---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 19، العدد 2، ص94-102، 2008 ----

# الانزيمات المحللة للسليلوز والبكتين والبروتين في الفطريات *Trichoderma , Trichoderma pseudokoningii* و *Gliocladium rosum* المستخدمة في السيطرة الحيوية

**غادة عبد الله الحمداني**

*قسم علوم الحياة*

*كلية العلوم*

*جامعة الموصل*

(تاريخ الاستلام 2001/7/7 ، تاريخ القبول 2001/11/14)

## الملخص

درست قابليـة الفطريـات *Trichoderma, Trichoderma pseudokoningii* و *Gliocladium rosum* على إنتاج الأنزيمات المحللة للجـدر الخلويـة Polygalacturonase transeliminase (PGT), Polygalacturonase (PG) و Carboxy methyl cellulose (CMCase) وأنزيم Protease في رواشح أوساطها الزرعية ومستخلصات حصائرها.

تبين من نتائج التحليل الإحصائي ان الأنزيم (PG) في راشح الوسط الزرعي لكل فطـر يتميـز بفعالية أعلى مما هي عليه في حصيرته الفطرية بينما لم تكن هناك فروقات معنوية في فعاليته بين راشح الوسط الزرعي والحصيرة الفطرية للفطريات الثلاث. وأشارت النتائج إلى وجود فروقات معنويـة فـي فعالية الانزيم (PGT) في راشح الوسط الزرعي للفطر *T. harizianum* عن فعاليته في الفطرين الآخرين كما تميز هذا الانزيم في الفطر *G.roseum* بوجود فروقات معنوية بين راشح الوسط الزرعي والحصيرة الفطرية والعكس يبدو في الفطر *T.pseudokoningii*.

أشارت النتائج إلى عدم وجود فروقات معنوية في فعالية الانزيم (CMCase) بين راشح الوسـط الزرعي للفطرين *T.pseudokoningii* و *T.harizianum* ايضاً.

لم تظهر فروقات معنوية في فعالية هذا الانزيم في مسـتخلص الحصـائر الفطريـة للفطريـات الثلاث. أما الانزيم Protease فقد تميز بأعلى فعالية في راشح الوسط الزرعي للفطـر G.roseum ممـا عليه في الفطر *T.pseudokoningii* والفطر *T.harizianum*.

---

# Cellulytic, Pectolytic and Protease Enzymes of the Fungi *Trichoderma pseudokomngii, Trichoderma harizianum* and *Gliocladium roseum* Used in Biological Control

**Ghada A. Al-Hamdany**
*Department of Biology*
*College of Science*
*Mosul Uneversity*

**ABSTRACT**

The ability of the fungi *Trichoderma pseudokomngii, Trichoderma harizianum* and *Gliocladium roseum* to produce Polygalacturonase (PG), Polygalacturonase transeliminase (PGT), Carboxy methyl cellulase (CMCase) and protease were studied in culture medium filtrates as well as mycelial mats. The study revealed that (PG) in the culture medium filtrate of each fungus had higher activity than in that in the mycelial mat. While there is no significant difference in it's activity between the culture medium filtrate and mycelial mat in the three fungi (PGT) activity of *T. harizianum* culture medium filtrate had significant difference from that of the other fungi wheares (PGT) had significant difference between G. *roseum* culture medium filtrate and it's mycelial mat. While *T. pseudokomngii* had the reverse. The results revealed that there is no significant difference in the (CMCase) activity of the culture medium filtrate for *T. pseudokomngii* and *T. harizianum.* Also no significant difference has been found in the enzyme activity of the mycelial mat for the three fungi. The enzymeprotease had higher activity in the *G. roseum* culture medium than of *T. pseudokomngii* and *T. harizianum* .

---

## المقدمة

يعد الفطران *Trichoderma* و *Gliocladium* من الفطريات المستخدمة في السيطرة الحيوية على الأمراض النباتية على النطاق التجاري (Papavizas, 1985) عبر امتلاكهما لآليات السيطرة الحيوية من تضاد وتحلل وتنافس وتطفل (Papavizas and Lumsden,1980) وقد أجريت بعض الدراسات حول قابلية هذه الفطريات على إنتاج بعض الانزيمات المحللة للجدر الخلوية حيث أشار ديكن (1990) إلى أن الفطر *Trichoderma viride* له فعالية انزيمية عالية لانزيم السليوليز وينتج منه بصورة تجارية وان الفطر *Trichoderma ressei* ينتج انزيم الكاربوكسي ميثايل سليوليز (Kawamori et al., 1986) فيما وجد أن للعزلة QM9414 من الفطر *Trichoderma ressei* فعالية عالية لانزيم البروتيز (Hagspiel et al., 1989) وقد جاءت هذه الدراسة لتشمل مدى قابلية الفطريات *Trichoderma pseudokoningii*، *Trichoderma harizianum* والفطر *Gliocladium rosum* على إنتاج الانزيمات المحللة للجدر الخلوية ومنها المحللة للبكتين

Polygalacturonase transeliminase (PGT), Polygalacturonase (PG) والمحللة للسليلوز Carboxy methyl cellulose (CMCase) والمحللة للبروتين Protease، وقياس فعالية هذه الانزيمات في الوسط الزرعي والحصيرة الفطرية، لان هذه الفطريات من الفطريات المترممة في التربة والتي تساهم في تحليل المواد العضوية النباتية فيها وربما قد تفيدنا في المفاضلة في اختيار الفطر المستخدم في برامج المكافحة الحيوية استناداً إلى تركيب جدر خلايا الفطريات الممرضة والتي يحتوي قسم منها على السليلوز بالإضافة إلى البروتين ومركبات أخرى (ديكن، 1990).

## المواد وطرائق العمل

استخدمت في هذه التجربة الفطريات الثلاث *Trichoderma pseudokoningii* ، *Trichoderma harizianum* و *Gliocladium rosum* والتي تم الحصول عليها بصورة نقية من قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت. درست قابلية هذه الفطريات في إنتاجها للانزيمات المحللة للجدر وقياس فعالية هذه الانزيمات في راشح الوسط الزرعي ومستخلص الحصيرة الفطرية.

### أ. تنمية المزارع الفطرية وفصل رواشحها:

تمت تنمية الفطريات الثلاث في الوسط الزرعي جابكس السائل حيث استخدمت دوارق (250) مل وضع فيها (30) مل من الوسط الذي عقم بعدها تحت ضغط (15) باوند/انج$^2$ لمدة (15) دقيقة قسمت الدوارق إلى ثلاثة مجاميع. لقحت المجموعة الأولى بالفطر *T. pseudokoningii* والثانية بالفطر *T. harizianum* والمجموعة الثالثة بالفطر *G. rosum* حيث استخدم في التلقيح أقراص من المزارع النقية السابقة بعمر أسبوع وبقطر (10) ملم وبثلاث مكررات لكل فطر، وضعت بعدها في الحاضنة بدرجة (25)°م ولمدة أسبوعين، جمعت رواشح كل فطر على حدة ورشحت خلال أربعة طبقات من الشاش وضعت بعدها في جهاز الطرد المركزي بسرعة (4000) دورة /دقيقة بدرجة (4)°م لمدة عشرون دقيقة للحصول على راشح خالي من الخلايا، تم حفظه تحت التجميد، لحين قياس فعالية الانزيمات.

### ب. استخلاص الانزيم الخام من الحصيرة الفطرية:

بعد إجراء عملية الترشيح تم الحصول على الحصائر الفطرية الثلاث حيث وزنت كل منها على حدة وأضيف لكل (1) غرام من الحصيرة الفطرية (1) مل من الماء المقطر المعقم هرست بعدها بالخلاط الكهربائي لتحطيم مدة (5) دقائق ورشحت من خلال أربعة طبقات من الشاش أجريت بعدها عملية الطرد المركزي بسرعة (4000) دورة /دقيقة بدرجة (4)°م لمدة عشرون دقيقة وحفظت رواشح كل فطر على حدة تحت التجميد (Bander, 1983).

**جـ. قياس فعلية الانزيمات:**

تم قياس فعالية الانزيمات (PGT)، (PG) و (CMCase) باستخدام طريقة تحرر المجاميع المختزلة والمستخدمة من قبل Somogy (1952) والتي استخدمت فيها مادة Sodium polypectate كمادة أساس في اختبار فعالية الانزيمين الأولين، واستخدمت مادة Carboxy methyl cellulose كمادة أساس في اختبار فعالية الانزيم الثالث، أما فعالية انزيم Protease فتم قياسها باستخدام طريقة Dingle وجماعته (Dingle, et al.,1953) والمعدلة من قبل Mankarios (Mankarios,1978) وهي طريقة الكأس الطبقي Cupplate واستخدم فيها الجيلاتين كمادة أساس في اختبار فعالية الانزيم. واستخدمت المحاليل المنظمة Citrate phosphate buffer بالأس الهيدروجيني (5) للانزيمين (PG) و (CMCase)، والأس الهيدروجيني (8) بالنسبة للانزيم (PGT) بالمحلول المنظم Tris-HCl والمحلول المنظم Potasium phosphate buffer بالأس الهيدروجيني (4,5) للانزيم Protease واستخدم جهاز قياس شدة الطيف النسبية (المطياف) Spectrophotometer (Spectromic 20 BASUH&LOMB) (Bander, 1983) لقياس فعالية الانزيمات (PG),(PGT) و (CMCase) حيث تم تعيين شدة الطيف النسبية الممتصة للمحاليل (بالنانوميتر) مقابل محاليل المقارنة عند الطول الموجي (500) حيث تتناسب شدة الطيف النسبية مع المجاميع المختزلة المتحررة.

تم تحليل النتائج احصائياً بطريقة اختبار T (الراوي، 1978) ما بين فعالية كل انزيم لراشح الوسط الزرعي وفعاليته في مستخلص الحصيرة الفطرية لكل فطر على حدة. كذلك أجريت المقارنة بين فعالية كل انزيم من الانزيمات الأربعة ولكل فطر من الفطريات الثلاث في مستخلص الحصيرة الفطرية وراشح الوسط الزرعي.

## النتائج والمناقشة

يلاحظ من الشكلين (1) و(2) أن للفطريات الثلاث *T. pseudokoningii*، *T. harizianum* و *G. rosum* القابلية على انتاج الانزيمات المحللة للجدر الخلوية PG، PGT، CMCase والبروتيز في راشح الوسط الزرعي ومستخلص الحصيرة الفطرية وتتفق هذه النتيجة مع ما وجده Hagspiel واخرون (1989) و Kawamori وآخرون (1986) بالنسبة للانزيمين الآخرين في قابلية الفطر *Trichoderma ressei* على إنتاجهما في الوسط الزرعي. وتتفق هذه أيضا مع البياتي وآخرون (1987) الذي لاحظ قابلية الفطر *Rhizoctonia solani* على إنتاج الانزيمات الأربعة تلك في راشح الوسط الزرعي ومستخلص الحصيرة الفطرية.

وقد اظهر نتائج التحليل الإحصائي لفعالية الانزيمات الأربعة للفطريات الثلاث والموضحة في الشكلين (1) و (2) التالي:

**1. فعالية انزيم البوليكلاكتيرونيز (PG):**

كانت هناك فروقات في الفعالية الانزيمية، عند مستوى احتمال 1% و 5% ما بين راشح الوسط الزرعي لكل فطر ومستخلص حصيرته حيث تميز الراشح بفعالية انزيمية أعلى من مستخلص الحصيرة الفطرية وللفطريات الثلاث، وهذا ما يتفق مع البياتي وآخرون (1988) لدى مقارنته بالفعالية الانزيمية لراشح الوسط الزرعي للفطر *Rhizoctonia solani* وحصيرته الفطرية، فيما لم تكن المقارنة ذات فروقات معنوية ما بين الفطريات الثلاث في فعالية هذا الانزيم لراشح الوسط الزرعي وكذلك في مستخلص الحصيرة الفطرية.

**2. فعالية انزيم البوليكلاكتيورونيز-ترانس اليمنيز (PGT):**

دلت نتائج التحليل الإحصائي لراشح الوسط الزرعي للفطريات الثلاث عن وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال 1% بالنسبة لفعالية الانزيم للفطر *T. harizianum* عن فعالية انزيمية ذات دلالة احصائية عند مستوى احتمال 5% عن الفطر *G. rosum*.

أما بالنسبة لفعالية هذا الانزيم في مستخلص الحصيرة الفطرية فقد لوحظ ان مستخلص حصيرة الفطرين *T.harizianum* و *G. rosum* اللذان لم تظهر بينهما فروقات معنوية اعطى فروقات معنوية عن مستخلص الحصيرة الفطرية للفطر *T. pseudokoningii* عند مستوى احتمال 5% وقد تميز الانزيم في مستخلص الحصيرة الفطرية للفطر *T. harizianum* باعلى فعالية له يليه الفطر *G. rosum*. وقد لوحظ وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال 5% لدى مقارنة فعالية هذا الانزيم في راشح الوسط الزرعي للفطر ومستخلص الحصيرة الفطرية للفطر *G. rosum* حيث تميز مستخلص الحصيرة الفطرية بفعالية انزيمية أعلى مما في راشح الوسط الزرعي وعند مستوى احتمال 5% وهذا ما لا يتفق مع ما وجده (البياتي و بندر، 1987) الذي لاحظ أن فعالية هذا الانزيم في راشح الوسط الزرعي أعلى من فعاليته في مستخلص الحصيرة الفطرية فيما نجد أن هذا ينطبق على الفطر *T. harizianum* الذي لوحظ أن فعالية هذا الانزيم في راشح الوسط الزرعي أعلى من فعاليته في مستخلص الحصيرة الفطرية وعند مستوى احتمال 1% او 5% فيما نجد عدم وجود فروقات معنوية في فعالية هذا الانزيم بالنسبة لراشح الوسط الزرعي ومستخلص الحصيرة الفطرية للفطر *T. pseudokoningii*.

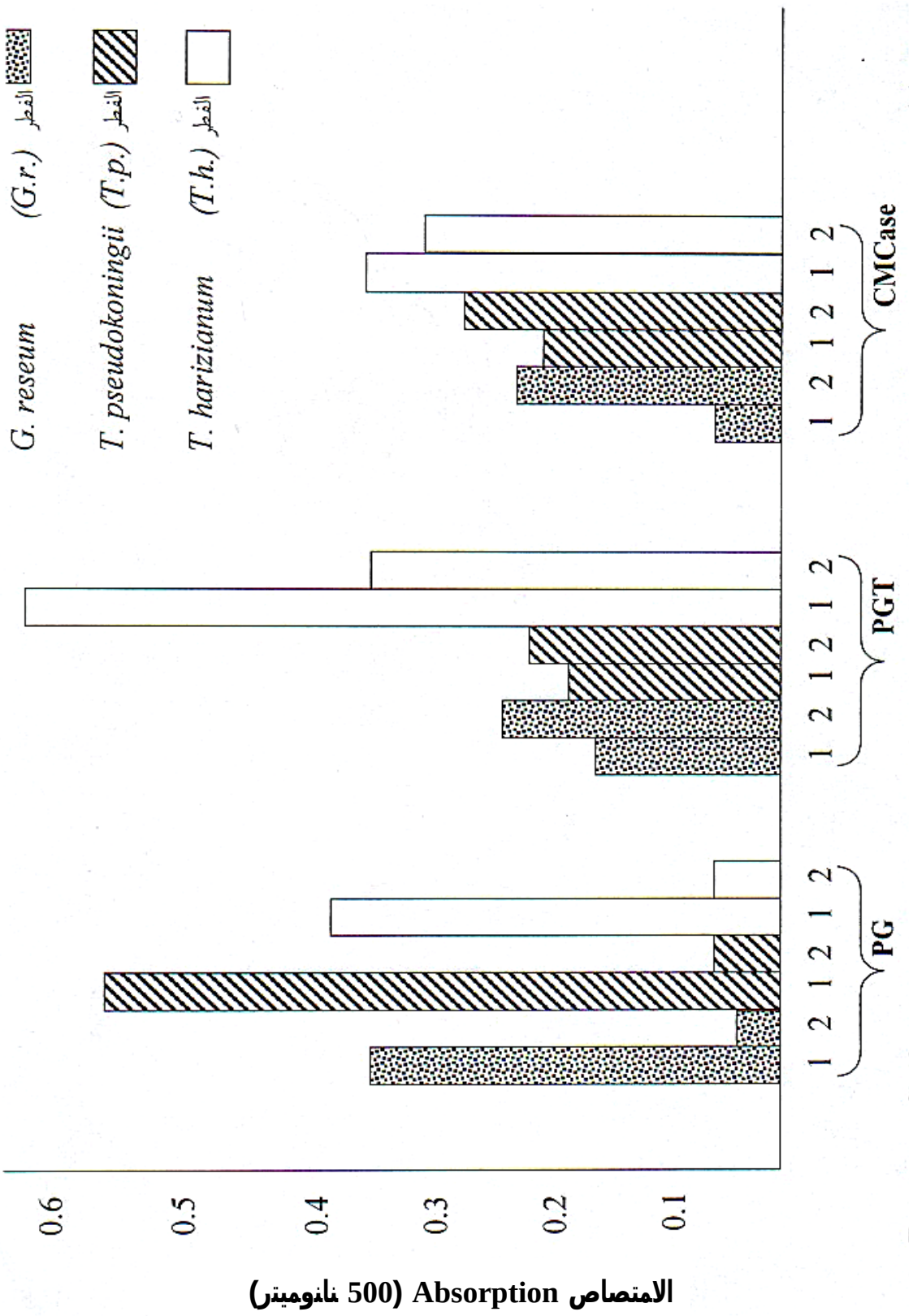
**3. فعالية انزيم الكاربوكسي ميثايل سليوليز (CMCase):**

دلت نتائج التحليل الإحصائي عن عدم وجود فروقات إحصائية ما بين فعالية هذا الانزيم فر راشح الوسط الزرعي للفطر *T. pseudokoningii* و *T. harizianum* اللذان تمتعا بفروقات معنوية عن فعاليـة هذا الانزيم في راشح الوسط الزرعي للفطر *G. rosum* وعند مستوى احتمال 1% فيمـا كانـت فعاليـة الانزيم لمستخلص الحصيرة الفطرية ذات فروقات معنوية وللفطريات الثلاث. وقد لوحظ وجود فروقـات معنوية عند مستوى احتمال 5% لدى مقارنة فعالية هذا الانزيم فـي راشـح الوسـط الزرعـي للفطـر ومستخلص حصيرته الفطرية بالنسبة للفطر *G. rosum* وكذلك بالنسبة للفطر *T. pseudokoningii* وهذا يتفق مع ما وجده البياتي وجماعته (1988) في ان راشح الوسط الزرعي للفطـر *Rhizoctonia solani* يتمتع بفعالية أعلى من فعاليته في مستخلص حصيرته الفطرية فما لا يتفق هذا مع ما لـوحظ مـن عـدم وجود فروقات معنوية في فعالية الانزيم ما بين راشح الوسط الزرعي للفطر *T. harizianum* ومستخلص حصيرته الفطرية.

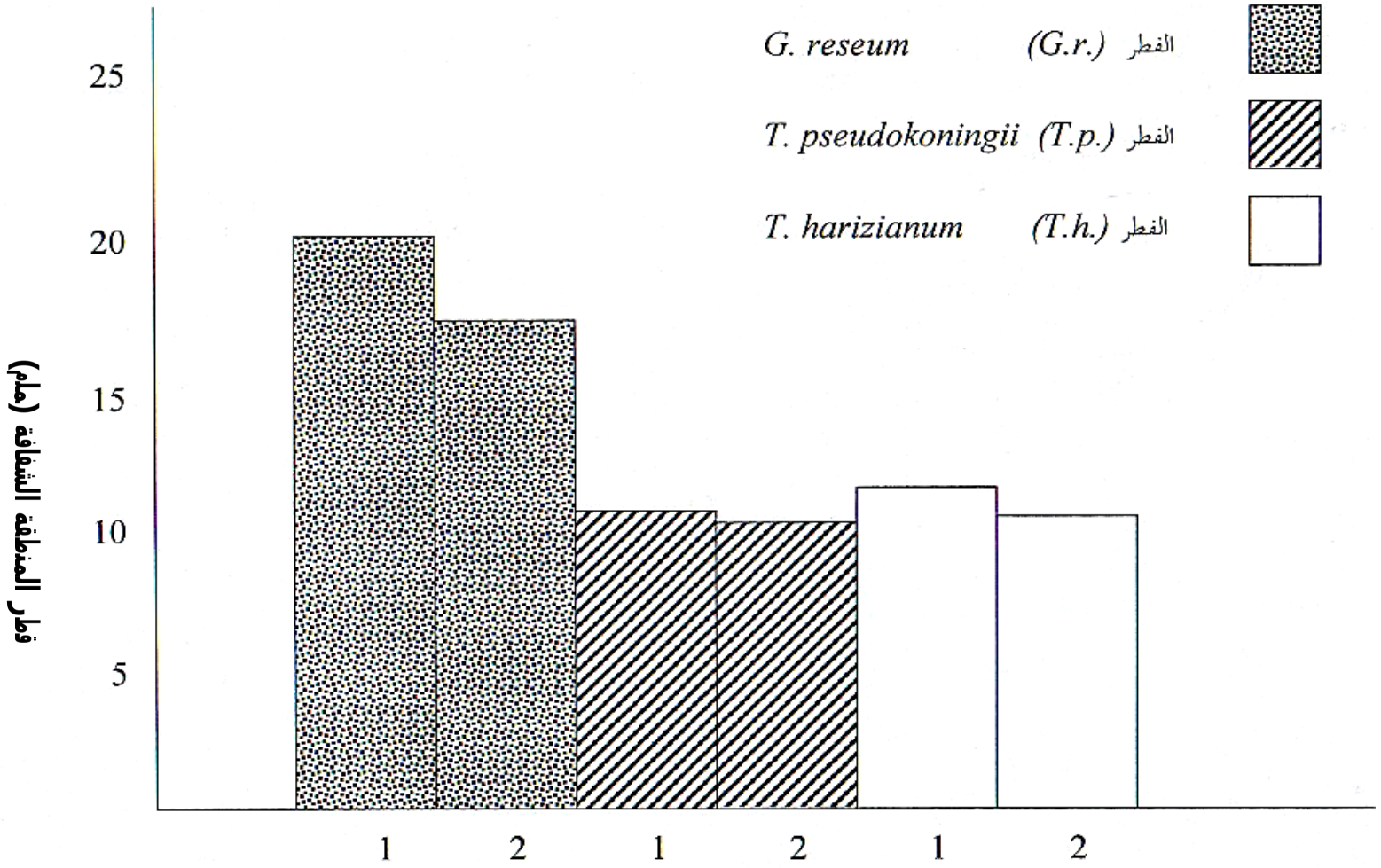
**4. فعالية انزيم البروتيز Protease:**

أشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى ان الفطر *G. rosum* يتمتع بأعلى فعالية انزيمية فر راشـح وسطه الزراعي وهناك فروقات معنوية عند مستوى احتمال 1% عن فعاليته في راشح الوسط الزرعـي للفطرين *T. harizianum* و *T. pseudokoningii* اللذين لا يختلفان فيما بينهما إحصائياً، وكذلك الأمـر بالنسبة لمستخلص الحصيرة الفطرية.

وقد أشارت النتائج الإحصائية أن فعالية الانزيم في رواشح الأوساط الزرعية للفطريات الثلاث لم تعط فروقات معنوية لدى مقارنتها كل على حدة مع مستخلصات حصائرها الفطرية وهذا لايتفق مع مـا وجده البياتي و بندر (1987) في تمتع راشح الوسط الزرعي للفطر بفعالية انزيمية أعلى عن تلك التي في مستخلص الحصيرة الفطرية للفطر *Rhizoctonia solani* .




الشكل 1 : فعالية انزيمات البوليكلاكتيورونيز (PG) والبوليوكلاتيورونيز-تراوس الميتيز (PGT) والكاربوكسي ميثيل سيليوليز (CMCase) للفطريات T.p. G.r. و T.h. لراشح الفطريات (1) ومستخلصات حصائرها( 2).




الشكل 2 : فعالية انزيم البرتييز للفطريات G.r. T.p. و T.h. لراشح الفطريات (1) ومستخلصات حصائرها(2).

## المصادر العربية

البياتي، ماجد هزاع وخليل ابـراهيم بنـدر، 1987. قيـاس فعاليـة بعـض الانزيمـات فـي انسـجة نباتـات البـاقلاء المصـابة بـالفطر *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* قابلية انتاج هـذه الانزيمـات فـي الوسـط الزرعـي. مجلـة العلـوم الزراعيـة العراقيـة، المجلد 18 (1)، 73-80.

البياتي، ماجـد هـزاع وخليـل ابـراهيم بنـدر وعلـي حسـين البهـادي، 1988. مقارنـة العزلـة الممرضة وغير الممرضـة للفطـر *Rhizoctonia solani* فـي انتـاج بعـض الانزيمـات. مجلة زانكو، المجلد (2) العدد (2) ،122-129.

ديكن-جي-دبليو، 1990. مـدخل الـى علـم الفطريـات الحديثـة. ترجمـة د.عبـد حسـين علـي التميمي وعبد الرسول خضر البياتي. مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر/اربيل.

الـراوي، خاشـع محمـود، 1978. المـدخل الـى الاحصـاء. مؤسسـة دار الكتـب للطباعـة والنشر /جامعة الموصل.

## المصادر الاجنبية

Bander, K.I., 1983. Physiological and biochemical studies on host pathogen interaction. Ms. C. thesis. University of Mosul. Iraq.

Dingle, J., Reid, W.W. and Salaomonsm, G.L., 1953. The enzymatic degradation of pectic and other polysaccharides II Application of cuppalte assay for estimation of enzymes. J. Sci. Food. Agri., Vol. 4, pp. 155-194.

Hagspiel, K., Doris, H. and Christian, P.K., 1989. Protease activity and protolytic modification of cellulases from a *Trichoderma reesei* QM9414 selectant Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 32, pp. 61-67.

Kawamori, M., Yasushi, M. and Seigo, T., 1986. Induction and production of cellulase by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol.. Vol. 24, pp.419-453.

Mankarios, A.T., 1978. Tissue degradation enzymes associated with *Cladosporium cladosorioides* leaf spots on *Psidium guajava.* Proc. Egypt. Acad. Soci., Vol. 31, pp.167-173.

Papavizas, G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phtopathol., Vol. 23, pp. 23-54.

Papavizas, G.C. and Lumsden, R.D., 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. Ann. Rev. Phytopathol., Vol. 18, pp. 389-413.

Somogy, M., 1952. Note on sugar determination. J. Biol. Chem., Vol. 195, pp. 19-25.