر مربوط بجهاز التفريغ الكهربائي و جمع راشح الوسط وأُجريت بعدها عملية النبذ بسرعة 5000 دورة / دقيقة و لمدة 10 دقائق، ثم أهمل الراسب الذي يمثل الشوائب و جُمع الرائق الذي يمثل انزيم السليليز الخام الذي حُفظ في الثلاجة على درجة حرارة 4 م° لوقت الإستخدام.

3.2. قياس فعالية إنزيم السليليز .

إتُبعت الطريقة الموصوفة من قبل (22) في قياس فعالية انزيم السليليز إذ أضيف 1 مل من محلول كاربوكس مثيل سليلوز مع 1 مل من محلول الفوسفيت المنظم pH =6 مع 1 مل من الراشح الخام لإنزيم السليليز لتكوين مزيج التفاعل، حُضن مزيج التفاعل على درجة حرارة 30 م° و لمدة ساعة واحدة و اضيف إليه 1 مل من محلول Di Nitro Salicylic (DNS) acid و حُضن مرةً أخرى في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق، ثم بردت أنابيب الإختبار بسرعة بإستخدام ماء الحنفية وسجلت قراءات (الامتصاصية) على جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طولٍ موجي قُدر بـ 540 نانوميتر، واعتمد بعد ذلك على منحنى سكر الكلوكوز القياسي في تقدير فعالية إنزيم السليليز و التي عُرفت بانها تلك الكمية من الإنزيم

اللازمة لتحرير (1) مايكرومول من مادة كاربوكسي مثيل سليلوز CMC (المادة الاساس) في الدقيقة الواحدة وحسب ظروف التجربة و التفاعل المستخدمة.

3. تقدير إنزيم البكتينيز .

1.3. تنمية الفطر *M.phaseolin* على وسط تشابك دوكس CD المدعم بالبكتين.

قُدر إنزيم البكتينيز المنتج من عزلة الفطر *M.phaseolina* المعزول من نبات زهرة الشمس ، إذ إستخدمت 5 دوارق زجاجية سعة 500 مل وأضيف اليها الوسط السائل تشابك دوكس CD الخالي من اي مصدر للسكريات و المدعم بـ 5 غم من مادة البكتين النقي كمصدر وحيد للكاربون إذ حضر هذا الوسط حسب (15) وذلك من خلال إذابة 0.02 غم من كبريتات الحديد $FeSO_4$ و 0.5 غم من كبريتات المغنسيوم $MgSO_4$ و 0.5 غم من كلوريد البوتاسيوم KCl و1غم من فوسفات البوتاسيوم أُحادية الهيدروجين K_2HPO_4 و1 غم من كبريتات الامونيوم و 5 غم من نترات الصوديوم NaCl في 1000 مل ماء مقطر وأضيف اليه 5 غم من البكتين و قسم الوسط الى 5 دوارق بواقع 200 مل وسط لكل دورق، وعُقمت بالمؤصدة Autoclave حسب الظروف المعروفة عند درجة حرارة 121 م° وضغط 1.5 كغم / سم^2 لمدة 15 دقيقة وبعد إنتهاء عملية التعقيم بُردت الأوساط ولقحت الدوارق بعدها بقطعة (1 سم^2) من المستعمرة اعلاه والتي تمتاز بكونها مستعمرة نشطة بعمر 3 أيام، ثم حُضنت تلك الدوارق الملقحة عند درجة حرارة 25 ±2 م° ولمدة 7 ايام مع مراعاة التحريك المستمر للأوساط لنحصل على نمو متجانس (12).

2.3. تحضير إنزيم البكتينيز الخام.

بعد مرور فترة التحضين المذكورة في نهاية الخطوة السابقة رُشح وسط تشابك دوكس CD بإستخدام ورق ترشيح المعروف بـ Whattman N0.1 إذ وضع في قمع بخنر مربوط بجهاز التفريغ الكهربائي و جمع راشح الوسط وأُجريت بعدها عملية النبذ بسرعة 5000 دورة / دقيقة و لمدة 10 دقائق، ثم أهمل الراسب الذي يمثل الشوائب و جُمع الرائق الذي يمثل انزيم البكتينيز الخام الذي حُفظ في الثلاجة على درجة حرارة 4 م° لوقت الإستخدام.

3.3. قياس فعالية إنزيم البكتينيز .

إتُبعت الطريقة الموصوفة من قبل (22) في قياس فعالية انزيم البكتينيز إذ أضيف 1 مل من البكتين النقي مع 1 مل من محلول الفوسفيت المنظم pH =6 مع 1 مل من الراشح الخام لإنزيم البكتينيز لتكوين مزيج التفاعل، بعدها حُضن مزيج التفاعل على درجة حرارة 30 م° ولمدة ساعة واحدة و اضيف إليه 1 مل من محلول Di Nitro Salicylic acid (DNS) وحُضن مرةً أخرى في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق، ثم بردت أنابيب الإختبار بسرعة بإستخدام ماء الحنفية وسجلت قراءات (الامتصاصية) على جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طولٍ موجي قُدر بـ 540 نانوميتر، وأُعتمد بعد ذلك على المنحنى القياسي لحامض الكالكتيورونك في تقدير فعالية إنزيم البكتينيز والتي وصفت بانها تلك الكمية من الإنزيم اللازمة لتحرير (1) مايكرومول من حامض الكالكتيورونك (المادة الاساس) في الدقيقة الواحدة وحسب ظروف التجربة والتفاعل المستخدمة.

4. تقدير إنزيم البروتيز .

1.4.تنمية الفطر *M.phaseolin* على الوسط المحفز على إنتاج إنزيم البروتيز.

حضرت خمس دوارق حاوية على وسط إنتاج إنزيم البروتيز المحضر حسب (18) من خِلال إذابة 5غم من مادة الكازائين Casaen و5غم من سكر

الكلوكوز و10غم من مادة فوسفات البوتاسيوم أُحادية الهيدروجين K2HPO4 10 غم من كبريتات المغنيسيوم MgSO4 في 1000 مل من الماء المقطر ثم قُسم الوَسط الى 5 دوارق سعة 500 مل و بمعدل 200 مل لكل دورق وأُغلِقت فوُهاتها بإستعمال سداداتٍ قطنية وأُدخلت في جهاز المؤصدة Autoclave لغرض التعقيم ، وضُبط الجهاز على درجة حرارة 121 مْ و ضَغط يقدر بـ 1.5 كغم/ سم^2 ولمدة 15 دقيقة و بعد إنتهاء مدة التعقيم أصبح الوسط جاهزاً للتلقيح بعزلة الفطر *M.phaseolin* التي تم عزلها من نبات زهرة الشمس و بعد إتمام عملية التلقيح أُدخلت الدوارق الى الحاضنة و تم ضبط درجة حرارة التحضين على درجة 28 مْ و لمدة 14 يوم مع مراعاة الرج الدوري للدوارق لكي يتجانس نمو الفطر على كامل الوسط ، بعدها تم إخراج الدوارق و رُشح الوسط بإستخدام ورق ترشيح نوع Whatman N 0.1 ثم نبذ باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة و لمدة 5 دقائق ثم أُخرجت العينات و تم أخذ الراشح الذي يمثل مصدر إنزيم البروتيز و تم إهمال الراسب.

2.4.قياس الفعالية الإنزيمية للبروتيز

قيست الفاعلية الإنزيمية للبروتيز حسب (19) من خلال إضافة 0.1 مل من الراشح الإنزيمي في الخطوة السابقة الى 0.9 من محلول المادة الأساس(الكازائين) التي يعمل عليها الإنزيم ،بعدها تم تحضين العينات في حمام مائي على درجة حرارة 37مْ ولمدة 20 دقيقة ، وبعد إنتهاء وقت التحضين تم إضافة 2 مل من محلول مادة TCA لكل عينة لغرض وقف التفاعل على أن أن تتم الإضافة بصورة سريعة وبوقت واحد لكل العينات، ثم أُدخلت العينات في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 6000 دورة/ دقيقة و لمدة 5 دقائق بغرض تنقية الإنزيم والحصول عليه بشكل أفضل، ثم أُخذ الراشح من تلك العينات وقيست إمتصاصيته على جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على الطول الموجي 280 نانوميتر و قُدرت فعالية البروتيز الإنزيمية (وحدة/ مل) من خلال الإعتماد على مقدار التغير بمعدل 0.01 في الإمتصاصية لكل دقيقة تحضين.

5. **يتأثير العوامل الحيوية والكيميائية على الفعالية الإنزيمية لإنزيمات السليليز والبكتينيز والبروتيز (وحدة/ مل).**

إستخدم في هذه التجربة التركيزين 2.5 ٪ و5 ٪ من المواد الكيمياوية شملت بعض أنواع الاحماض العضوية وكذلك بعض أنواع الأملاح فضلاً عن إستخدام راشح كل من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtillus* بنسبة 1/ 1 (إنزيم/ راشح) والجدول (1) يوضح المثبطات و نسب إستخدامها.

جدول (1) العوامل الكيميائية و الحيوية و نسب إستخدامها

ت	المعاملة	التركيز
1	(SDS) sulfate dodecyl Sodium	5٪
2	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	2.5٪
3	Ethylene diamine (EDTA) tetra acetic acid	5٪
4	(EDTA) Ethylene diamine tetra acetic acid	2.5٪
5	حامض الستريك Citric acid	5٪
6	حامض الستريك Citric acid	2.5٪
7	حامض الخليك Acetic acid	5٪
8	حامض الخليك Acetic acid	2.5٪
9	حامض اللاكتيك Lactic acid	5٪
10	حامض اللاكتيك Lactic acid	2.5٪
11	*P. fluorescens*	1/1
12	*B. subtilis*	1/1
13	السيطرة	

1.5. تثبيط إنزيم السليليز.

تمت إضافة 1 مل من كل تركيز من المثبطات الموجودة في الجدول (1) مع 1 مل من مادة كاربوكسي مثيل سليلوز مع 1 مل من محلول الفوسفيت المنظم pH =6 مع 1 مل من الراشح الخام لإنزيم السليليز لتكوين مزيج التفاعل، بعدها حُضن مزيج التفاعل على درجة حرارة 35مْ و لمدة ساعة واحدة ثم أُضيف إليه 1 مل من محلول Di Nitro Salicylic acid (DNS) وحُضن مرةً أخرى في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق، ثم بردت أنابيب الإختبار بسرعة بإستخدام ماء الحنفية وسجلت قراءات (الامتصاصية) على جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طولٍ موجي قُدر بـ 540 نانوميتر، واعتمد بعد ذلك على منحنى سكر الكلوكوز القياسي في تقدير فعالية إنزيم السليليز لمعرفة أكفأ المثبطات التي قللت فعالية الانزيم الى الحد الادنى (22).

2.5. تثبيط إنزيم البكتينيز.

أضيف 1 مل من كل تركيز من المثبطات الموجودة في الجدول (1) ثم أُضيف 1 مل من محلول البكتين النقي مع 1 مل من محلول الفوسفيت المنظم pH =6 مع 1 مل من الراشح الخام لإنزيم البكتينيز لتكوين مزيج التفاعل، بعدها حُضن مزيج التفاعل على درجة حرارة 35مْ ولمدة ساعة واحدة و اضيف إليه 1 مل من محلول Di Nitro Salicylic acid (DNS) و حُضن مرةً أخرى في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق، ثم بردت أنابيب الإختبار بسرعة بإستخدام ماء الحنفية وسجلت قراءات (الامتصاصية) على جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طولٍ موجي قُدر بـ 540 نانوميتر، وأُعتمد بعد ذلك على المنحنى القياسي لحامض الكالكتيورونك في تقدير فعالية إنزيم البكتينيز لمعرفة أكفأ المثبطات التي قللت فعالية الانزيم الى الحد الادنى (22).

3.5. تثبيط إنزيم البروتيز.

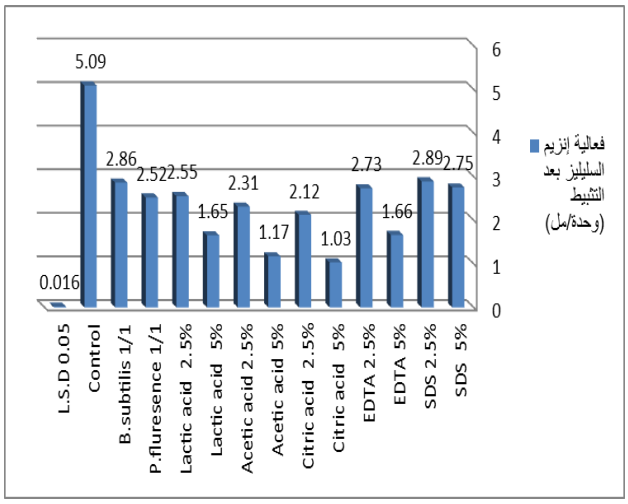
أضيف 0.1 مل من كل تركيز من المثبطات الموجودة في الجدول (1) ثم أضيف 0.1 مل من الراشح الإنزيمي للبروتيز الى 0.8 من محلول المادة الأساس(الكازائين) وهي المادة الاساس التي يعمل عليها الانزيم المحضرة من خلال إذابة 0.5 من الكازائين في 100 مل من محلول الفوسفات المنظم ذو الـ pH 6 ، بعدها تم تحضين العينات في حمام مائي على درجة حرارة 37 مْ ولمدة 20 دقيقة، وبعد إنتهاء وقت التحضين تم إضافة 2 مل من محلول مادة TCA لكل عينة لغرض وقف التفاعل على أن أن تتم الإضافة بصورة سريعة و بوقت واحد لكل العينات، ثم أُدخلت العينات في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 6000 دورة/ دقيقة ولمدة 5 دقائق بغرض تنقية الإنزيم والحصول عليه بشكل أفضل، ثم أُخذ الراشح من تلك العينات وقيست إمتصاصيته على جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على الطول الموجي 280 نانوميتر و قُدرت فعالية البروتيز الإنزيمية (وحدة/ مل) من خلال الإعتماد على مقدار التغير بمعدل 0.01 في الإمتصاصية لكل دقيقة تحضين.

النتائج و المناقشة.

1. تأثير بعض العوامل الكيميائية و الحيوية على تثبيط فعالية إنزيم السليليز.

تبين نتائج الشكل (1) أن هنالك تفوقاً معنوياً لمعاملة حامض الستريك عند التركيز 5 ٪ أذ بلغت عندها فعالية الإنزيم 1.03 (وحدة/ مل) مقارنة بـ 5.09 (وحدة/ مل) في معاملة السيطرة كما حققت جميع المثبطات الكيميائية عند التركيز 5 ٪ تفوقاً على التركيز 2.5 ٪ إذ بلغت الفعالية الإنزيمية للمعاملات SDS و EDTA وحامض الستريك و حامض الخليك

و حامض اللاكتيك 2.75 و 1.66 و 1.03 و 1.17 و 1.65 (وحدة/ مل) على التوالي مقارنة بـ 2.89 و 2.73 و 2.12 و 2.31 و 2.55 (وحدة/ مل) للمعاملات نفسها على التوالي عند التركيز 2.5٪ ، أما فيما يخص المعاملات الحيوية فقد تفوقت معاملة راشح البكتريا *P. fluorescens* تفوقاً معنوياً على معاملة راشح بكتريا *B. subtilis* إذ بلغت عندها الفعالية الإنزيمية 2.52 (وحدة/ مل) مقارنة بـ 2.86 (وحدة/ مل)، ويعود سبب تأثير حامض الستريك و الحوامض الأخرى التثبيطي للإنزيمات الى تلك الأحماض العضوية تعمل على خفض الـ pH مما يؤدي الى دنترة البروتين والتأثير على التركيب الثانوي و الثالثي للإنزيم و بالتالي يتأثر التركيب الفراغي والموقع الفعال كذلك التأثير على الشحنات الموجودة في مجاميع الكاربوكسيل والأمين (17). كذلك أوضح (4) أن لبعض الأملاح تأثير على فعالية إنزيم السليليز فقد حقق الملحين EDTA و $ZnCl_2$ اللذان استُخدما بثلاثة تراكيز هي 1 و 0.5 و0.25 مولاري في تثبيط انزيم السليليز المنقى من المسبب المرضي *M.phaseolina* إذ بلغت نسبة تثبيط إنزيم السليليز (100 و 100 و 97.45)٪ لتراكيز الملح الأول EDTA على التوالي بينما نسبة تثبيط إنزيم السليليز (100 و 100 و 95.11)٪ لتراكيز الملح الثاني $ZnCl_2$ ، كذلك قد يعزى إنخفاض الفعالية الإنزيمية عند المعاملة برواشح البكتريا *P. fluores-cens* و *B. subtilis* الى وجود بعض المركبات الأيضية التي تنتجها البكتريا والتي قد تتداخل مع الإنزيم أو مع المادة الأساس التي يعمل عليها الإنزيم مما يؤدي الى تثبيط الفعالية الانزيمية .

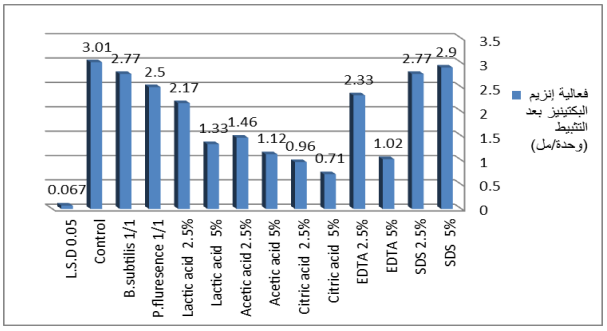


شكل (1) تأثير المثبطات الكيميائية و الحيوية على الفعالية الانزيمية لإنزيم السليليز (وحدة/ مل)

2. تأثير بعض العوامل الكيميائية و الحيوية على تثبيط فعالية إنزيم البكتينيز.

توضح نتائج الشكل (2) أن معاملة حامض الستريك عند كلا التركيزين 5 ٪ و 2.5 ٪ قد حققت تفوقاً معنوياً على جميع المعاملات من خلال قدرتها الى تقليل الفعالية الإنزيمية للبكتينيز الى 0.71 و 0.96 (وحدة/ مل) لكلا التركيزين على التوالي مقارنة بـ 3.01 (وحدة/ مل) في معاملة السيطرة، بينما حققت المعاملات الكيميائية الاخرى عند التركيز 5 ٪ تثبيطاً لفعالية إنزيم البكتينيز بلغت 2.9 و 1.02 و 1.12 و 1.33 (وحدة/ مل) للمعاملات SDS و EDTA وحامض الخليك وحامض اللاكتيك على التوالي مقارنة بـ 2.77 و2.33 و 1.46 و 2.17 (وحدة/ مل) للمعاملات نفسها عند التركيز 2.5 ٪ على التوالي ، كذلك تفوقت معاملة راشح البكتريا *P. fluorescens* تفوقاً معنوياً على معاملة راشح بكتريا *B. subtilis* إذ ثبط الراشح من فعالية إنزيم البكتينيز و بلغت فعالية الإنزيم عند معاملة *P. fluorescens* 2.5 (وحدة/ مل) مقارنة بـ 2.77 (وحدة/ مل) في معاملة *B. subtilis* ، و يعود

سبب تأثر إنزيم البكتينيز بالحوامض حسب ما ذكر (8) أن إنزيم البكتينيز يتأثر بدرجة الحموضة لكونه إنزيم قلوي يعمل عند الرقم الهيدروجيني القاعدي أو المتعادل حيث بلغت الفعالية المثلى للإنزيم 100 ٪ عند الرقم الهيدروجيني 7 بينما يتنخفض كثيراً عندما يكون الرقم الهدروجيني حامضي إنخفضت فعالية الإنزيم بشكل واضح و بلغت 10 ٪ عند الرقم الهيدروجيني 4 بينما كان هذا الإنزيم أكثر قدرة على تحمل القلوية إذ بلغت فعالية الإنزيم 85.7 ٪ عند الرقم الهيدروجيني 10، ويعزى سبب الإنخفاض في فعالية الإنزيم عن التركيز 5 ٪ مقارنة بالتركيز 2.5 ٪ الى التأثير الطردي لزيادة تركيز الحوامض على الرقم الهيدروجيني للوسط بالنسبة للأحماض العضوية و زيادة أيونات الأملاح بالنسبة لملحي SDS و EDTA التي تؤدي الى تجميع البروتين الإنزيمي و ترسيبه (10).



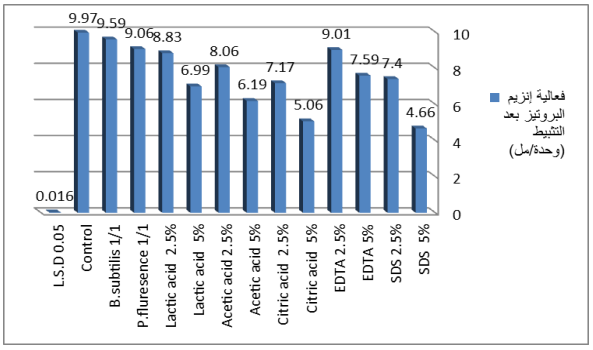
شكل (2) تأثير المثبطات الكيميائية و الحيوية على الفعالية الانزيمية لإنزيم البكتينيز (وحدة/ مل)

3. تأثير بعض العوامل الكيميائية والحيوية على تثبيط فعالية إنزيم البروتيز.

توضح النتائج في الشكل (3) أن هنالك تفوقاً معنوياً لملح الـ SDS عند التركيز 5 ٪ على بقية المعاملات إذ قللت هذه المعاملة فعالية الإنزيم الى 4.66 (وحدة/ مل) مقارنة بفعالية الإنزيم في معاملة السيطرة التي بلغت 9.97 (وحدة/ مل) بينما لم يتفوق ملح الـ SDS عند التركيز 2.5 ٪ على بقية المعاملات الأخرى إذ بلغت عنده فعالية الإنزيم 7.4 (وحدة/ مل) ، وحققت المعاملات الكيميائية الاخرى والمتمثلة بـ ملح الـ EDTA وحامض الستريك وحامض الخليك وحامض اللاكتيك عند التركيز 5 ٪ فعالية إنزيمية بلغت 7.59 و5.09 و6.19 و6.99 (وحدة/ مل) على التوالي بينما بلغت فعالية إنزيم البروتيز لنفس المعاملات عند التركيز ٪2.5 9.01 و 7.17 و 8.06 و8.83 (وحدة/ مل) على التوالي ، بينما بلغت فعالية الإنزيم في معاملتي رواشح بكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* 9.06 و 9.59 (وحدة/ مل) على التوالي، و ذكر (1) إن تأثير ملح الـ SDS يعزى الى تكوينه لمعقدات من أيونات الفلزات لها القدرة على الإرتباط بالموقع الفعال للإنزيم مما يقيد عمل الإنزيم و يجعله غير فعال أو يقلل فعاليته الى حد كبير، كذلك بينت دراسة (16) أهمية أيونات بعض ألأملاح مثل الخارصين و الصوديوم و المغنيسيوم و النحاس و الكالسيوم في تثبيط الفعالية الإنزيمية للبروتيز إذ بلغت عندها الفعالية الإنزيمية 15.5 و 8.7 و 5.5 و 11.2 و 5.6 وحدة/ مل على التوالي بينما بلغت الفعالية الإنزيمية لمعاملة السيطرة 33.4 وحدة/ مل .

أما عن دور العوامل الحيوية فقد أشار (9) أن بعض أجناس البكتريا كالجنس *Pseudomonas* و *Bacillus* تنتج تراكيز عالية من مثبطات البروتيز خصوصاً تلك التي تتألف من الاحماض الامينية السستين والسيرين إذ أنه من الممكن أن تؤثر هذه المثبطات على عملية تصنيع البروتين في الرايبوسوم وكذلك تؤثر على عملية تصنيع إنزيم البروتيز وتقلل من إمراضية هذه المسببات من خلال تقليل فاعلية إنزيم البروتيز كما يمكن أن تعمل هذه المثبطات التي تنتج من البكتريا الموجبة والسالبة

لصبغة كرام عمل المضادات الحيوية .



شكل (3) تأثير المثبطات الكيميائية و الحيوية على الفعالية الانزيمية لإنزيم البروتيز (وحدة/ مل).

المصادر.

1. **الاحبابي، وسام بدر صالح.** 2018. تنقية وتوصيف إنزيم البروتيز المنتج من قبل البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا و تقييم بعض عوامل مقاومة المرض. رسالة ماجستير . جامعة تكريت- كلية الزراعة.

2. **حسن، عبدالله عبدالكريم و وليد خالد احمد**(2015). تقييم كفاءة السماد العضوي المتخمر والعوامل الإحيائية في مقاومة مرض التعفن الفحمي المتسبب عن الفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid على الذرة الصفراء. المجلد (15) العدد (3) 90-77 .

3. **ديوان،** مجيد متعب وعلي حسين البهادلي، وعبدول مصطفى حمه رش 1983.. دراسة المدى العائلي للفطر *Maccropomina phascolina* مجلة وقاية النبات العربية، 1 : 10-2.

4. **مهدي، عمار عادل صالح.** 2019. تنقية وتوصيف إنزيم السليليز من الفطر *Macrophomina Phaseolina* المسبب لمرض تعفن جذور الخيار وتقييم كفاءة بعض مثبطاته في مقاومة المرض .رسالة ماجستير جامعة تكريت-كلية الزراعة .130 صفحة.

5. **وصفي، عماد الدين** .1993. اساسيات امراض النبات والتقنية . المكتبة الاكاديمية . القاهرة. مصر . 521 ص .

6. Agrios, G.N.2005. Plant pathology . 5th Ed . Elsevier Inc . USA. 998PP.

7. AL-Ani, H.Y., M.N.Rashad and A. EL-Behadli .1970. Charcoal rot of sesame in Iraq . Phytopathologia Mediterranea . 9: 50-53 .

8. Al-Rajabi.Ihab.I and Adel. M. Mahasneh.1999. PARTIAL CHARACTERIZATION OF AN ALKALOPHILIC EXTRACELLULAR CRUDE PECTINASES FROM A *BACILLUS POL YMYXA STRAIN.* Qatar Univ. Sci. J. (1999) 18: 67- 80.

9. Claudiu,T.Supuran.,Andrea,Scozzafava., and Brian ,w.Clare. 2002. Bacterial Protease inhibitors.Medicinal Research Reviews.vol 22 .Issue .329-372.p.

10. Cooper, C. 1977. The Tools of Biochemistry. John Wily and Sons Inc. USA.

11. Gupta , C.K., Sharma , S. K., Ramteke, R.2012. Biology epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid with special veference to charcoal rot of soybean (*Glycin Max* L. Merrill) . Journal of phytopathology .160 : 167-180 .

12. Hitha .P .K1, D. Girija .2012. Isolation and Screening of Native Microbial Isolates for Pectinase Activity. ISSN (Online): 2319-7064 .

13. Islam , M . S ., Haque , M . S ., Islam

Biology and pharmaceutical Technology .106: 11 -23.

20. Suchandra, S., S.K., Mishra and K.A.I., Siddiqui . 2000. A virulent mutants of *Macrophomina phaseolina* and *Aspergillus fumigatus* initiate infection in phaseolus mungo in the presence of phaseolinone . leramisole gives protection . Journal of Bioscience . 25: 73-80.

21. Sutton, B.C.1980. The coelomycetes . fungi Imperfect with pycnidia , Acervuli and stromata . Common wealth mycological Institute , Kew , Surrey , England . 696 pp .

22. Tweddell, R.J., Jabaji-Hare, S.H. and Charest, P.M .1994. Production of chitinase and β-1 ,3glucanase by Stachybortys eleyans, amycoparasite of *Rhizoctonia solani* Appl Environ . Microbil. 60: 489-495 .

23. Villeneuve , F ., and Maignien , G ., .2008. Status of soil borne phyto-sanitary problems encountered in melon (Cucumismelo) in the main producing regious of france . Phyto-athology .94 : 1331-1336 .

, M . M ., Emdad , E . M ., Halim , A ., Hossen,Q . M . M ., Hossain , M .Z.,Ahmed,B.,Rahim,S., Rahman , M. S ., Alam , M . M ., Hon , S ., Wan , X ., Saito , J . A ., Alam , M .2012. Tools to kill : Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina* . BMC . Genomics . 19(13) : 493-503 .

14. Khan,S.N . 2007. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. Mycopath. 5: 111-118.

15. Lakshmikanth, M., Manohar, S., Souche, Y. and Lalitha, J. 2006. Extracellular β-agarase LSL-1 producing neoagrobiose from anewly isolated agar-liquefying soil bacterium, Acinetobacter sp. AG LSL-1. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22: 1087-1094.

16. Muthulakshmi, C. D., Gomathi, D. G.,Kumar, G.,Ravikumar, M., Kalaiselvi and C.,Uma. 2011. Production, Purificatioan Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. Jordan Journal of Biological Sciences. 4(3):137-148.

17. Reed, G. (Ed.). 2012. Enzymes in food processing. Academic press ,INC.

18. Sakia,K., T.U chiyama, Y.Matahira, and F. Nango.1991. Immobilization of protase enzmes and contionus production of Nacytylglucos amine with immobili zeenzyme.J.Ferment.Bioengin.72(3):168-172.

19. Sirisha, S., K.S. Gurvinder, and P.P.C.Padmini. 2010. Strain improvement of entomopathogenig fungal species *Beauveria bassiana* and *metarhiziuman isopliae* by protoplast fusion International Journal of Applied