دراسة آلية تضاد الفطر *Trichoderma harzianum* ضد الفطر الممرض *Rhizoctonia solani*

زينة هادي — كلية العلوم– جامعة بابل

جواد كاظم الجنابي — كلية العلوم– جامعة بابل

رباب عمران — كلية العلوم– جامعة بابل

الخلاصة

نفذت سلسلة من التجارب المختبرية لدراسة تأثير بعض العوامل البيئية في آلية تثبيط الفطر الممرض ***Rhizoctonia solani*** بوساطة فطر التضاد ***Trichoderma harzianum*** باستعمال الراشح الخام لإنزيم الكايتنيز. إذ تضمنت الدراسة بيان تأثير المصدر الكاربوني ومدة الحضن والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والتهوية على إنتاج أنزيم الكايتنيز. وقد تبين من النتائج أن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان باستعمال الغزل الفطري الجاف للفطر *R. solani* كمصدر وحيد للكربون وعند درجة حرارة 20م ورقم هيدروجيني 4 بوجود التهوية والمزج بسرعة 150دورة/دقيقة بعد مدة حضن 24 ساعة ، بالمقارنة مع الغزل الفطري الطري والكايتين.

كما أظهرت النتائج أن أعلى فعالية لإنزيم الكايتنيز الخام كانت عند الرقم الهيدروجيني 4 إذ بلغت عنده 0.875 وحدة/مل. وتراوحت أعلى ثباتيةللأنزيم مابين 4 –7 إذ احتفظ الإنزيم بنسبة 90 % من فعاليته. كذلك تناولت الدراسة بيان تأثير الراشح الخام لإنزيم الكايتنيز المنتج من قبل الفطر *T. harzianum* في نمو الفطر *R. solani*وعند الرقمين الهيدروجينيين 4 و7. وقد تبين من النتائج بأن الراشح الإنزيمي الخام المفصول والمركز بالاسيتون المبرد بدرجة –20م عند الرقم الهيدروجيني 4 أظهر أعلى نسبة في تثبيط نمو الفطر الممرض مقارنة ببقية المعاملات إذ بلغت نسبة التثبيط 64 %.

Abstract

Trichoderma harzianum isolate was tested for in vitro antagonism toward the plant-pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Enzymatic mechanisms of *T. harzianum* were investigated by using chitinase the cell wall-degrading enzyme (crude exudates). The trial implicated to explore the effect of environmental parameter e.g. carbon source, incubation period, pH level, temperature rang, agitation and aeration on chitinase. The results demonstrated that the fresh and dried mycelium were production highest level of enzyme when used as a carbon source at pH 4 and 20ºC with agitation and aeration (150 rpm) for 24 h. The optimum pH for activity and stability of crude chitinase was also investigated. The results showed that the highest activity of this enzyme (0.875 unit/ ml) was obtained at pH 4 while highest level of stability (90%) was occurred at pH (4-7). Crude exudates of chitinase enzyme that produced by *T. harzianum* was greatly inhibited the growth of *R. solani* (64%) at pH 4 compared with other treatments.

المقدمة

يعد الفطر *Trichoderma harzianum* من بين أكثر الكائنات الحية المستعملة في السيطرة الحياتية لسهولة عزله وسرعة تكاثره ومحدودية متطلباته الغذائية الخاصة وتأثيره الإيجابي في نمو الكثير من النباتات فضلاً عن تأثيره التثبيطي لنمو العديد من المسببات الممرضة للنبات ومنها على وجه الخصوص الفطر *Rhizoctonia solani* الذي يعد أحد أهم مسببات أمراض الذبول وموت البادرات وعلى مدى واسع من النباتات ذات الأهمية الاقتصادية العالية كنباتات العائلة الباذنجانية والقرعية وغيرها (Agrios، 1997 ; Montealegre وجماعته،2003)

هنالك العديد من الآليات المعروفة بآليات التضاد التي تشمل التطفل Mycoparasitism والتنافس Competition والتضاد الحيوي Antibiosis وأخيراً استحثاث المقاومة الكامنة في النبات Induced Resistance ضد الفطر الممرض (Roco وPerez، 2001 ; حميد، 2002 ; Makherjee وآخرون ،2003 ; Harman وآخرون ،2004). إذ تشير بعض الدراسات إلى أن الفطر *T. harzianum* يفرز في أثناء تطفله على باقي الفطريات العديد من الإنزيمات الخارجية هي الكايتنيز والكلوكانيز والبروتييز التي تعمل

علـى تحطـيم جـدران خلايـا المضـيف تمهيـداً لقتلـه والتغـذي عليـه (Cherif و Benhamou، 1990 ; Schirmbock وآخرون، 1994 ; El-Katatny وآخرون، 2000 ; Zaldivar وآخرون، 2001).

أن إنزيم الكايتيز الذي يفرزه الفطر *Trichoderma* في أثناء تطفله على الفطريات المرضية للنبات هو أحد أهم الإنزيمات الداخلة في السيطرة الحيوية كما إنه عامل محدد لها لوجود مركب الكايتين في جدرانها (Mercedes وآخرون، 2000 ; Kubicek وآخرون، 2001).

ان وجود الكايتين في جدران خلايا أغلب الفطريات والذي يكسبها قوة وصلابة تجاه الكثير من المؤثرات الميكانيكية والكيماوية الخارجية يكون أما على شكل طبقة بدائية من الألياف الدقيقة أو على شكل طبقة داخلية معقـدة تـرتبط بـال glucan والبـروتين بوسـاطة أواصـر ببتيديـة (Elad وآخـرون، 1985 ; Sivan و Chet، 1989_a) يتألف الكايتين من بوليمر متماثل لوحدات N-acetyl-D-glucosamine $[(Gl_cNA_c)_n]$ مرتبطة مع بعضها البعض بوساطة آصرة $\beta(1-4)$ (Goody، 1990).

يعد إنـزيم الكـايتنيز من الإنزيمـات المستحثة إذ يتوقف إنتـاج الإنـزيم أو ينـخفض مستواه عند عدم وجود المصدر الكاربوني المناسب أو عند وجود الكلوكوز أو النواتج النهائية لتحلل الكايتين فضـلاً عن ذلك فأن إنتاج الإنـزيم يتـأثر بالعديـد مـن العوامـل الأخـرى كدرجـة الحـرارة والـرقم الهيـدروجيني ومـدة الحضـن والتهويـة (El-Katatny وآخرون، 2000) كما ان التجويع للمصدر الكربوني والنيتروجيني والتعرض للإجهاد الفسيولوجي لـه تأثير كبير في تحفيز الجينات المسؤولة عن إنتاج إنزيم الكايتنيز (Mercedes وآخرون، 2000).

ونتيجـة لعدم وجود دراسات واضـحة عن آليـة التضـاد بين الفطرين أعـلاه فقد جرى التركيز في هذه الدراسة على إنزيم الكايتينز لأنه يعد المفتاح الرئيس لتطفل الفطر على باقي الفطريات الممرضـة التـي تحوي في جدرانها على الكايتين (Emani وآخرون، 2003) وعلية فقد استهدفت الدراسة الفقرات التالية:

1- تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج أنزيم البكتنيز مثل نوع المصدر الكربوني كالكايتين المستخلص من قشور الروبيان والغزل الفطري الطري والجاف للفطر *R. solani*.

2- دراسة دور أنزيم الكايتنيز الخام في تثبيط نمو الفطر.

المواد وطرائق العمل

أ. الأوساط المستعملة

1. وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة (idg) ويتكون من 4غم/لتر مستخلص البطاطا و20غم/لتر دكستروز و15غم/لتر آكار (Agar No. 1).

2. وسط مستخلص البطاطا والسكروز السائل Potato Sucrose Broth

ويتكـون مـن مسـتخلص البطاطـا (بواقـع 200 غـم بطاطـا/لتر مـاء مقطـر) و20غم/لتـر سـكروز (Koneman وآخرون، 1979).

3. وسط الكايتين الغروي

حضر حسب طريقة (Baath وSoder-Strom ،1980) ويتكون من 500 مل من محلول الأملاح المعدنية التالية:

1. نترات الصوديوم	$NaNO_3$	2	غم
2. كبريتات الامنيوم	$(NH_4)_2SO_4$	1	غم
3. فوسفات البوتاسيوم الثنائية الهيدروجين	KH_2PO_4	1	غم
4. كبريتات المغنيسيوم المائية	$MgSO_4.7H_2O$	0.5	غم
5. كلوريد البوتاسيوم	KCl	0.5	غم
6. كبريتات الحديد المائية	$FeSO_4.7H_2O$	0.01	غم
7. كبريتات النحاس المائية	$CuSO_4.5H_2O$	0.01	غم
8. كبريتات الزنك المائية	$ZnSO_4.7H_2O$	1	ملغم
9. كبريتات المنغنيز المائية	$MnSO_4.2H_2O$	5	ملغم
10. كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2$	0.05	غم

ثم أضيف له 500 مل من المحلول المتكون من

كايتين غروي	4 غم (وزن جاف)
اكار	200 غم
ماء مقطر	500 مل

عقم الوسط ثم صب في أنابيب اختبار معقمة ذات سداد لولبي على ارتفاع (3-4) سم من الأنبوبة.

4. وسط إنتاج إنزيم الكايتنيز Minimal Synthetic Medium (MSM)

حضر الوسط وفق طريقة (El-Katatny وآخرون،2000) ويتكون من 0.2غم/لتر كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ و0.9غم/لتر فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين K_2HPO_4 و0.2غم/لتر كلوريد البوتاسيوم KCl و1غم/لتر نترات الامونيوم NH_4NO_3 و0.002غم/لتر كبريتات الحديد المائية $FeSO_4.7H_2O$ و0.002غم/لتر كبريتات المنغنيز $MnSO_4$ و0.002غم/لتر كبريتات الزنك $ZnSO_4$ وأضيفت كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ كمصدر نتيروجيني وبواقع 0.339نانوغرام/لتر ويجهز الوسط بمصدر كاربوني مناسب وبنسبة 1%.

عقمت جميع الأوساط بدرجة حرارة 121م وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة باستثناء الوسط الذي يحوي على حليب الفرز فقد تم تعقيم محلول الـ Skim milk لمدة 5 دقائق ثم أضيف إلى بقية مكونات الوسط المعقمة في الظروف السابقة نفسها، كما أضيف المضاد الحيوي الـ Chloramphenicol إلى الأوساط بنسبة 0.25غم/لتر لغرض منع نمو البكتريا.

ب. مصدر اللقاح الفطري

الفطر *Rhizoctonia solani*

تم الحصول على عزلة مرضية للفطر *R. solani* من قسم وقاية النبات في كلية الزراعة/جامعة بغداد، وقد عزلت من نباتات قطن مصابة.

الفطر *Trichoderma harzianum*

تـم الحصـول علـى عزلـة الفطـر *Trichoderma harzianum* مـن المبيـد الحيـوي البيوكونـت (Granular)-T-Biocont الأردنـي المنشأ من قسم وقاية النبات في كلية الزراعة/ جامعة بغداد الذي يمتاز بكونه مقاوماً حيوياً فطرياً فعالاً لوقاية وعلاج النباتات من الأمراض الفطرية ومن بينها الأمراض التي يسببها الفطر *R. solani*. المادة الفعالة عبارة عن أبواغ حية للفطر *Trichoderma harzianum* بتركيز أعلى من 19×10^7 بوغ/غرام واستعمل بعد حله بالماء بنسبة تخفيف مماثلة للنسبة المستعملة في البيوت الزجاجية وهي 25 غرام/20 لتر وزرع بطريقة الصب (Pouring) في أطباق بتري حاوية على وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar وحضن بدرجة حرارة 25م لمدة خمسة أيام وبعد ظهور المستعمرات أجريت عملية عزل لمستعمرات الفطر على وسط اكار البطاطا والدكستروز (PDA) للحصول على مستعمرات نقية للفطر.

استخلاص الكايتين

اتبعت طريقة Bemiller وWhistler (1962) مع بعض التحويرات لتصبح كالآتي:

1. نظفت قشور الروبيان بعد غسلها جيداً بالماء الجاري وجففت بوضعها قرب مصدر تيار هواء لنحصل على 20 غم قشور جافة.
2. طحنت القشور بوساطة الطاحونة الكهربائية ونقعت في محلول هيدروكسيد الصوديوم 10% بدرجة حرارة المختبر لمدة ثلاثة أيام (مع مراعاة تجديد المحلول القاعدي كل يوم.
3. غسل الناتج بالماء عدة مرات للتخلص من القاعدة ثم سحن بالمذيبات العضوية التالية: أسيتون مركز 40 مل وايثانول مطلق 100 مل وإيثر 20 مل على التوالي في جفنة خزفية ورشحت بعد كل إضافة باستعمال ورق ترشيح نوع Whatman No. 1.
4. جفف الناتج تحت ضغط مخلخل بوساطة (Vacuum dessicator) ثم نقعت بمحلول 13.7% حامض الهيدروكلوريك بدرجة حرارة 20- م لمدة أربع ساعات.
5. غسل الناتج بـ 250 مل من الماء البارد ثلاث مرات لكي يتم التخلص من الحامض.
6. سحن الناتج مرة ثانية بالايثانول المطلق والايثر وجفف الناتج وأعيدت المعاملة بالحامض أيضاً وغسل بعدها بالماء البارد ثلاث مرات أيضاً.
7. نقع الناتج في محلول هيبوكلورات الصوديوم التجاري بتركيز 6.5% برجه على محرك مغناطيسي لمدة 5-10 دقائق، ثم غسل الناتج الأبيض بـ 250 مل ماء بارد أربع مرات لكي يتم التخلص من القاعدة وترك ليجف.
8. كان الناتج النهائي 4 غم وزن جاف من الكايتين أي بنسبة 20% من الوزن الأولي للقشور الجافة.

تحضير الكايتين الغروي

اتبعت طريقة Inglis وKawchuk (2002) وتتلخص بإذابة 50 غم من الكايتين (Crab shell chitin) في 150 مل من حامض HCl بتركيز 12 مولار. يترسب الكايتين بشكل عالق غروي (Colloidal suspension) عند إضافته ببطء إلى 200 مل من الماء المقطر المبرد إلى 4 مْ، ويعادل الناتج إلى الرقم الهيدروجيني 7 بوساطة إضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 5 مولار، نبذ الناتج مركزياً بسرعة 10000 xg، أضيف للراسب محلول دارئ الفوسفات بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 7، أعيد النبذ المركزي مرة ثانية وبالسرعة نفسها، حفظ الراسب في الثلاجة داخل قنينة معتمة لحين استعماله.

لتحديد محتوى الكايتين من الماء، أخذت عينة من الكايتين الغروي وجففت بدرجة حرارة 70 م ووزنت لمعرفة الفرق في الوزن.

تحضير الغزل الفطري الطري والجاف للفطر الممرض *R. solani*

استعملت الطريقة المتبعة من قبل El-Katatny وآخرون(2000) مع بعض التحويرات وكما يلي:

1. زرع قرص اكار البطاطا الحاوي على مستعمرة الفطر *R. solani* بعمر أربعة أيام في 100 مل من وسط البطاطا السائل Potato sucrose broth الموضوع في دورق مخروطي حجم 500 مل وحضنت بدرجة حرارة 25 م لمدة 14 يوماً.
2. بعد انتهاء مدة الحضن جمع الغزل الفطري بوساطة ترشيحه على أوراق ترشيح نوع Whatman No.1 وغسل بالماء المقطر بعدها خلط مع الماء المقطر في الخلاط.
3. نبذت المكونات مركزياً سرعة 6000 xg لمدة عشر دقائق ثلاث مرات بعد الغسل بالماء المقطر في كل مرة للتخلص من السكريات الذائبة.
4. سحن الراسب مع الأسيتون المبرد بدرجة 20-م في جفنة خزفية وترك ليجف في الثلاجة أو قرب مصدر تيار هواء بارد لنحصل على غزل فطري مجفف بشكل مسحوق دقيق لاستعماله لاحقاً كمصدر كاربوني في وسط إنتاج إنزيم الكايتنيز.

ولتحضير الغزل الفطري الطري نتبع نفس الخطوات السابقة باستثناء الخطوة الرابعة، وتجري عملية تحضير الغزل الفطري الطري تحت ظروف تعقيم إذ يعقم الخلاط بالايثانول المطلق المضاف له المضاد الحيوي Chloramphenicol كما ويعقم الماء المقطر المستعمل في الخلط والغسل.

أضيف الغزل الفطري الطري إلى وسط إنتاج إنزيم الكايتنيز بصورة مباشرة تحت ظروف تعقيم إلا أن الغزل الفطري الجاف عقم مع الوسط بجهاز المؤصدة.

الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لإنزيم الكايتنيز

اتبعت طريقة Baath و Soder-Strom (1980) إذ لقحت أنابيب اكار الكايتين الغروي بقرص قطره 10 ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *T. harzianm* النامي على الوسط الغذائي PDA وبعمر ثلاثة أيام، ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 28 م لمدة 14 يوماً وبواقع ثلاثة مكررات وأجريت معاملة مقارنة وذلك بترك أنبوبة غير مزروعة بمستعمرات الفطر لملاحظة الفرق في منطقة التحلل، يقاس تحلل الكايتين بعمق منطقة الإراقة وتقرأ النتائج تبعاً للجدول التالي:-

جدول (3) يوضح الكشف عن مستوى تحلل الكايتن باستعمال وسط الكايتن الغروي

عمق منطقة التحلل	تصنيف العزلة	الرمز
15< ملم	شديد الفعالية	+++
15-10 ملم	متوسط الفعالية	++
10> ملم	ضعيف الفعالية	+
صفر	غير محلل	–

الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لإنزيم البروتييز

لقح وسط اكار الحليب milk agar بقرص قطره 10 ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *T. harzianm* النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر ثلاثة أيام وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 م وبواقع ثلاثة مكررات، ويتم الكشف عن تحلل البروتين عند ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات (Bilinsk، 1987).

قياس الفعالية الإنزيمية للكايتنيز

يعتمد مبدأ قياس الفعالية الإنزيمية للكايتنيز على مقدار سكر N-acely glucosamine وباقي السكريات المختزلة الناتجة من التحلل الإنزيمي للكايتين وعبر عن الفعالية الإنزيمية للكايتنيز بأنها كمية الإنزيم التي تحرر مايكرومول واحد من السكريات المختزلة بالساعة الواحدة تحت ظروف القياس في 1 مل من الراشح الإنزيمي(Tweddell وآخرون،1994).

ولتحديد الفعالية الإنزيمية للكايتنيز اتبعت الطريقة المعتمدة من Mauch وجماعته (1988) وتتلخص بإضافة 1 مل من الراشح الإنزيمي الخام إلى 1 مل من محلول الكايتين الغروي 0.75% في أنبوبة اختبار، حضن المزيج بدرجة حرارة 37 م في حمام مائي هزاز لمدة ساعتين وفصل محلول المادة الأساس–الإنزيم بالنبذ المركزي بسرعة 1000xg لمدة ثلاث دقائق لإيقاف التفاعل وأخذ الراشح لغرض قياس السكريات المختزلة حسب طريقة Somogyi (1952) الموضحة سابقاً ولتصفير الجهاز استعمل الإنزيم المقتول حرارياً والذي أجريت عليه المعاملات السابقة.

تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز

تم دراسة تأثير بعض العوامل على إنتاج إنزيم الكايتنيز وهي مدة الحضن والمصدر الكربوني والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والتهوية إذ نمى الفطر على وسط Minimal synthetic medium وذلك بواقع ثلاثة أقراص من الفطر *T. harzianum* النامي على الوسط PDA لكل 100 مل من وسط إنتاج الإنزيم (MSM) وقد تم ثبتت بقية العوامل باستثناء العامل المدروس، فبالنسبة لتأثير نوع المصدر الكاربوني على مستوى إنتاج الإنزيم استعملت ثلاثة مصادر كربونية هي الكايتين المستخلص من قشور الروبيان والغزل الفطري الطري والجاف للفطر *R. solani*، ولأجل معرفة تأثير الرقم الهيدروجيني على مستوى إنتاج الإنزيم تم استعمال خمسة أرقام هيدروجينية هي 4 و5 و6 و7 و8 وذلك بتعديل قيمة الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج إلى 4 و5 باستعمال محلول دارئ الخلات (0.2 M) وإلى الأرقام الهيدروجينية 6 و7 و8 باستعمال محلول دارئ الفوسفات (0.2 M)، كما قيس مستوى إنتاج الإنزيم في درجات حرارية مختلفة هي 15 و20 و25 و30 و35 و40 م واختبرت الإنتاجية أيضاً عند ظرفين مختلفين هما وسط ساكن بدون تحريك والآخر متحرك بسرعة 150 دورة/دقيقة باستعمال الحاضنة الهزازو وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة. فصل الغزل الفطري وبقايا المصادر

الكربونية غير المتحللة عن الراشح الإنزيمي الخام باستعمال النبذ المركزي بدرجة حرارة 4 م وبسرعة 5000xg ولمدة عشر دقائق ومرر الراشح خلال دورق ترشيح نوع 0.45 Milipore filter واستعمل الرائق مستخلصاً خاماً وقدرت الفعالية الإنزيمية كل 24 ساعة ضمن نهاية مدة الحضن.

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم الخام

قدرت فعالية الراشح الإنزيمي الخام في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني لركيزة الكايتين الغروي وذلك لمعرفة الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الراشح الإنزيمي الخام إذ أضيف 1 مل من محلول الكايتين الغروي المعلق بمحاليل الدوارئ التي تراوحت أرقامها الهيدروجينية ما بين 4-8 إلى 1 مل من الراشح الإنزيمي الخام المأخوذ من مزرعة فطرية لإنتاج إنزيم الكايتنيز برقم هيدروجيني 4 ودرجة حرارة 20 م، وضعت الأنابيب في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة 37 م لمدة ساعتين بعدها تم إيقاف التفاعل وقدرت الفعالية الإنزيمية حسب طريقة Somogyi (1952).

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم الخام

تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في ثباتية الإنزيم الخام عند الأرقام الهيدروجينية (4 و6 و7) لركيزة الكايتين الغروي وذلك بأخذ 0.2 مل من الراشح الإنزيمي الخام وإضافته إلى 0.8 مل من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني معين حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 35 م مدة نصف ساعة، بعدها وضعت في حمام ثلجي، وأضيف إلى كل 1 مل من محلول الإنزيم الخام 1 مل من محلول الكايتين الغروي بأرقام هيدروجينية 4 و 5 و6 و7 و8 بعدها وضعت الأنابيب في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة 37 م لمدة ساعتين وقدرت الفعالية حسب طريقة Somgyi (1952).

تأثير الراشح الإنزيمي الخام للفطر *T. harzianum* في نمو الفطر الممرض *R. solani*

لغرض بيان تأثير إنزيمات الفطر *Trichoderma harzianum* في نمو الفطر الممرض *R. solani* بمعزل عن تأثير الغزل الفطري والأبواغ والمضادات الحياتية والمركبات الأيضية الأخرى الموجودة في الراشح الإنزيمي الخام تم إجراء بعض المعاملات، على الراشح الخام لإنزيم الكايتنيز

المعاملة الأولى: فصل الإنزيم عن المضاد الحياتي وذلك عن طريق ترسيب بروتين الإنزيم بإضافة الأسيتون المبرد إلى 20- م إلى الراشح الخام للإنزيم بنسبة حجم واحد من الراشح إلى حجمين من الأسيتون بصورة تدريجية، نبذ المحلول بسرعة 10000xg لمدة نصف ساعة، وأذيب الراسب في حجم معين من المحلول الدارئ يعادل نصف حجم الراشح وبرقم هيدروجيني 4 و7 بعدها مرر الإنزيم خلال أوراق ترشيح نوع 0.22 Milipore filter لغرض التعقيم وللتخلص من الغزل الفطري والأبواغ (Pohl، 1990).

المعاملة الثانية: قتل الإنزيم وذلك بغليه بدرجة حرارة 100 م لمدة عشر دقائق، بعدها مرر الإنزيم خلال أوراق ترشيح نوع 0.22 Milipore filter للتخلص من الغزل الفطري والأبواغ.

المعاملة الثالثة: تم إمرار الراشح الخام للإنزيم خلال المرشح 0.22 Milipore filter لغرض التخلص من الغزل الفطري والأبواغ.

أضيفت المعاملات السابقة للراشح الخام للإنزيم إلى الوسط PDA قبل تصلبه بأرقام هيدروجينية 4 و7 للوسط وبنسبة 10%، بعدها لقحت الأوساط بقرص الفطر *R. solani* وسجل معدل نمو الفطر بعد كل 24 ساعة.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الكشف عن إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* ظهور منطقة إراقة (تحلل) أسفل قرص الفطر *T. harzianum* عمقها 10 ملم بعد مرور 14 يوماً من الحضن بدرجة حرارة 28 م في وسط الكايتين الغروي (صورة 1) وعلى هذا الأساس تم تصنيف العزلة على أنها متوسطة الفعالية. فيما أظهرت نتيجة الكشف عن إنتاج إنزيم البروتييز من قبل الفطر نفسه هالة شفافة تماماً قطرها 8 ملم حول مستعمرة الفطر *T. harzianum* النامية في وسط أكار الحليب Milk agar بعد مرور ثلاثة أيام من الحضن بدرجة حرارة 25 م (صورة 2) دلالة على تحلل الكازائين نتيجة لإفراز الفطر لإنزيم البروتييز هذا ومن مجموع 20غم من قشور الروبيان الجافة *Metapenaeus affinis* تم استخلاص 4غم من الكايتين أي أن نسبة الكايتين في القشور الجافة كانت تساوي 20% وهي ومطابقة لما حصل عليه Bemiller وWhistler (1962) و Gange (1993) و الجراخ (1996) ومقاربة لما ذكره Ashford وجماعته (1977) (14% – 27%) و Naczk وShahidi (1990) (17%) وقد استعمل الكايتين المستخلص من قشور الروبيان كمادة أساس لعمل إنزيم الكايتنيز في وسط إنتاج الإنزيم وكذلك استعمل بعد تحويله إلى كايتين غروي في وسط الكشف عن إنتاج الإنزيم وكركيزة لعمل الإنزيم في وسط التفاعل.

أظهرت النتائج بأن أعلى فعالية لانزيم الكايتنيز كانت باستعمال الغزل الفطري الجاف كمصدر وحيد للكربون يليه الغزل الفطري الطري إذ بلغت الفعالية الإنزيمية لهما 0.2187 و0.1288 وحدة/مل على التوالي فيما انخفضت الفعالية الإنزيمية للكايتنيز إلى 0.003687 باستعمال الكايتين المستخلص من قشور الروبيان (شكل 1)، إن هذه النتائج تعكس تواجد الكايتين في جدار الفطر *R. solani* كما تعكس دور إنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر *T. harzianum* في تحطيم جدار الفطر *R. solani*. إن الزيادة في مستوى إنتاج إنزيم الكايتنيز باستعمال الغزل الفطري الجاف كمصدر وحيد للكربون مقارنة بالغزل الفطري الطري ربما يعود إلى تأثير عملية التجفيف بالاسيتون في تركيز نسبة الكايتين الموجود في جدار الفطر مقارنة بالغزل الفطري الطري ومن ثم زيادة نسبة إنتاج الإنزيم أو قد يعود السبب في ذلك إلى إفراز الغزل الفطري الطري للفطر مركبات أيضية ضد الفطر *T. harzianum* تسببت في انخفاض مستوى إنتاج الإنزيم مقارنة بالغزل الفطري الجاف (El-Katatny وجماعته; 2000). إن انخفاض الفعالية الإنزيمية للكايتنيز باستعمال الكايتين المستخلص من قشور الروبيان ربما يعود إلى أن درجة نقاوة الكايتين المستخلص غير عالية وهذا يؤثر في ألفة الإنزيم تجاه المادة الأساس فقد أشار Kubicek وجماعته (2001) إلى إن إنتاج إنزيم الكايتنيز ينخفض أو يتثبط في حالة استعمال الكايتين غير النقي كمصدر وحيد للكربون.

تباينت مدة الحضن المثلى لإنتاج إنزيم الكايتنيز باختلاف نوع المصدر الكربوني المستعمل فقد ظهر بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان بعد مرور 24 ساعة من الحضن في وسط MSM برقم هيدروجيني 6 وفي درجة حرارة 30م باستعمال الغزل الفطري الطري والجاف إذ بلغت الفعالية الإنزيمية لهما 0.1288 و0.2187 على التوالي. ثم أخذ مستواه بالانخفاض بعد مرور 48 ساعة من الحضن (شكل 1). إن هذا الانخفاض قد يعود إلى سببين مهمين احدهما هو أن إنزيم الكايتنيز يعد من الإنزيمات التي تنتج بصورة مبكرة إذ يتم إفرازه في المراحل الأولى من التطفل (Donzelli وHarman، 2001 ; Kubicek وجماعته، 2001) أما السبب الآخر فيعود إلى أن مستوى إنتاج الإنزيم يقل بزيادة مدة الحضن نتيجة لعدة عوامل منها حصول تغيرات بيئية غير مرغوبة في وسط الإنتاج تؤثر في مستوى إنتاج الإنزيم وفعاليته ومنها أن إنزيم الكايتنيز يعد من الإنزيمات

المستحثة لذا فإن معدل إنتاجه يقل أو يتوقف عند تجمع النواتج النهائية لعمل الإنزيم (Mach وجماعته ،1999). فضلاً عن ذلك فإن مستوى إنتاج الإنزيم قد يقل نتيجة للتحلل الذي يحدث للإنزيم بفعل إنزيمات البروتييز التي تنتج مع باقي الإنزيمات المسؤولة عن التضاد (Markovich و Knonova ،2003) وقد لوحظ ذلك لدى إجرائنا لتجربة ثانوية للكشف عن مستوى إنتاج إنزيم البروتييز في وسط Richards modified medium برقم هيدروجيني 6 وفي درجة حرارة 25 م باستعمال الغزل الفطري الطري والجاف لفطر الـ *R. solani* كمصدر وحيد للكربون إذ ظهر بأن أعلى مستوى لإنتاج إنزيم البروتييز كان بعد مرور 24 ساعة من الحضن وانخفض مستواه بعد مرور 48 ساعة. إن هذه النتائج تتفق مع ما ذكره Schirmbock وجماعته (1994) بأن مستوى إنتاج إنزيم الكايتنيز والكلوكانيز والبروتييز يزداد في الفترة الزمنية ما بين 36-30 ساعة من الحضن في وسط حاوٍ على جدار خلية الفطر Botryis cinerea كمصدر وحيد للكربون.

ومن العوامل الأخرى التي جرى دراسة تأثيرها في إنتاج إنزيم الكايتنيز هو الرقم الهيدروجيني للوسط لتأثيره الكبير في صفات الوسط كتأين المواد الغذائية فيه ودرجة ذوبانها ومن ثم تأثيرها في السعة الدارئة للوسط الذي ينعكس على مستوى نمو الفطر ونشاطه وقدرته على إنتاج العديد من الإنزيمات التي من بينها إنزيم الكايتنيز (Kredics وجماعته ،2003) فقد تؤثر حموضة الوسط في عمل الجينات المسؤولة عن تخليق الإنزيم وذلك لكونه من الإنزيمات المستحثة التي يتأثر تخليقها بالإجهاد الفسيولوجي للوسط ودرجة تأين المواد الغذائية فيه (Mach وجماعته،1999 ; Kubicek وجماعته ،2001). أشار Elad وجماعته (1982) إلى أن تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* كان مماثلاً لتأثيره في نمو الفطر إذ أن أعلى مستوى للنمو ولإنتاج الإنزيم كان عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية وهي نتيجة متوافقة مع ما حصلنا عليه فقد ظهر بأن أعلى مستوى لنمو الفطر وإنتاجيه لإنزيم الكايتنيز كان عند الرقم الهيدروجيني 4 إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 0.6155 وحدة/مل والذي أعطى في الوقت نفسه درجة تضادية عالية للفطر المسيطر ضد الفطر *R. solani* . فيما انخفض مستوى إنتاج الإنزيم بزيادة الرقم الهيدروجيني وصولاً إلى الرقم الهيدروجيني 8 إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 0.1853 وحدة/مل (شكل 2).

أما بالنسبة لتأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الكايتنيز فقد تبين من النتائج أن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان عند درجة حرارة 20 م إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 0.90395 وحدة/مل وانخفض مستوى الإنتاج بصورة تدريجية بزيادة درجة الحرارة حتى وصل إلى أدنى مستوى له عند درجة حرارة 40 م إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 0.4995 (شكل 3). إن هذه النتائج كانت مقاربة لما ذكره El-Katatny وجماعته (2001) بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان عند درجتي الحرارة 25 و30 م وانخفضت الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكايتنيز بصورة كبيرة بزيادة درجة الحرارة وصولاً إلى درجة حرارة 40م واستعمل Schirmbock وجماعته(1994) درجة الحرارة 28 م في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* في أثناء تنميته في وسط حاوٍ على جدار خلية الفطر *Botrytis cinerea* كمصدر وحيد للكربون.

تؤثر درجة الحرارة بصورة كبيرة في إنتاج الإنزيمات وقد يحدث تشابه بين درجات الحرارة المثلى للنمو ودرجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم كما أن الحد الحراري الأقصى للنمو يعتمد ويتحدد بنوع الإنزيمات أو مدى تأثير البروتينات داخل الخلية بالحرارة إذ أن الانخفاض السريع في معدل سرعة النمو عند رفع درجة الحرارة أكثر من المثلى يأتي نتيجة لفقدان الإنزيم المسيطر على سرعة النمو لطبيعته بفعل الدنتره (Denaturation) وربما إنزيمات أخرى (المظفر،1983 ; Janson و Ryden ،1998) ولقد وجد بأن الأحياء المحبة لدرجات الحرارة العالية تمتلك إنزيمات أكثر استقراراً لهذه الدرجات ولا تفقد طبيعتها بسهولة، ويؤثر ارتفاع وانخفاض درجة الحرارة

في أكثر من عامل له علاقة بالنمو ونشاط الكائن الحي كرطوبة الوسط وكمية الأوكسجين الذائبة فيه والطاقة الحركية للجزيئات هذا فضلاً عن حموضة الوسط التي تنعكس على سرعة التفاعلات داخل الخلية وإنتاجها للمركبات الأيضية الأولية التي من أبرزها الإنزيمات (السعد، 1990; Chaplin وBucke ،1990).

يؤدي عامل التهوية دوراً مهماً كغيره من العوامل في التأثير على مستوى إنتاج الإنزيم فقد أظهرت النتائج بأن التهوية والمزج بسرعة 150 دورة/دقيقة قد زادت من نسبة إنتاج إنزيم الكايتنيز مقارنة بعدم التهوية (شكل 4) باستعمال الوسط نفسه وفي درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ذاتهما وتقع أهمية التهوية والمزج إلى الحاجة للأوكسجين الذائب وتوزيع المادة الركيزة في وسط التنمية (السعد، 1990؛ الدليمي، 2002).

إن النتائج التي حصلنا عليها جاءت متفقة مع بعض الدراسات التي استعملت عمليتي التهوية والمزج بسرعة 150 دورة/دقيقة في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* (El-Katatny وجماعته ،2000 ; Donzelli وHarman ،2001 ; Limon وجماهته ،2004 ; De Marco وجماعته،2004) ولإنتاج الإنزيم نفسه من الفطر *Stachybotrys elegans* استعمل Tweddell وجماعته (1994) التهوية والمزج بسرعة 110 دورة/دقيقة.

فضلاً عن دراسة الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم كانت هنالك أيضاً دراسة لمعرفة تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم الكايتنيز الخام ليتسنى لنا اختيار الرقم الهيدروجيني الأمثل لوسط الـ PDA لعمل إنزيم الكايتنيز الخام عند وضعه في حفر أو خلطة مع الوسط لبيان تأثيره في نمو الفطر *R. solani*. وقد بينت النتائج بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم الخام تجاه ركيزة الكايتين الغروي يقع ضمن الحدود الحامضة والمتعادلة وسجلت أعلى فعالية إنزيمية عند الرقم الهيدروجيني 4 إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 0.875 بينما انخفضت الفعالية الإنزيمية عند الرقم الهيدروجيني 8 (شكل 5) وهذا ما وجد أيضاً في دراسات أخرى تناولت دراسة صفات إنزيم الكايتنيز المنتج من سلالات أو عزلات أخرى للفطر *T. harzianum* فقد ظهر بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل للسلالة T_{24} هو 4.5 (El-Katatny وجماعته ،2001) وللعزلة 1051 والسلالة 39.1 (4) (Ulhoa وPeberdy ،1992 ; Harman وجماعته،1993).

يعزى سبب تباين فعالية الإنزيم تحت أرقام هيدروجينية مختلفة إلى تأثيره في مجاميع قابلة للتأين Prototropic groups توجد في الإنزيم وفي المادة الركيزة وفي معقد الإنزيم–المادة الركيزة ومعقد الإنزيم–الناتج. كما أن من خصائص الإنزيمات هو أن لكل إنزيم رقماً هيدروجينياً مثالياً تكون عنده سرعة التفاعلات الإنزيمية على أقصاها وعند انحراف قيمة الرقم الهيدروجيني عن القيمة المثالية تقل الفعالية الإنزيمية بوضوح وباستمرار انحراف الرقم الهيدروجيني عن القيمة المثالية قد يتحطم الإنزيم (Denaturation) مما يؤثر على الفعالية الإنزيمية (Chaplin وBucke ،1990 ; الدليمي، 2002).

عند دراسة ثباتية إنزيم الكايتنيز الخام بأرقام هيدروجينية مختلفة تبين بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم الخام تراوح ما بين 7-4 والذي يقع ضمن المدى الذي أشارت إليه العديد من الدراسات التي تناولت دراسة ثباتية إنزيم الكايتنيز المنتج من سلالات أخرى للفطر *T. harzianum* فقد ذكر(El-Katatny وجماعته ،2001) بأن أعلى ثباتية لإنزيم الكايتنيز المنتج من السلالة T_{24} تراوح ما بين الرقمين الهيدروجينيين 7-4.5 كما توافقت مع دراسة أخرى ذكرت بأن ثباتية إنزيم الكايتنيز المنتج من إحدى سلالات الفطر *T. harzianum* تراوحت مابين 8-4 .

أن الانخفاض في الفعالية الإنزيمية قد يعود إلى تأثير الأرقام الهيدروجينية العالية في تركيب جزيئة الإنزيم إذ قد يحدث مسخ (denaturation) لجزيئة الإنزيم في المحاليل القاعدية. وقد يعود الانخفاض في

فعالية إنزيم الكايتنيز باتجاه القيم القاعدية إلى التحلل الذي يحدث لجزيئة الإنزيم بفعل إنزيم البروتييز القاعدي الذي يفرزه الفطر فقد أشار(De Macro وFelix ،2002) إلى أن أعلى فعالية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *T. harzianum* كانت في الأرقام الهيدروجينية 7 و8 .

برز دور الآلية الإنزيمية للفطر *T. harzianum* في تثبيط نمو الفطر *R. solani* لدى استعمالنا للراشح الإنزيمي الخام المفصول والمركز بالاسيتون المبرد إلى 20 . مْ في وسط PDA برقم هيدروجيني 4 إذ بلغت نسبة التثبيط 64 % (صورة 3) وهي نسبة مقاربة لما حصل عليه EL-Katatny وجماعته (2000) باستعمال الراشح الإنزيمي المركز بكبريتات الامونيوم 80 %) في تثبيط نمو الفطر *Sclerotium rolfsii* والتي بلغت 61% وكما أشير سابقاً فإن استعمال الاسيتون المبرد إلى 20 . مْ هو لأجل فصل الإنزيمات الموجودة في الراشح الإنزيمي الخام عن بقية المركبات الأيضية الأخرى والتي من أبرزها المضادات الحياتية الموجودة في الراشح الخام، فقد أشار Phol (1990) إلى أنه يمكن التخلص من الكثير من المركبات الموجودة مع الإنزيمات في الراشح الإنزيمي بوساطة فصلها بالاسيتون الذي استعمل أيضاً في تركيز الإنزيم وذلك بترسيب البروتينات (الإنزيمات) بالمذيبات العضوية التي من ضمنها الاسيتون.

وبالرجوع إلى النتائج نلاحظ بأن نسبة التثبيط قد انخفضت إلى 13% باستعمال الراشح الإنزيمي الخام والسبب في ذلك قد يعود إلى ما ذكره Schirmbock وجماعته (1994) بأنه على الرغم من التآزر الحاصل بين الإنزيمات والمركبات الأيضية الأخرى التي من ضمنها المضادات الحياتية الموجودة في الراشح الإنزيمي للفطر *T. harzianum* إلا أن الإنزيم يفقد 50% من فعاليته عند إضافته مع هذه المركبات كما أشار إلى أن الإنزيم أو المضاد الحيوي يجب أن يضاف بتراكيز أعلى مما هو عليه في الراشح الإنزيمي لكي نحصل على نسبة تثبيط عالية لنمو الفطر أو إنبات أبواغه.

ذكر El-Katatny وجماعته (2000) أن نسبة التثبيط للفطر *Sclerotium rolfsii* قد انخفضت إلى 33.7% باستعمال الراشح الإنزيمي الخام للفطر ووصلت إلى 27.5 % عند استعمال الراشح الإنزيمي الخام المعامل حرارياً وهي نسبة مشابهة من حيث المبدأ لما حصلنا عليه على الرغم من عدم تماثل قيم نسب التثبيط والذي قد يعود للاختلاف مابين السلالات المستعملة وظروف الحضن فقد انخفضت نسبة التثبيط باستعمال الراشح الإنزيمي المقتول حرارياً إلى 5% وهذا يعطي إشارة إلى وجود مركبات أيضية أخرى في الراشح الإنزيمي تعمل بصورة متآزرة مع الإنزيمات التي من الممكن أن تعطي نسبة تثبيط أعلى في حالة تنقيتها وتركيزها وإضافتها إلى الوسط الناميه عليه مستعمرات الفطر المضاد (El-Katatny وجماعته،2000).

أما بالنسبة للرقم الهيدروجيني 7 فنلاحظ من النتائج بأن دور الفعالية الإنزيمية فيه لم يكن واضحاً بصورة ملموسة إذ لم تتجاوز نسبة التثبيط سوى 13% باستعمال كل من الراشح الإنزيمي الخام والراشح الإنزيمي المفصول والمركز بالاسيتون والسبب في ذلك قد يعود إلى تأثير إنزيمات البروتييز القاعدية والتي ترتفع فعاليتها بزيادة الرقم الهيدروجيني باتجاه القيم القاعدية فقد أشار De Marco وFelix (2002) بأن أعلى فعالية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *T. harzianum* كانت عند الرقمين الهيدروجينيين 7 و 8، وينتج الفطر إنزيم البروتييز مع باقي الإنزيمات المسؤولة عن التضاد في أثناء تطفله على باقي الفطريات أو تنميته في وسط حاوٍ على غزل فطري طري أو جاف أو جدار خلية فطرية (Schirmbock وجماعته،1994 ; De Marco وجماعته،2004) وقد تم الكشف مسبقاً عن وجود إنزيم البروتييز في الراشح الإنزيمي الخام. ويعمل إنزيم البروتييز على هضم وتحليل باقي الإنزيمات الموجودة في الراشح الإنزيمي (Markovich وKononova

، 2003) المضاف للوسط PDA والذي من الممكن أن يكون تأثيره بقي ثابتاً عند فصل وتركيز الراشح الإنزيمي إذ جرى فصله وتركيزه مع باقي الإنزيمات الموجودة في الراشح ومما يعزز ذلك هو تدني دور بقية المركبات الأيضية الموجودة في الراشح الإنزيمي الخام المعامل حرارياً إذ لم يلاحظ لها تأثير يستحق الذكر.

إضافة إلى كل ما سبق نلاحظ بأن الرقم الهيدروجيني للوسط كان له أيضاً تأثير في نمو الفطر *R. solani* إذ ظهر أن نمو الفطر في وسط الـ PDA برقم هيدروجيني 4 لم يكن جيداً مقارنة بالرقم الهيدروجيني 7.

References

Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. 4th ed. Academic Press. London. pp: 150-203.

Ashford, N.A.; Hattis, D. and Murray, A.E. (1977). Industrial prospects for chitin and protein from shellfish wastes. MTI sea Grant report, MITSG 77-3, MIT, Cambridge, Mass.

Baath, E. and Soder-Strom, B. (1980). Degradation of macromoles by microfung; isolated from different podzoic soil htorizons. Can. J. Bot., 58: 422-425.

Bemiller, J.N. and Whistler, R.L. (1962). Alkaline degradation of amino sugars. J. Org. Chem., 27: 1161-1164.

Bilinsk, E.A. (1987). Proteinases and beer production. Appl. Environ. Microbiol., 53: 495-499.

Chaplin, M. and Bucke, C. (1990). Enzyme Technology. Cambridge University Press. pp: 12-21.

Cherif, M. and Benhamou, N. (1990). Cytochemical spects of chitin break down during the parasitic action of *Trichoderma sp.* on *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis lycopersici*. Phytopathol., 80: 1406-1414.

De Marco, J.L. and Felix, C.R. (2002). Characterization of protease produced by *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches broom disease, BMC Biochemistry; 3: 3-10.

De Marco, J.L.; Valadares-Inglis, M.C. and Felix, C.R. (2004). Purification and characterization of an N-ocetylglacosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which control *Crinipellis perniciosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 70-75.

Donzelli, B.G.G. and Harman, G.E. (2001). Introduction of ammonium, glucose and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma aurovoride* strain p1. Applied and Environ. Microbiol., 67: 5643-5647.

Elad, Y.; Chet, I. and Henis, Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol., 28: 719-725.

Elad, Y.; Lifshitz, R. and Baker, R. (1985). Enzymatic activity of the mycoparasite *pythium nunn* during interaction with host and non host fungi. Physiol. Plant pathol., 27: 131-148.

El-Katatny, M.H.; Gudelj, M.; Robra, K.H.; Elnaghy, M.A. and Gubitz, G.M. (2001). Characterization of chitinase and endo-*B*-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T_{24} involved in control of phytopathogenic *Sclerotium rolfsii*. Applied Microbiol. and Biotechnol., 56: 137-143.

El-Katatny, M.H.; Somitsch, W; Robra, K.H.; El-Katatny, M.S. and Gubitz, G.M. (2000). Production of chitinase and *B*-1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phyto pathodenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technol. Biotechnol., 38: 173-180.

Emani, C.; Carcia, J.M.; Lopata-Finch, E. Pozo, M.J.; Urides, P.; Kim, D.; Sunilkumar, G.; Cook, D.R.; Kenerley, C.M. and Rathore, K.S. (2003). Enhanced fungal resistance intransgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. Plant Biotechnol. J., 1: 321-336.

Gagne, N. (1993). Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as food processing aid. MSc. Thesis, Department of food science and Agricultural chemistry, McGill University, Montreial.

Gooday, G. (1990). The ecology of chitin degradation. Microb. Ecol., 10: 387-431.

Harman, G.E.; Hayes, C.K.; Lorito, M.; Broadway, R.M.; Dipietro, A. and Tronsmo, A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathol., 83: 313-318.

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

Howard, M.B.; Ekbory, N.A.; Weiner, R.M. and Hutcheson, S.W. (2003). Detection and characterization of chitinase and other chitin-modifying enzymes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 627-635.

Inglis, G.D. and Kawchuk, L.M. (2002). Comparative degradation of Oomycete, ascomycete and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. Can. J. Microbil., 48: 60-70.

Janson, J.C. and Ryden, L. (1998). Protein purification-principles, High-resolution methods, and application. 2nd ed. A John Wiley and Sons, Inc. publication. New York.

Koneman, E.W.; Roberts, G.D. and Wright, S.E. (1979). Practical laboratory mycology. 2nd ed. The Williams and Wilkins Co., USA, pp: 165-167.

Kredics, L.; Antal, Z.; Manczinger, L.; Szekeres, A.; Kevei, F. and Nagy, E. (2003). Influence environmental parameters on *Trichoderma strains* with biocontrol potential. Food Technol. Biotechnol., 41: 37-42.

Kubicek, C.P.; Mach, R.L.; Peter baner, C.K. and Lorito, M. (2001) *Trichoderma* from genes to biocontrol. J. of Plant Pathol., 83: 11-23.

Limon, M.C.; Chacon, M.R.; Mejias, R.; Delgado-Jarana, J.; Rincon, A.M.; Codon, A.C. and Bentiz, T. (2004). Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of cellulose binding domain. Appl. Microbiol. Biotechnol., 64: 675-685.

Mach, R.L.; Perter bauer, C.K.; Payer, K.; Jaksits, S.; Woo, S.L.; Zeilinger, S.; Kullnig, L.M.; Lorito, M. and Kubicek, C.P. (1999). Expression of two Major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzixnum* p1) is triggered by different regulatory signals. Appl. and Environ. Microbiol., 65: 1858-1863.

Markovich, N.A. and Kononova, G.L. (2003). Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense. Appl. Biochem. and Microbial., 39: 341-351.

Mauch, F.; Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988). Antifungal hydrolyases in pea tissue. II Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and *B*-1,3-glucanase. Plant Physiol., 88: 936-942.

Makherjee, P.K.; Latha, J.; Hadar, R. and Horwitz, B.A. (2003). TMKA, amitogen-actirated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark,. J. Bactriol. Eucaryotic Cell, 2: 446-455.

Mercedes dela, M.; Limon, C.M.; Meijas, R.; Mach, R.L.; Pintor-Toro, J.A. and Kubicek, C.P. (2000), Regulation of chitinase 33 (chit 33) gene expression in *Trichodernum harzianum*. Curr. Gen. 30: 126-130.

Montealegre, J.R.; Reyes, R.; Perez, L.M.; Herrera, R.; Silva, P. and Besoain, X. (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Environ. Biotchnol., 6: 1-8.

Naczk, M. and Shahidi, F. (1990). Chemical composition and chitin content of crustacean offal. In: Advance in Fisheries technology and biotechnology for increased profitability, (ed. Voigt, M.N. and Botta, J.R.). Atlantic Fisheries Technological conference and seafood Biotechnology Workshop Technomic publishing Company, USA, pp: 299-304.

Pohl, T. (1990). Concentration of proteins and removal of solutes, Method in Enzymology. Academic press, 182: 78.

Roco, A. and Perez, L.M. (2001). Invitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Altranaria alternata* in the presence of growth regulators. Electronic J. of Biotechnol., 4: 68-73.

Schirmbock, M.; Lorito, M.; Wang, Y.L.; Hayes, C.K.; Arisan-Atac, I. Scala, F.; Harman, G.E. and Kubicek, C.P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotic: Molecular Mechanisms involved in the antagonists action of

Trichoderma harzianum against phytopathogenic of fungi Appl. and Environ. Microbiol., 60: 4364-4370.

Somogyi, M. (1952). Notes on sugars determination. J. Biol. Chem. 1952: 19-23.

Sivan, A. and Chet, I. (1989_a). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes from *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol., 135: 675-682.

Tweddell, R.J.; Jabaji-Hare, S.H. and Charest, P.M. (1994). Production of chitinase and *B*-1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Appl. and Environ. Microbiol., 60: 489-495.

Ulhoa, C.J. and Peberdy, J.F. (1992). Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. Enzyme and Microb Technol., 14: 236-240.

Zaldivar, M.; Velasquez, J.C.; Contreas, I. and Perez, L.M. (2001). *Trichoderma auroviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential used in waste cellulose degradlation and/or biocontrol. Electronic J. of Biotechnol. Environ. Biotchnol, 4: 1-12.

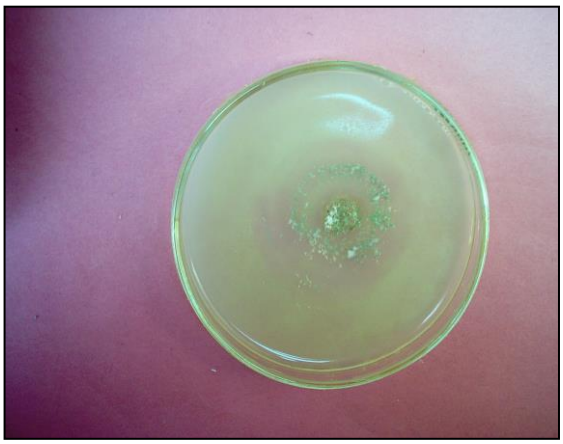
الجراخ، علاء، سعد تاج الدين وعبد الله كاظم هندي. 1996. النشاط الكايتيني لبعض السلالات البكتيرية المعزولة من التربة العراقية. مجلة جامعة بابل، مجلد 1، عدد 3، ص: 213-224.

الدليمي، خلف صوفي داوود 2002 الإنزيمات المايكروبية والتقانات الحيوية. جامعة فيلادلفيا– الأردن.

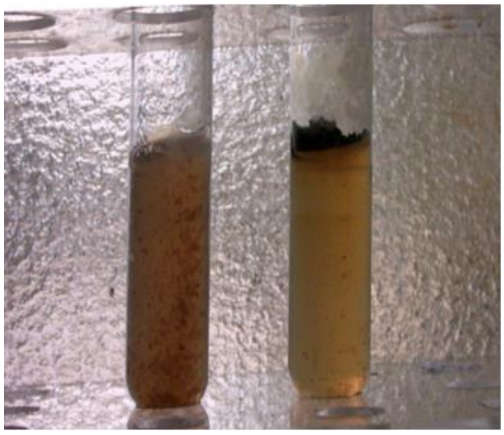
السعد، مها رؤوف 1990. مبادئ فسلجة الأحياء المجهرية. مطابع التعليم العالي في الموصل. جامعة بغداد. 400 صفحة.

المظفر، سامي عبد الهادي. 1983. حركيات الإنزيمات الجزء الثاني. مطبعة الخلود – بغداد.

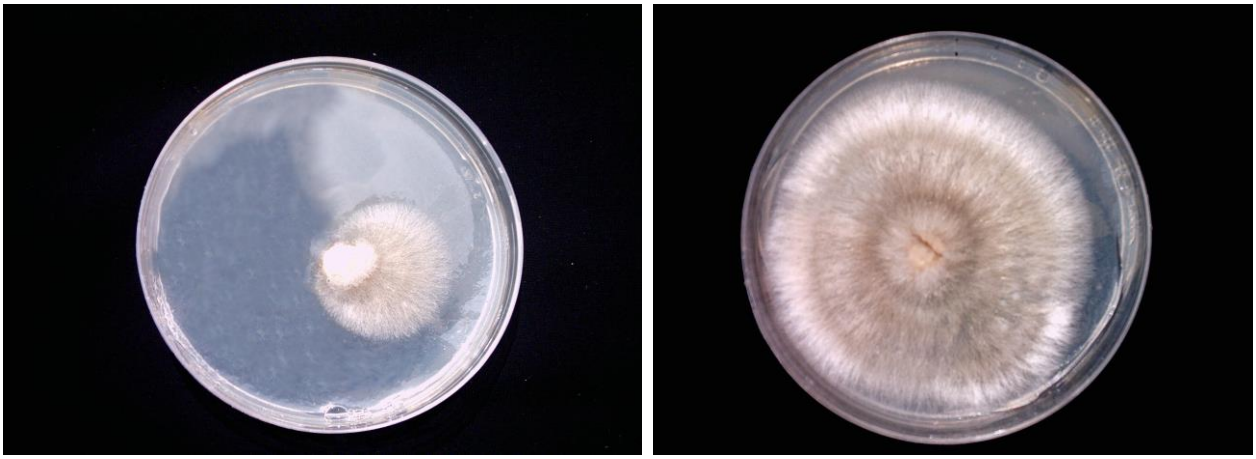
حميد، فاخر رحيم. 2002. دراسة كفاءة عزلات الفطر spp *Trichoderma* في استحثاث المقاومة ضد الفطر *Rhizoctonia solani* وتحفيز النمو في أربعة أصناف من الفطر. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد. 80 صفحة.



صورة (2): تحلل البروتين بفعل الفطر *T. harzianum* في وسط Skim milk في درجة حرارة 25 م لمدة 48 ساعة

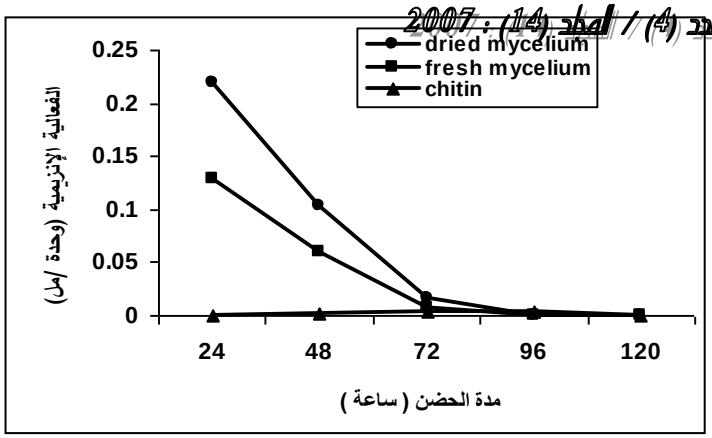


صورة (1): تحلل الكايتين بفعل الفطر *T. harzianum* في وسط الكايتين الغروي بدرجة حرارة 28 م لمدة 14 يوم

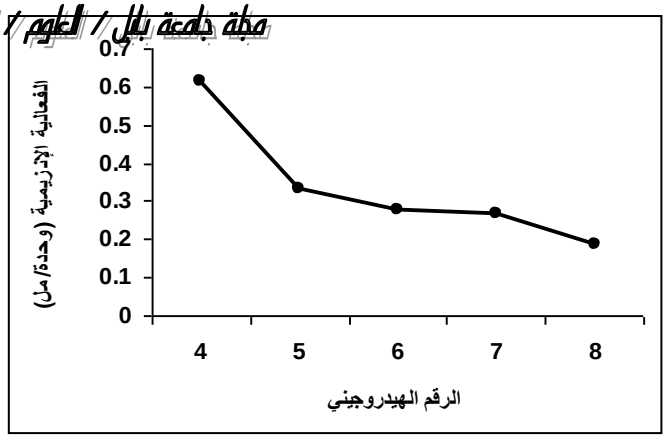


(أ) (ب)

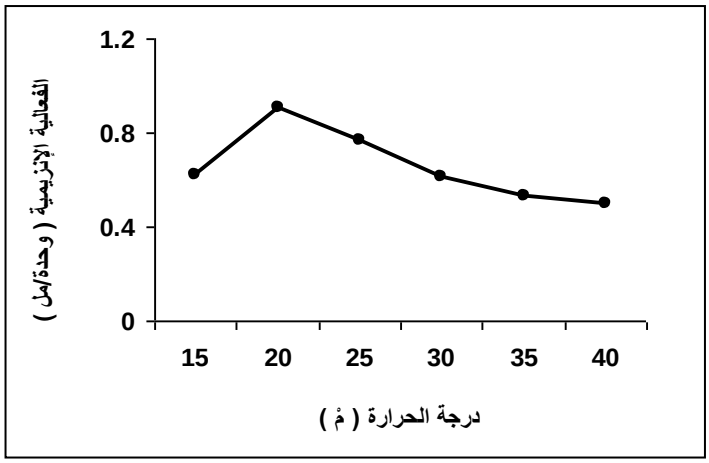
صورة (3): تأثير الراشح الخام لأنزيم الكايتينيز المفصول والمركز بالأسيتون للفطر *T. harzianum* في نمو الفطر *R. solani* بعد مدة حضن ثلاثة ايام في وسط PDA برقم هيدروجيني 4 ودرجة حرارة 20 م ، (أ) السيطرة، (ب) المعاملة



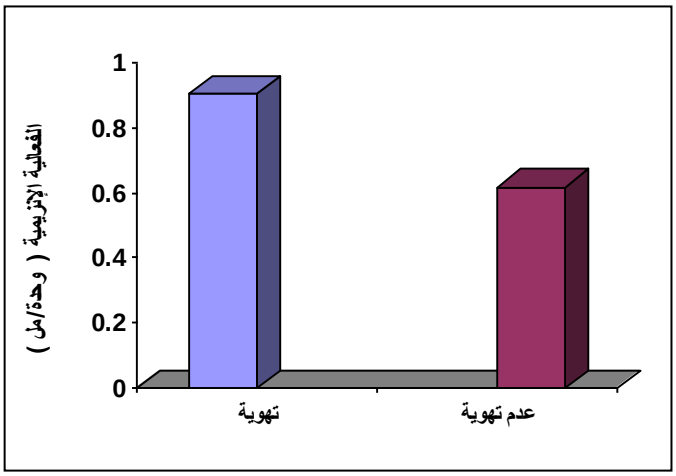
شكل رقم (1): تأثير مدة الحضن ونوع المصدر الكربوني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM (برقم هيدروجيني 6) وبدرجة حرارة 30 م مع المزج بسرعة 150 دورة/دقيقة وبواقع ثلاثة مكررات



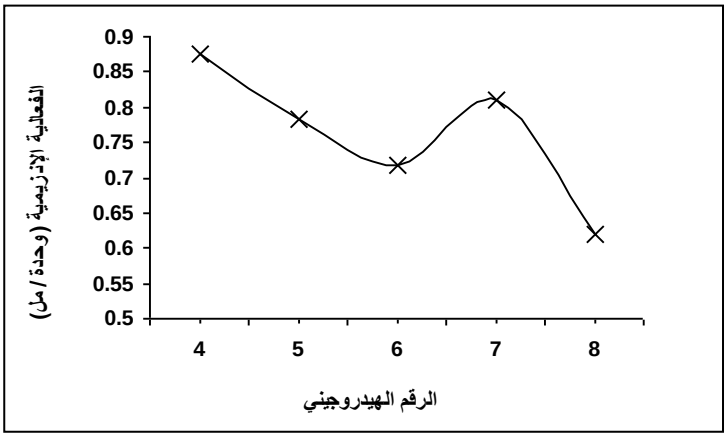
شكل رقم (2): تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة 1% كمصدر وحيد للكربون وبدرجة حرارة 30 م بعد مدة حضانة 24 ساعة مع المزج بسرعة 150 دورة/دقيقة وبواقع ثلاثة مكررات



شكل رقم (3): تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *Trichoderma harzianum* النامي في وسط MSM برقم هيدروجيني 4 الحاوي على الغزل الفطري الجاف بنسبة 1% كمصدر وحيد للكربون بعد مدة حضن 24 ساعة مع المزج بسرعة 150 دورة/دقيقة وبواقع ثلاثة مكررات



شكل رقم (4): تأثير عامل التهوية والمزج في إنتاج إنزيم الكايتنيز من الفطر *T. harzianum* النامي في وسط MSM بدرجة حرارة 20م لمدة 24 ساعة وبواقع ثلاثة مكررات



شكل (5) تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الراشح الإنزيمي الخام للكايتنيز