Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

The Ninth International Scientific Academic Conference
Under the Title "Contemporary trends in social, human, and natural sciences"
المؤتمر العلمي الاكاديمي الدولي التاسع
تحت عنوان "الاتجاهات المعاصرة في العلوم الاجتماعية، الانسانية، والطبيعية"
17 - 18 يوليو – تموز 2018 - اسطنبول – تركيا
http://kmshare.net/isac2018/

Purification and Characterization of Chitinase from the local Fungus Isolate *Aspergillus niger* K17 and Evaluation of its Efficiency in Control of Tomato Rot Diseases

Abdullah A.Hasan [a] , Kefaa Amer R. Aldoury [b]
[a,b] Department of Plant Protection – Collage of Agriculture – Tikrit University
[a]drabdullah.has67@tu.edu.iq

Abstract: The fungal isolate *Aspergillus niger* K17 showed highest chitinase activity among eighteen fungal isolates associated with rot root disease in tomato were isolated from some fields in Salah Aldin governorate, resulting in 1.34 unit/ml with significant superior on other fungi. The chitinase purification from A. niger k17 included four steps, the specific activity in the crude enzyme was 0.37 unit/mg protein with total activity 134 units increased to 1.13 unit/mg protein in the second step when using ammonium sulfate (80%) for the precipitation with enzyme yield of 34.85% and 3.05 purification fold. In the 3rd step of purification using gel filtration chromatography (Sephadex G0150) showed two isozymes coded with Ch-I and Ch-II have specific activity 3.9 and 5.37 unit/mg protein and purification fold were 10.54 and 14.51 fold, respectively. In the last purification step using ion exchange chromatography (DEAE-cellulose) the specific activity increased to 9.56 and 14.08 unit/mg protein and the enzyme yields were 61.34 and 68.81% with purification fold 25.84 and 38.05 fold for both isozymes Ch-I and Ch-II , respectively. The effect of each purification products on *Rhizoctonia.solani* and A. niger K17 was studied, the results showed a extrusive decrease in both fungi growth began from crude filtrate to precipitate then to Ch-I and Ch-II, the highest inhibition growth of A. niger k17

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

and R. solani was by mixture of two isozymes resulting in 4.66 and 2.86 cm compared with 7.6 and 8.82 cm in control , respectively. Molecular weight of chitinase isozymes Ch-I and Ch-II purified from A. niger k17 was 29.3 and 36.6 kDa , respectively, this enzyme regard a noval chitinase and this study regarded the first in Iraq that recognize production of chitinase isozymes differed from other chitinase purified in previous studies. In addition, other enzyme characters such as effect of temperature and pH on activity of chitinase were also studied. The results of the field experiment showed the Rashida cultivar showed lowest infection severity superior on other cultivars resulting in 15.98% in the same treatment of Techagarin with A.niger k-17 and purified chitinase in the present of the pathogen R.solani, while highest infection severity was 90.67% in Noon cultivar with *R. solani* alone, the same tomato cultivar produced highest fruit yield in the treatment of Techagarin with *A.niger* k-17 and purified chitinase in the present of the pathogen resulting in 4782.15 gm while lowest yield was 1640.98 gm in Noon cultivar with *R. solani* alone. The treatment of Techagarin with *A.niger* k-17 and purified chitinase in the present of the pathogen R.solani also superior in some quality characters of tomato fruits including juice percentage, total soluble salts and pH compared with the pathogen *R. solani* alone. The results of this study confirms efficacy of chitinase as antifungal agent and alternative of the chemical fungicides that affected in human healthy and the environment.

Keywords: chitinase , *Aspergillus niger* K17 , *Rhizoctonia.solani*, Tomato Rot Diseases .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

تنقية وتوصيف إنزيم الكايتنيز من عزلة الفطرا لمحلية *Aspergillus niger* K17 وتقييم كفائته في مقاومة أمراض التعفن على محصول الطماطم

أ.د. عبدالله عبدالكريم حسن* و كفاء عامر رجب الدوري
جامعة تكريت / كلية الزراعة – قسم وقاية النبات
***البريد الإلكتروني : drabdullah.has67@tu.edu.iq**

الملخص

أظهرت عزلة الفطر المحلية *Aspergillus niger* K17 من مجموع 18 فطرا من الفطريات المصاحبة لمرض تعفن جذور الطماطم من بعض حقول محافظة صلاح الدين تفوقها معنويا في تسجيل اعلى فعالية لإنزيم الكايتنيز اذ بلغت 1.34 وحدة /مل مقارنة بالفطريات الأخرى. شملت خطوات تنقية إنزيم الكايتنيز من الفطر *A.niger* K17 وذلك بإتباع أربع خطوات للتنقية إذ بلغت الفعالية النوعية للإنزيم في الراشح الخام 0.37 وحدة /ملغ بروتين وارتفعت الفعالية النوعية إلى 1.13 وحدة / ملغ بروتين عند الخطوة الثانية من التنقية بإستخدام الترسيب بكبريتات الأمونيوم 80% بحصيلة إنزيمية قدرها 34.85% وبعدد مرات تنقية بلغت 3.05 مرة . وعند الخطوة الثالثة من التنقية والتي أستخدمت فيها كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (Sephadex G-150) فقد أظهرت هذه الخطوة متناظرين إنزيميين رمز لهما بـ كايتنيز I (Ch-I) وكايتنيز II (Ch- II) بفعالية نوعية بلغت 3.9 و5.37 وحدة /ملغ بروتين بحصيلة إنزيمية 47.39 و53.28 % وبعدد مرات تنقية بلغت 10.54 و14.51 مرة على التوالي . أما في آخر خطوة من خطوات التنقية بإستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بإستخدام المبادل الأيوني(DEAE-cellulose) فقد إرتفعت الفعالية النوعية الى 9.56 و14.08 وحدة /ملغ بروتين للمتناظرين الانزيميين كايتنيز I وكايتنيز II كما وارتفعت ألحصيلة الإنزيمية إلى 61.34 و68.81% وبعدد مرات تنقية 25.84 و38.05 مرة . تم دراسة تاثير كل ناتج من خطوات التنقية في نمو الفطرين *Rhizoctonia solani* و *A.niger* واظهرت النتائج ان هناك تناقص طردي في نمو الفطرين إبتداءاً من الراشح الخام والراشح المرسب إلى متناظري الإنزيم I وII وقد أظهر أعلى تثبيط بفعل مزيج كلا المتناظرين كايتنيز I وكايتنيز II إذ بلغ 4.66 و 2.86 للفطرين *A.niger* و *R.solani* على التوالي مقارنة بالسيطرة إذ بلغ 7.6 و8.82 سم على التوالي , قدر الوزن الجزيئي لمتناظري الكايتنيز المنقاة من الفطر *A.niger* K17 إذ بلغ 29.3 و 36.6 كيلو دالتون لكلا متناظري الكايتنيز Ch-I و Ch-IIعلى التوالي ويعد هذا إنزيم فريد من نوعه وتعد هذه الدراسة الأولى في القطر التي تميز إنتاج متناظرين لإنزيم الكايتنيز مغايرة لإنزيمات

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

الكايتنيز المنقاة من الفطريات المدروسة في الدراسات السابقة فضلا عن دراسة بعض صفات الانزيم التي شملت تاثير الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة في فعالية وثباتية الانزيم ، نفذت تجربة حقلية حسب تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) لدراسة تاثرانزيم الكايتنيز المنقى كعامل مضاد لنمو الفطر المسبب لمرض تعفن الجذور *R. solani* على ثلاث اصناف من الطماطم واظهرت النتائج تفوق المعاملة الثلاثية التي شملت إنزيم الكايتنيز المنقى ومبيد التيشيجارين وفطر *A.niger* K17 بوجود الفطر الممرض في تسجيل ادنى شدة اصابة بالمرض بلغت 15.98% في الصنف رشيدة مقارنة مع معاملة الفطر الممرض فقط إذ بلغ 90.67% ، وانعكس ذلك في ارتفاع انتاجية النبات (صنف رشيدة) اذ بلغ 4782.15 غم في حين بلغ أدنى متوسط للإنتاجية في معاملة الفطر الممرض فقط للصنف نون إذ بلغ 1640.98 غم . فضلا عن تفوق هذه معاملة (إنزيم الكايتنيز المنقى ومبيد التيشيجارين وفطر *A.niger* K17) في بعض الصفات النوعية لحاصل ثمار الطماطم التي شملت نسبة العصير والأملاح الكلية الذائبة و الرقم الهيدروجيني مقارنة بمعاملة الفطر الممرض فقط.تؤكد نتائج هذه الدراسة كفاءة انزيم الكايتنيز كعامل مضاد لنمو الفطريات الممرضة للنبات كبديل عن المبيدات الكيميائية المؤثرة سلبا في صحة الانسان وبيئته.

الكلمات المفتاحية: انزيم الكايتنيز , الفطر *Aspergillus niger* K17 ، الفطر *Rhizoctonia.solan* , امراض التعفن في الطماطم

المقدمة

يواجه الانسان في جميع دول العالم العديد من المشاكل الخاصة بالغذاء ، ونتيجة لتعرض الحاصلات الزراعية الى العديد من الافات والامراض النباتية مسببة نقص كبير في الغذاء كما ونوعا (Savary واخرون 2012)، فقد تم مكافحة تلك الافات والامراض النباتية باستخدام المبيدات الكيميائية وبشكل مفرط مما ادى الى ظهور افات مقاومة لتلك المبيدات وبالوقت نفسه اجهدت هذه المبيدات النظام البيئي بكامل مكوناته فضلا عن خطورة هذه المبيدات على صحة الانسان نفسه مما ادى الى ارتفاع نسب الامراض بشكل عام والسرطانية منها بشكل خاص (Damalas وKoutroubas ، 2016), نظرا للأهمية محصول الطماطم الاقتصادية الذي يتعرض الى العديد من الآفات الزراعية مسببا خسائر اقتصادية بالحاصل كالإصابة بالأمراض الفطرية والفيروسية والديدان الثعبانية فضلا عن العديد من الآفات الحشرية، ويعد مرض تعفن الجذور الناتج عن عدد من الفطريات وخاصة النوع *Rhizoctonia solani* من أهم الأمراض التي تسبب خسائر اقتصادية لهذا المحصول إذ يسبب تعفن البذور وموت البادرات قبل البزوغ وبعده وتعفن الجذور وقواعد السيقان(Agriose ,2005) ونظرا لخطورة هذا المرض وما يسببه من خسائر إقتصادية فقد استخدمت عدد من الطرق الإحيائية والفيزيائية والكيميائية والأكثر استخداما هي المبيدات والمبخرات الكيميائية ولكن نظرا للكلفة العالية لهذه المبيدات وخطورتها وسميتها للإنسان والحيوان وتأثيرها في البيئة فقد

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

لجأت الأبحاث لإيجاد طرق مقاومة أكثر أمانا ومن أبرزها المقاومة الإحيائية والتي تتميز بأنها طويلة الأمد ومختصة وتتوافق مع طرق المكافحة الأخرى وقليلة الضرر بالبيئة مما يجعل لها أهمية في المكافحة المتكاملة، ويعد الفطر *Trichoderma* وأنواع عديدة منه نموذج لدراسة المكافحة الإحيائية إذ استعملت كعوامل مكافحة حيوية ضد فطريات التربة الممرضة (Papavizas، 1985) وكانت ناجحة واستعملت كبدائل للمبيدات الكيميائية (Ozbay و Nenman، 2004 و Verma وآخرون، 2007 و Montealegre وآخرون،2010)، كما وسجلت الأبحاث عدد من الفطريات في المقاومة الإحيائية مثل الفطر *Paecilomyces lilacinus* والفطر *Verticillium bigutatum* والفطر *Pleurotus* (حسن وآخرون،2011) إذ تمتلك هذه الفطريات آليات تجعلها عوامل مقاومة إحيائية مثل المنافسة على المواد الغذائية والمكان وسرعة النمو وإفراز العديد من المضادات الحيوية والإنزيمات وتحفيزها للمقاومة الجهازية للنبات مما يؤدي بشكل رئيس إلى تحطيم خلايا المضيف من خلال التطفل (Benites وآخرون، 2004) ، تتطلب عوامل المقاومة الإحيائية بعض العوامل التي تؤهلها في إنجاح المكافحة مثل تأقلمها في التربة أو البيئة وتتطلب عدة أيام لغرض النمو والتكاثر ومن ثم ينتج فعلها التضادي ضد الممرضات وللتغلب على عامل الزمن فقد لجأت الأبحاث إلى دراسة ماتنتجه عوامل المقاومة الإحيائية من مضادات حياتية أو إنزيمات نتيجة لفعلها المباشر على الممرضات ويعد إنزيم الكايتنيز أحد أهم الإنزيمات الهاضمة الذي يحلل الجدر الخلوية لكثير من الفطريات الممرضة والنيماتودا والحشرات مما يؤدي إلى إضعافها وموتها. (Estrella و Chet ,1999)

نظرا لأهمية هذا المرض وانتشاره عالميا فقد أجريت هذه الدراسة والتي تهدف إلى عزل وتنقية إنزيم الكايتنيز من الفطريات الممرضة والمصاحبة لنبات الطماطم ودراسة بعض حركيات الإنزيم (تقدير الوزن الجزيئي والنقاوة والرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة المثلى لفعالية وثباتية الإنزيم فضلا عن التقييم الحقلي لكفاءة الإنزيم (بالمقارنة مع سيطرة موجبة في تثبيط المرض وتأثيره في معايير الإصابة والمعايير الخضرية والإنتاجية والنوعية لثلاث أصناف من الطماطة .

المواد وطرائق العمل :

أجريت الدراسة المختبرية في جامعة تكريت –كلية الزراعة – مختبرات قسم وقاية النبات ونفذت التجربة الحقلية في حقول كلية الزراعة للموسم 2016-2017 ، أما الدراسات المسحية الخاصة بجمع العينات شملت بعض حقول الطماطم المزروعة في محافظة صلاح الدين للموسم 2015-2016

جمع العينات :

جمعت العينات من حقول مصابة بعض نباتاتها بتعفن الجذور وقواعد السيقان في محافظة صلاح الدين للعام (2015-2016) من مناطق مختلفة (الدور- تكريت – العلم) للمدة من (شهر أيار ولغاية شهر آب) لغرض عزل الفطريات المسببة

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

لمرض تعفن الجذور وتشخيصها. إذ اختيرت العينات تبعا للأعراض الظاهرة على المجموع الخضري والمتمثلة بتقزم النبات وضعفه واصفرار الأوراق وجفافها وموت بعضها وكذلك أعراض المجموع الجذري المتمثلة بتقرح الجذور وقواعد السيقان وغياب الشعيرات الجذرية إذ تم اخذ العينات ووضعت بأكياس بولي اثلين وسجلت ملاحظات على كل عينة تتضمن تاريخ اخذ العينة واسم المنطقة الزراعية ونقلت للمختبر لغرض العزل والتشخيص .

التجارب المختبرية :

عزل الفطريات من الجذور

عزلت الفطريات في اليوم التالي من جمع العينات إذ تم فصل منطقة الساق القريبة من سطح التربة ومنطقة الجذور عن باقي أجزاء النبات عند ارتفاع 5 سم فوق منطقة التاج إذ غسلت الأجزاء النباتية (الجذور) بالماء الجاري لمدة 30 دقيقة ثم تركت لتجف بعدها تم تقطيع الأجزاء إلى قطع صغيرة بطول 0.5-1 سم وعقمت لمدة خمس دقائق بمحلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز1% وبعدها غسلت بالماء المقطر ثلاث مرات وجففت على أوراق الترشيح ونقلت 4 قطع إلى أطباق بتري بقطر 9 سم التي تحتوي على 15-20 مل من الوسط ألزرعي PDA إذ استخدمت 5 أطباق لكل عينة وحضنت الأطباق على درجة حرارة 25 ± 2°م لمدة 3-5 أيام.

تحديد الفطر الأكثر إنتاجاً لإنزيم الكايتنيز

تم الإستدلال عن الفطر الأكثر إنتاجاً لإنزيم الكايتنيز وذلك بعد زراعة الفطريات التي عزلت من المجموع الجذري والتربة والثمار في وسط الكايتين كلاً على إنفراد وبواقع 3 مكررات لكل فطر وحضنت بدرجة حرارة 25±2°م لمدة 10 أيام وبعد إكتمال نمو المستعمرة على سطح الوسط الغذائي في الدورق تم ترشيحها بورق الترشيح ثم قدرت فعالية إنزيم الكايتنيز في الراشح الفطري الخام .

تقدير فعالية إنزيم الكايتنيز Chitinase

إتبعت طريقة Tweddell وآخرون (1994) لتقدير إنزيم الكايتنيز إذ يتكون مزيج التفاعل من إضافة 0.5 مل من محلول الكايتين (1%) و 0.5 مل من المستخلص الإنزيمي لكل معاملة وحضن في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م لمدة ساعتين وبعدها أضيف 1 مل من DNS ووضع المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة 100°م لمدة 5 دقائق بعدها بردت الأنابيب وقيست الامتصاصية في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي 540 نانوميتر . إعتمد المنحنى القياسي لسكر ن- أستايل كلوكوز أمين في تقدير الفعالية الإنزيمية إذ عُرفت الفعالية الإنزيمية بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتمرير 1 مايكرومول من سكر ن- أستايل كلوكوز أمين في الدقيقة الواحدة وحسب ظروف التفاعل .

تنقية إنزيم الكايتنيز

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

نقي إنزيم الكايتنيز من المستخلص الخام للفطر *Aspergillus niger* K17 وهو الفطر الذي أظهر راشحه أعلى فعالية لإنزيم الكايتنيز حسب (حسن,2005) وفق الخطوات التالية :

الترسيب بكبريتات الامونيوم

رسب الإنزيم بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 80% إذ أضيف 53.2 غرام لكل 100 مل من راشح الإنزيم في بيكر مع الاستمرار في التحريك إلى أن تم إذابتها بالكامل بعدها وزعت على أنابيب اختبار ونبذت بجهاز الطرد المركزي بواقع 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق بعدها تم التخلص من الراشح العلوي مع الإحتفاظ بالإنزيم الخام المترسب في أنابيب الاختبار .

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بإستخدام Sephadex G-150

أضيف 10 ميليلتر من مستخلص الإنزيم المركز الناتج من الفقرة السابقة إلى عمود السفادكس G-150 وأجري الاسترداد elution بدارئ الفوسفات (0.02 مولر) ذي الرقم الهيدروجيني 6 وبسرعة جريان 0.2 ميليلتر بالدقيقة , جمع المحلول النافذ بأجزاء حجم كل جزء 3 ميليلتر وقيست الإمتصاصية لكل جزء على الطول الموجي 280 نانوميتر كما قدرت الفعالية الإنزيمية لتلك الأجزاء . جمعت الأجزاء المحتوية على أقصى فعَّالية إنزيمية في أنابيب إختبار لإستخدامها في خطوة التنقية اللاحقة .

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

أضيف 10 مل من الأجزاء التي أظهرت أعلى فعَّالية لإنزيم الكايتنيز والناتجة من الخطوة السابقة (كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي) وأجري الإسترداد elution بإستخدام محلول متدرج التركيز من كلوريد الصوديوم (0-1)في محلول الفوسفات المنظم (pH7) جمعت الأجزاء من العمود بواقع 3 مل / جزء في أنابيب إختبار وقدرت فيها الفعَّالية الإنزيمية والإمتصاصية عند 280 نانوميتر .

دراسة بعض خواص إنزيم الكايتنيز المنقى من الفطر *A.niger* K17

تقدير الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الكايتنيز

قدر الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية حسب (حسن,2005) من خلال تحضير مزيج التفاعل في أنابيب إختبار, يحتوي كل أنبوب على 10 مل من محاليل مختلفة الرقم الهيدروجيني (pH5 و pH6 و pH7 و pH8 و pH9), وأضيف 0.1 غم من الكايتين النقي إلى كل أنبوب إختبار , رجت الأنابيب جيداً لغاية تجانس المحلول أُخذ 0.5 مل من محلول كل أنبوب

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

وأضيف إلى أنابيب إختبار تحتوي كل منها على 0.5 مل من راشح الإنزيم وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة ساعة وبعد إنتهاء مدة التحضين أضيف 1 مل من محلول DNS لكل أنبوب ووضعت في حمام مائي بدرجة 100°م لمدة 5 دقائق بعدها بردت الأنابيب وقيست الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر ثم قدرت فعالية الكايتنيز

تقدير الرقم الهيدروجيني الأمثل لثباتية الإنزيم

حضرت محاليل مختلفة من قيم الرقم الهيدروجيني (5 و6 و7 و8 و9) بأنابيب إختبار كما في الطريقة السابقة, وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 4 ساعات وبعد انتهاء مدة التحضين أضيف 1 مل من محلول DNS لكل أنبوب ووضعت في حمام مائي بدرجة 100°م لمدة 5 دقائق بعدها بردت الأنابيب وقيست الإمتصاصية بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر ثم قُدَّرت فعَّالية الكايتنيز والفعالية المتبقية للأنزيم .

تقدير درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

حضن مزيج التفاعل المتكون من 0.5 مل من راشح الإنزيم و0.5 مل من محلول الكايتين النقي بدرجات حرارة مختلفة 20 و30 و40 و50 و60 و70 و80°م لمدة ساعة وبعد إنتهاء مدة التحضين أضيف 1 مل من محلول DNS لكل أنبوبة ووضعت في حمام مائي بدرجة 100°م لمدة 5 دقائق بعدها بردت الأنابيب وقيست الإمتصاصية بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر ومن ثم قدرت الفعَّالية الإنزيمية .

تقدير درجة الحرارة المثلى لثباتية الإنزيم

حضرت مزيج التفاعل كما في الفقرة السابقة وبدرجات الحرارة نفسها وحضنت لمدة 4 ساعات وبعد انتهاء مدة التحضين أضيف 1 مل من محلول DNS لكل أنبوبة ووضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 100°م لمدة 5 دقائق بعدها بردت الأنابيب وقيست الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر ثم قدرت الفعالية المتبقية للإنزيم.

تقدير الفعالية المتبقية للإنزيم

قدرت الفعالية المتبقية للإنزيم كما في المعادلة الاتية :-

$$\text{الفعالية المتبقية للإنزيم } (\%) = \frac{\text{فعالية الإنزيم بالمعاملة (وحدة/ مل)}}{\text{فعالية الإنزيم بالسيطرة (وحدة/ مل)}} \times 100$$

تقدير الوزن الجزيئي

قدر الوزن الجزيئي لإنزيم الكايتنيز المنقى من الفطر *A.niger* K17 حسب ماذكره Cooper , (1977) بإستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (Sephadex G-150) وحسب المعادلة :

$$K_{av} = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

Kav : يمثل معامل الفصل Partition coefficient

V_e : يمثل حجم الإسترداد Elution Volume

V_o : يمثل حجم العمود الخامل Void (Dead)Volume

V_t : يمثل حجم العمود الكلي Total Volume

وبالإعتماد على معامل الفصل لكل من البروتينات القياسية globulin gama bovine و lysozyme و myoglobin و ovalbumin أستخرج الوزن الجزيئي لمتناظري إنزيم الكايتنيز المنقى من الفطر *A. niger* K17 من خلال العلاقة بين معامل الفصل والوزن الجزيئي .

الفعالية النوعية والفعالية الكلية وعدد مرات التنقية والحصيلة الإنزيمية لإنزيم الكايتنيز

تم حساب المعادلات حسب ماذكرهُ Cooper , (1977)

$$\text{الفعالية النوعية (وحدة /ملغ بروتين)} = \frac{\text{فعالية الكايتنيز (وحدة /مل)}}{\text{تركيز البروتين (ملغ/مل)}}$$

فعالية الكايتنيز الكلية (وحدة) =فعالية الكايتنيز (وحدة /مل) × الحجم (مل)

$$\text{عدد مرات التنقية} = \frac{\text{الفعالية النوعية لخطوة التنقية}}{\text{الفعالية النوعية للراشح الخام}}$$

$$\text{الحصيلة الإنزيمية (\%)} = \frac{\text{فعالية الكايتنيز الكلية لخطوة التنقية}}{\text{فعالية الكايتنيز الكلية للراشح الخام}} \times 100$$

التجربة الحقلية

نفذت التجربة في جامعة تكريت – حقول كلية الزراعة وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة RCBD, إذ تم تنظيف تربة الحقل وحراثتها وتسويتها. رطبت التربة وعقمت بالفورمالين بتركيز 5% من المحلول التجاري (37%), وغطيت بالنايلون لمدة سبعة أيام ثم أجريت التهوية لتبخر الفورمالين , قسم الحقل إلى 3 قطاعات المسافة بين قطاع وآخر 2 م كل قطاع يحتوي 24 معاملة بمسافات متساوية , بواقع 8 معاملة × 3 صنف وبذلك يكون مجموع الوحدات التجريبية الكلية 52 وحدة تجريبية بأبعاد 3.5 × 1.2 متر مع ترك مسافة 60 سم بين الوحدات التجريبية وذلك لعمل كتف ترابي ارتفاعه 25-30 سم قسمت كل وحدة تجريبية إلى ثلاث خطوط كل خط يحتوي 5 نباتات والمسافة بين خط وآخر 1.75م ومابين نبات وآخر 30 سم , شملت التجربة ثلاث أصناف طماطة (نون و سان و رشيدة) كما وتضمنت التجربة المعاملات الآتية:-

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

1- معاملة الفطر الممرض .2 معاملة الفطر الممرض + الإنزيم .3 معاملة الفطر الممرض + المبيد .4 معاملة الفطر الممرض + الفطر المنتج للإنزيم .5 معاملة الفطر الممرض + الإنزيم + المبيد .6 معاملة الفطر الممرض + الإنزيم + الفطر المنتج للإنزيم .7 معاملة الفطر الممرض + المبيد + الفطر المنتج للإنزيم .8 معاملة الفطر الممرض + المبيد + الإنزيم + الفطر المنتج للإنزيم.

تمت المعاملة بالفطرين *R.solani* و *A.niger* عن طريق إضافة قطعتين بابعاد 1×1 سم^2 من مستعمرة بعمر 5 أيام لكل فطر مع المجموع الجذري أثناء الشتل . وأضيف 3 مل من الإنزيم المنقى لكل نبات في حين أُضيف 800 مل من مبيد التيشيجارين لكل معاملة وذلك حسب التوصيات المعتمدة من قبل الشركة المنتجة للمبيد ,أجري ري الحقل بإستخدام منظومة الري بالتنقيط كما وأجريت عمليات التسميد بإضافة سماد نتروفسكا المجهز من شركة لاين والذي يحتوي على العناصر الصغرى والكبرى التي يحتاجها النبات والسماد هيومك المحبب إذ تم أضافة السماد حسب التوصيات المعتمدة من الشركة المنتجة .

الصفات المدروسة

تقدير شدة إصابة النباتات

قدرت شدة الإصابة لكل المعاملات وحسابها حسب معادلة Mckinney (1923) وتم تقدير درجة الإصابة حسب مظهر الإصابة إعتماداً على الدليل الآتي :الدرجة 0 = النبات سليم والمجموع الجذري كبير والجذور بيضاء، الدرجة 1= تلون بني بسيط على الجذور واصفرار لعدد محدد من الأوراق ، الدرجة 2= تلون الجذور بالكامل مع اصفرار شامل للأوراق ، الدرجة 3= يمتد التلون من الجذور إلى قواعد السيقان ، الدرجة 4= موت عام للنبات.

شدة الإصابة =عدد النباتات في الدرجة 0×0 + عدد النباتات في الدرجة 1×1.....عدد النباتات في الدرجة 4×4 / مجموع النباتات المفحوصة × أعلى فئة .

المعايير الإنتاجية

حساب وزن الحاصل للنبات الواحد / تم حساب أوزان الحاصل لجميع معاملات التجربة ومكرراتها بواقع أربع جنيات بوساطة ميزان ميكانيكي .

المعايير النوعية

تقدير نسبة العصير : حضر عصير الطماطة وذلك بعد وزن الثمار وتقطيعها ووضعها في الخلاط الكهربائي وتشغيله على السرعة القصوى وبعدها رشح الخليط وجمع بأنابيب إختبار ثم قدرت نسبة العصير حسب المعادلة التالية :-

$$\% \text{ للعصير} = \frac{\text{وزن العصير (غم)}}{\text{وزن الثمار (غم)}} \times 100$$

الأملاح الذائبة الكلية والرقم الهيدروجيني

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

قدرت كل من الاملاح الذائبة الكلية والرقم الهيدروجيني بجهاز الـ pH/EC/TDS meter إذ تم ضبط الرقم الهيدروجيني للجهاز بالماء المقطر وقيست قراءات الرقم الهيدروجيني لعصير كل معاملة من المعاملات بعدها قيست الأملاح الذائبة الكلية بالجهاز نفسه.

التحليل الإحصائي

نفذت التجربة حسب تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) وحللت البيانات باستخدام برنامج SPSS version 19.0,IBM Corporation Somers,NY,USA Statisical Package for Social Sciences) وتمت المقارنة بين المتوسطات حسب إختبار الفرق المعنوي الأصغر Least Significant Deference (LSD) وإختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى إحتمالية 0.05.

النتائج والمناقشة

تحديد الفطر الأكثر إنتاجاً لإنزيم الكايتنيز

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (1)أن جميع العزلات الفطرية كانت منتجة لإنزيم الكايتنيز كما وبين الشكل نفسه, إن هناك تباين في الفعالية الإنزيمية بإختلاف العزلة الفطرية, وأظهرت عزلة الفطر *A.niger* K17 أعلى فعالية إنزيمية بلغت 1.34 وحدة /مل وهي متفوقة معنويا مقارنة بالفطريات الأخرى. يليها كل من الفطريات *Penicillium* و *F.oxysporum* و *F.solani* و *M.phaseolina* و *Rhizoctonia sp.* و *R.solani* إذ بلغت فعالية الكايتنيز 1.23 و 1.22 و 1.12 و 1.11 و 1.1 و 1.09 وحدة /مل (مع عدم وجود فروق معنوية بينها) . إن التفاوت في إنتاج إنزيم الكايتنيز يعود بالدرجة الرئيسية إلى تركيب الوراثي للعزلات الفطرية إذ إن العزلات الفطرية عادة ماتكون متباينة وراثياً مما يعكس التغايير في كثير من الصفات الفسلجية والمظهرية ويعزى سبب إنتاج الكايتنيز من قبل جميع الفطريات المعزولة إلى دور هذا الإنزيم في نمو وحياتية الفطريات إذ إنه يساهم في عملية تفرع الخيوط الفطرية وتكوين الحواجز والنمو القمي للفطر كما يحلل الكايتين إلى وحدات بسيطة من N-acetyl glucoseamine تمد الفطر بمركبات سكرية وأمينية .(Brzezinska و Karthik ; 2012, Jankiewicz واخرون ,2014) .

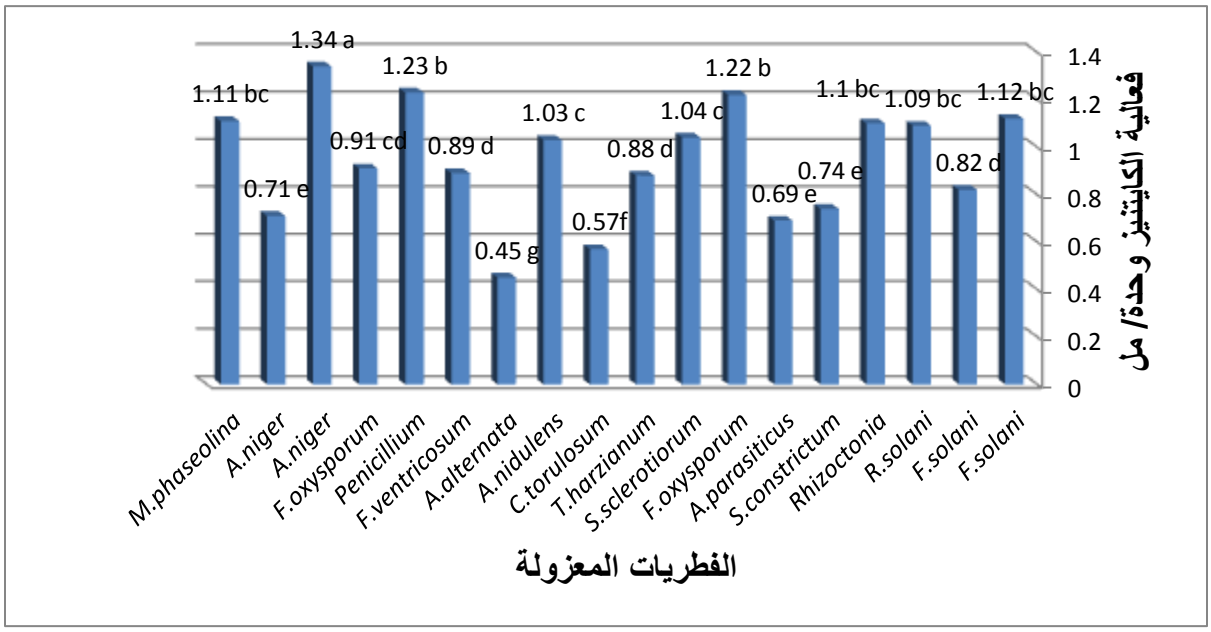
تنقية إنزيم الكايتنيز

الترسيب بكبريتات الأمونيوم

أنجز الترسيب لراشح الإنزيم الخام بملح كبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 80% مما أدى إلى إرتفاع الفعَّالية النوعية للإنزيم إذ بلغت 1.13 وحدة / ملغ بروتين مقارنة بـ 0.37 وحدة / ملغ بروتين في الراشح الخام قبل الترسيب . يعد ملح كبريتات الأمونيوم من أكفأ الأملاح في ترسيب الإنزيمات والبروتينات والأكثر إستعمالاً نظراً لذائبيته العالية وإنعدام تأثيره في الأس

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

الهيدروجيني ولايؤثر في ثبات الإنزيم فضلاً عن كلفتها القليلة وأن مبدأ عمله يعتمد على معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والإخلال بطبقة الماء المحيطة به مما يؤدي إلى ترسيبه بتأثير مايعرف salting out (عبدالرحمن ,2009)
إن الترسيب بكبريتات الأمونيوم يشمل جميع المحتوى البروتيني والإنزيمي وعليه يتطلب خطوات أخرى لفصل وتنقية الكايتنيز من الراسب الناتج .



*تشير الحروف الأبجدية المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية والحروف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية حسب إختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.05

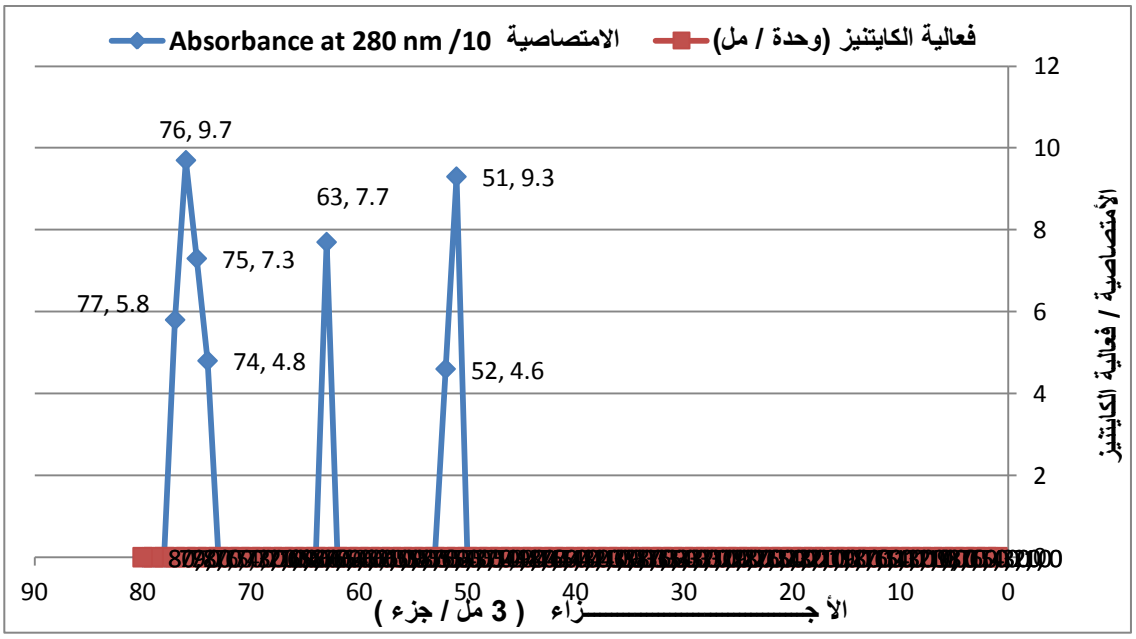
شكل (1) فعالية إنزيم الكايتنيز (وحدة / مل)من الفطريات المعزولة

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

أظهر الشكل (2 , الأجزاء 120–160) وجود 16 قمة أظهرت فعالية بروتينية من خلال قيمة الإمتصاصية عند طول موجي 280 نانوميتر بإستخدام تقانة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي(الهلام Sephadex G150) وعند قياس فعالية إنزيم الكايتنيز فقد أظهرت قمتين فعَّالة لهذا الإنزيم الأولى كانت ضمن الأجزاء البروتينية 134 و135 و136 و137 و138 إذ بلغت قيم الإمتصاصية عند 280 نانوميتر 0.19 و0.36 و1.3 و0.58 و0.24 على التوالي والتي ضمت فعالية إنزيم الكايتنيز ضمن هذه القمة للأجزاء 136 و137 و138 والتي بلغت فعالية الكايتنيز فيها 1.78 و6.35 و2.51 وحدة /مل على التوالي .أما الفعَّالية الإنزيمية للقمة الثانية فقد كانت ضمن أجزاء القمة البروتينية 142 و134 و144 و145 إذ بلغت قيم الإمتصاصية عند طول موجي 280 نانوميتر 0.219 و1.46 و0.941 و0.28 على التوالي والتي ضمت فعالية

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

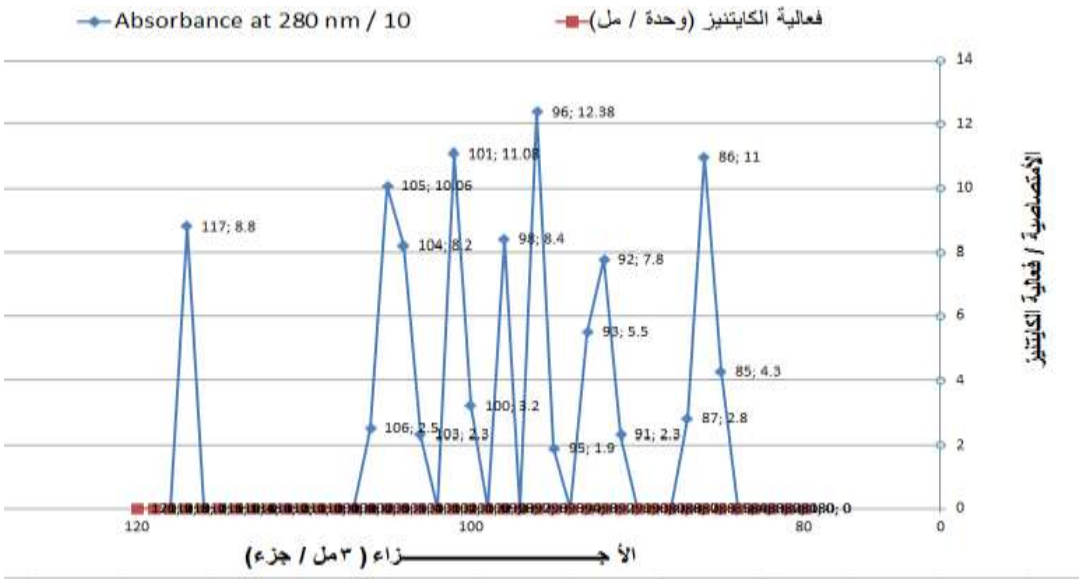
لإنزيم الكايتنيز ضمن هذه القمة للأجزاء 142 و143 و144 و145 إذ بلغت الفعَّالية 2.71 و4.22 و7.14 و1.93 وحدة /مل على التوالي . تعد تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي من التقانات الكفؤة في فصل البروتينات والإنزيمات وتعتمد الية الفصل على الوزن الجزيئي للبروتينات والإنزيمات وطالما هناك إختلاف في الأوزان الجزيئية فإن الفصل ينجز بدقة عالية (حسن ,2005). إنَّ وجود قمتان من إنزيم الكايتنيز يدل على إنَّ هناك متناظران isozymes من هذا الإنزيم لهما دور مهم في تحلل الكايتين .

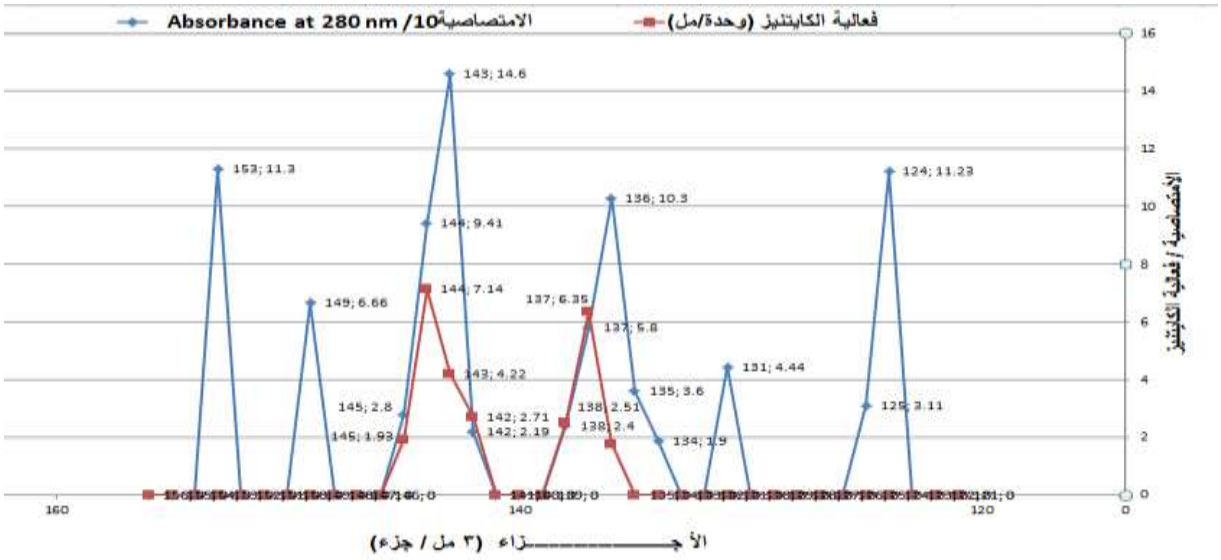


شكل (2) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لإنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر *A. niger* K17 , أستخدم عمود هلام Sephadex G – 150 بأبعاد 2.5 × 90 سم , أجري الغسل بمحلول 0.02 مولر دارئ الفوسفات ذو الرقم الهيدروجيني 6 ,سرعة الجريان 0.2 ميليلتر /دقيقة بواقع 3 ميليلتر /جزء ,الأجزاء 80.0

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

يتبع شكل (2) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لإنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر **K17** ***A. niger*** , الأجزاء **80 ـ 120**





يتبع شكل (2) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لإنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر **K17** ***A. niger*** , الأجزاء **120 ـ 160**

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

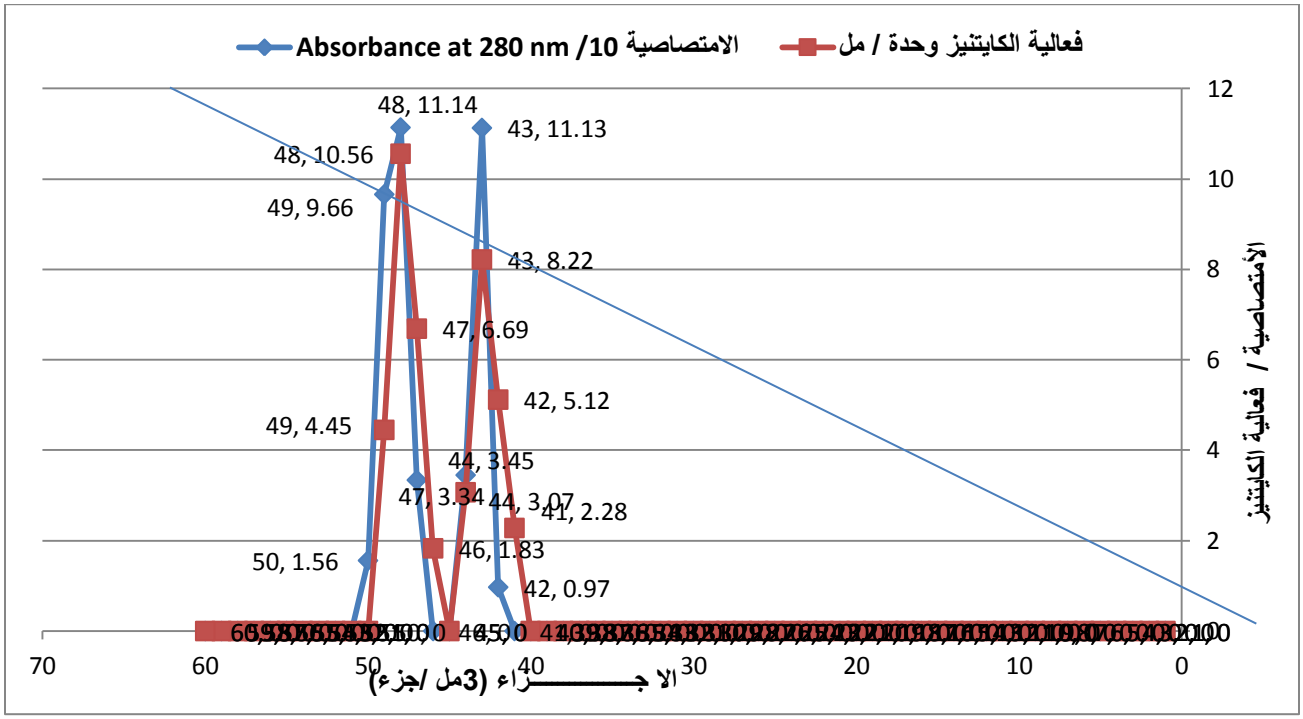
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

يبين الشكل (3) عملية فصل وتنقية إنزيم الكايتنيز في خطوة تنقية الإنزيم الأخيرة وذلك بإستخدام تقانة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بإستخدام المبادل الأيوني DEAE-Cellulose ويظهر من هذا الشكل وجود قمتين بروتينية فقط الأولى للأجزاء 42 و43 و44, والتي بلغت قيم الإمتصاصية عند طول موجي 280 نانوميتر فيها 0.097 و1.113 و0.345 على التوالي إذ ضمت هذه القمة فعالية إنزيمية للأجزاء 41 و42 و43 و44 والتي بلغت 2.28 و5.12 و8.22 و3.07 وحدة /مل على التوالي ,فيما أظهرت القمة الثانية فعالية بروتينية للأجزاء47 و48 و49 و50 إذ بلغت 0.334 و1.114 و0.966 و0.156 والتي ضمت فعالية إنزيمية للأجزاء 46 و47 و48 و49 إذ بلغت 1.83 و6.69 و10.56 و4.45 وحدة /مل على التوالي.

إن وجود قمتان من إنزيم الكايتنيز يؤكد إن هذا الإنزيم مؤلف من متناظرين إنزيميين , كما وأظهرت النتائج قمتين بروتينية فقط إحتوت ضمنها قمتان لإنزيم الكايتنيز بينما كانت هناك 16 قمة بروتينية في تقانة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي, وهذا يدل على إن خطوة التنقية بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني مهمة في إكمال تنقية إنزيم الكايتنيز إذ يعد وجود قمتين للكايتنيز فقط دليل نقاوة هذا الإنزيم

إن آلية التنقية بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني تختلف عن كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي إذ يعتمد الفصل في الأخيرة على الوزن الجزيئي في حين تعتمد الأولى على الشحنة الصافية net charge للإنزيمات أو البروتينات, وبما إن الشحنات التي تحملها الإنزيمات أو البروتينات تختلف بإختلاف نوع الإنزيم أو البروتين فيتم الفصل بدقة بعد الإسترداد بقوة أيونات ملح كلوريد الصوديوم .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/



شكل (3) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لإنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر *A. niger* K17 , إستخدام عمود المبادل الأيوني DEAE–Cellulose بأبعاد (19.5 × 1.5) سم ,أجري الغسل بمحلول متدرج التركيز من كلوريد الصوديوم (0–1) في محلول الفوسفات المنظم (pH7) بواقع 3 ميليلتر/ جزء

تبين النتائج في الجدول (1) خطوات تنقية إنزيم الكايتنيز من الفطر *A.niger* K17 وذلك بإتباع أربع خطوات للتنقية إذ بلغت الفعالية النوعية للإنزيم في الراشح الخام 0.37 وحدة /ملغ بروتين بفعالية كلية 134 وحدة وارتفعت الفعالية النوعية إلى 1.13 وحدة / ملغ بروتين . وعند الخطوة الثانية من التنقية بإستخدام الترسيب بكبريتات الأمونيوم 80% بحصيلة إنزيمية قدرها 34.85% وبعدد مرات تنقية بلغت 3.05 مرة . وعند الخطوة الثالثة من التنقية والتي أستخدمت فيها كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (Sephadex G–150) فقد أظهرت هذه الخطوة متناظرين إنزيميين رمز لهما بـ كايتنيز I وكايتنيز II بفعالية نوعية بلغت 3.9 و5.37 وحدة /ملغ بروتين بحصيلة إنزيمية 47.39 و53.28 % وبعدد مرات تنقية بلغت 10.54 و14.51 مرة على التوالي . أمّا في آخر خطوة من خطوات التنقية بإستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بإستخدام المبادل الأيوني(DEAE–cellulose) فقد إرتفعت الفعالية النوعية إلى 9.56 و14.08 وحدة /ملغ بروتين للمتناظرين

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

الإنـزيمين كـايتنيز I وكـايتنيز II كمـا وإرتفعـت الحصـيلة الإنزيميـة الى 61.34 و68.81% وبعـدد مـرات تنقيـة 25.84 و38.05 مرة .

جدول (1) خطوات تنقية إنزيم الكايتنيز المنقى من الفطر *A.niger* K1

خطوات التنقية		الحجم (مل)	فعالية الكايتنيز (وحدة /مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين)	فعالية الكايتنيز الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الانزيمية (%)
الراشح الخام		100	1.34	3.63	0.37	134	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم (80%)		10	4.67	4.12	1.13	46.7	3.05	34.85
كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (Sephadex G-100)	كايتنيز – I	10	6.35	1.63	3.9	63.5	10.54	47.39
	كايتنيز - II	10	7.14	1.33	5.37	71.4	14.51	53.28
كروماتوغرافيا التبادل الايوني (DEAE-cellulose)	كايتنيز – I	10	8.22	0.86	9.56	82.2	25.84	61.34
	كايتنيز - II	10	10.56	0.75	14.08	105.6	38.05	68.81

توافق الإنزيم مع المبيدات في نمو الفطرين

عند دراسة تأثير إنزيم الكايتنيز في الراشح الخام والراشح المرسب والمنقى للإنزيم المتناظرI وII مقارنة مع المبيد التيشيجارين في نمو الفطرين *R.solani* و*A.niger* أظهرت النتائج المبينة في الشكل (4) مايلي :

1. هناك تناقص طردي في نمو الفطرين إبتداءاً من الراشح الخام والراشح المرسب الى متناظرات الإنزيم I وII وقد أظهر مبيد التيشيجارين أدنى نمو للفطرين *R.solani* و*A.niger* بلغ 1.72 و5.61 سم على التوالي في حين بلغ أدنى تثبيط بفعل

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

كـلا المتنـاظرين I وII 4.66 و 2.86 للفطـرين *A.niger* و *R.solani* علـى التـوالي مقارنـة بالسـيطرة إذ بلـغ 7.6 و8.82 سم على التوالي .

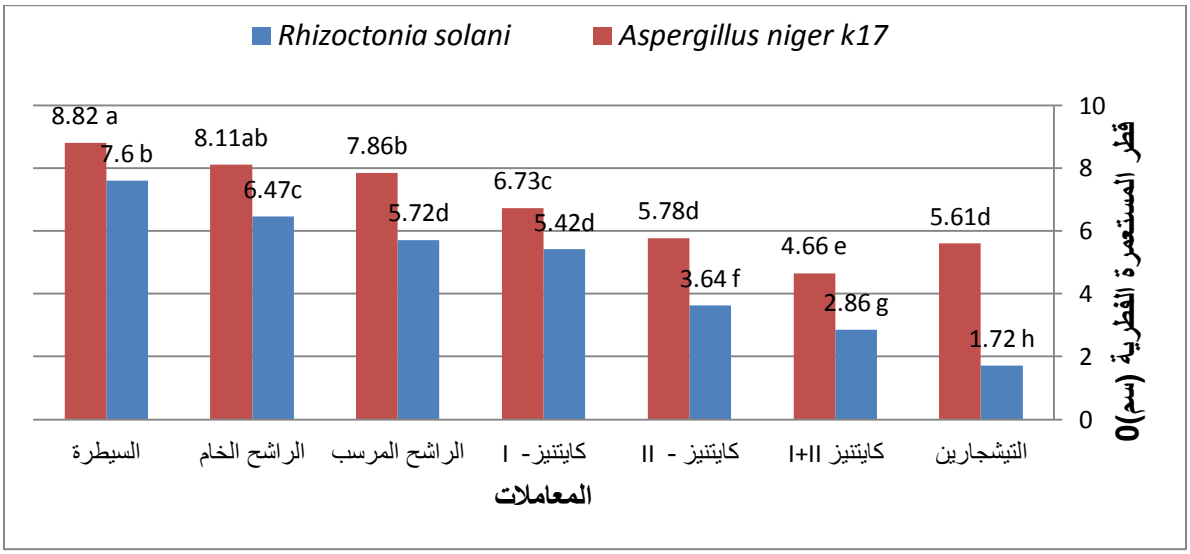
2. المتناظر كـايتنيز II أكثر فعالية مـن المتنـاظر I في تثبيط نمـو الفطر الممرض *R.solani* وبدرجة أقل ضد الفطر المنتج للإنزيم K17 *A.niger* وهذا يدل على أن المتناظرين I وII مختلفين بالتركيب والفعالية .

3. المتنـاظر II أكثر فعَّالية مـن المتنـاظر I في التثبيط والأخير أكثر فعالية مـن الراشـح المرسـب الـذي بـدوره أكثـر فعَّالية مـن الراشح الخام وهذا يدل على إن نقاوة الكايتنيز عامل مهم في الفعالية التثبيطية للفطرين وكان أعلى (بتفوق معنوي)للممرض *R.solani* مقارنة بالفطر المنتج للإنزيم K17 *A.niger* .

4.عند إستخدام خليط كلا المتناظرين I و II أدى إلى حدوث تثبيط أعلى (متفوق معنوياً) مقارنة بإستخدامهما كلا على حدة وهذا دليل اخر على إن كلا المتناظرين مختلفين بالتركيب والفعالية وحدوث تآزر بين كلا المتناظرين مما أدى إلى تثبيط أعلى وحسب هذه النتائج فقد تم إنتخاب كلا من متناظري إنزيم الكايتنيز معا والمبيد تيشيجارين وإختبارهما في التجربة الحقلية

*تشير الحروف الأبجدية المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية والحروف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية حسب إختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.05

شكل (4) توافق إنزيم الكايتنيز مع المبيدات في نمو الفطر الممرض *R.solani* والفطر المنتج للإنزيم K17 *A.niger*

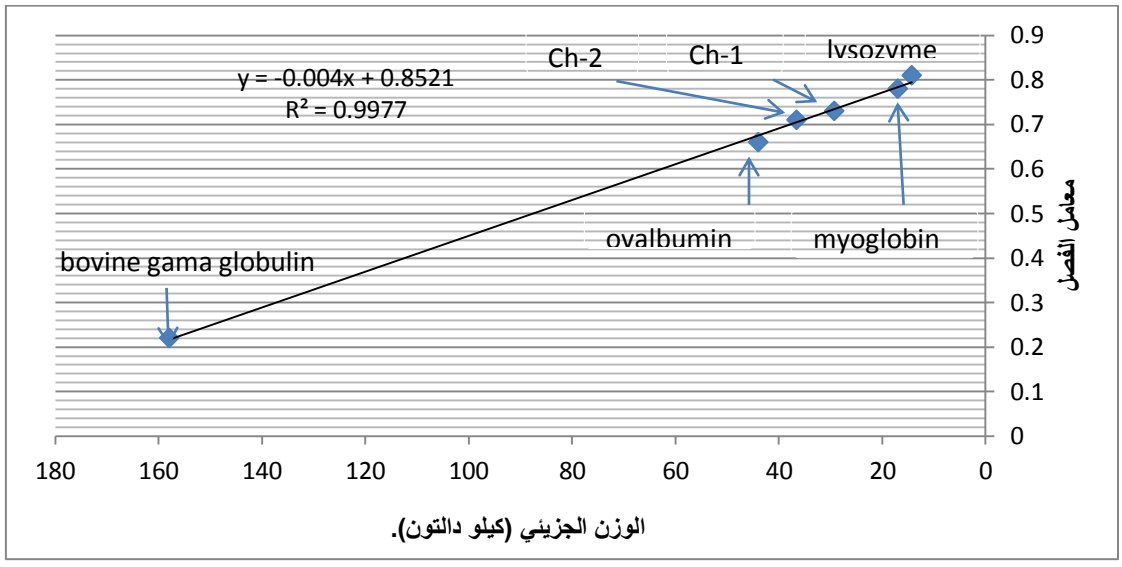


Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

خواص إنزيم الكايتنيز

تقدير الوزن الجزيئي بوساطة كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي

يبين الشكل (5) المنحنى القياسي الذي يوضح العلاقة بين قيمة الوزن الجزيئي لعدد من البروتينات القياسية ومعامل الفصل Kav وذلك بإستخدام الهلام Sephdex G-150 وعند مطابقة قيمة معامل الفصل لكل من الإنزيمين المتناظرين Ch-I و Ch-II المنقاة من الفطر *A.niger* K17 والتي بلغت 0.74 و 0.71 مع قيمة الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية وقد أظهرت النتائج إن قيم الوزن الجزيئي بلغت 29.3 و 36.6 كيلو دالتون لكلا متناظري الكايتنيز على التوالي . يعد الوزن الجزيئي إحدى الخصائص المهمة التي تميز الإنزيمات المختلفة وعند مقارنة الوزن الجزيئي لعدد من إنزيمات الكايتنيز المنقاة من الفطريات مثل الفطر (*Aspergillus* sp.) و (*Myrothecium anisopliae*) و (*Streptomyces* sp.) و (*Trichoderma harzianum*) و (*T.vieide*) و (*Verticillium lecanii*) يتضح إن متناظري الكايتنيز المنقاة من العزلة المحلية للفطر *A.niger* K17 هو إنزيم فريد من نوعه وتعد هذه الدراسة الأولى في القطر التي تميز إنتاج متناظرين لإنزيم الكايتنيز مغايرة لإنزيمات الكايتنيز المنقاة من الفطريات المدروسة في الدراسات السابقة . إن تباين الوزن الجزيئي يعطي صورة واضحة لتباين تركيب الإنزيم من عدد ونوع الأحماض الأمينية المؤلفة له .

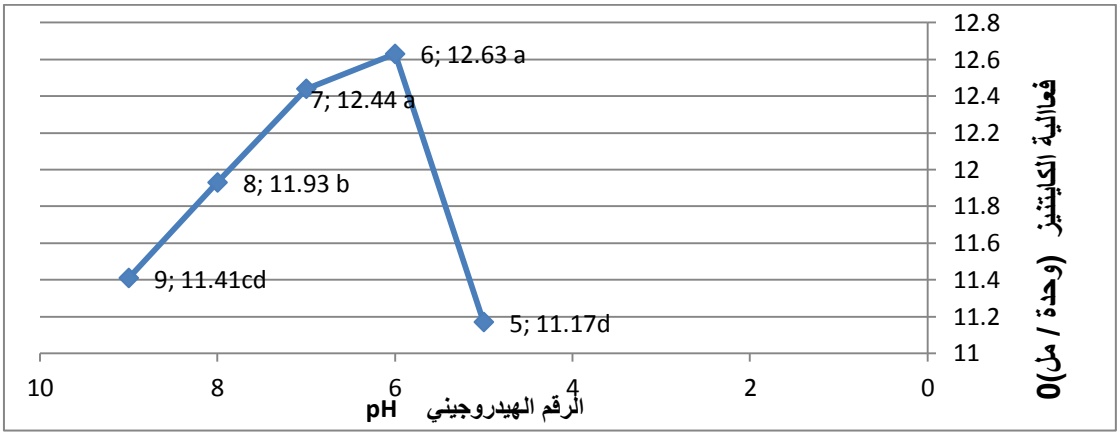


شكل (5) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

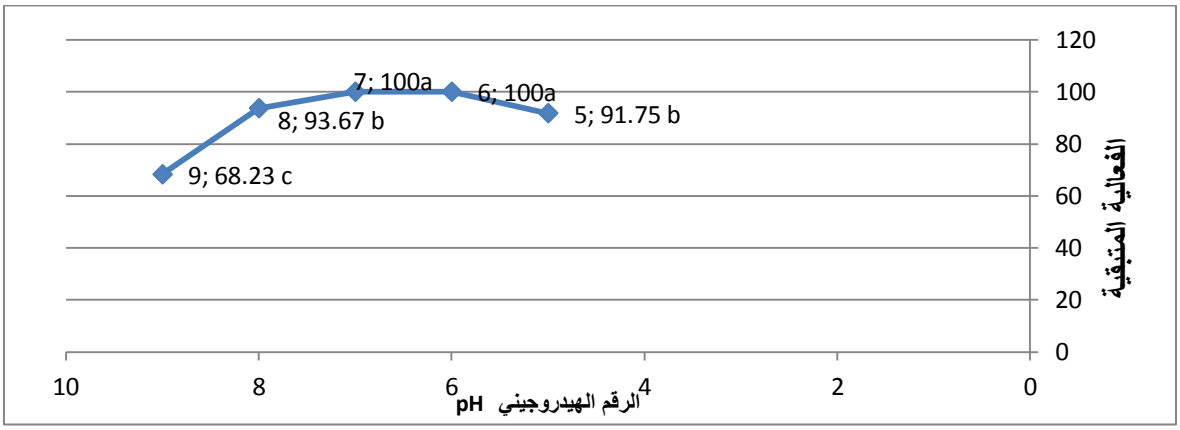
الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية وثبات إنزيم الكايتنيز

أظهرت النتائج المبينة في الشكل(6) إن أعلى فعَّالية إنزيمية سجلت في الرقم الهيدروجيني 6 و7 إذ بلغت 12.63 و12.44 وحدة / ميليلتر ,إذ لاتوجد فروق معنوية بين هاتين الفعاليتين ,كما سجل إنخفاض معنوي في فعالية الإنزيم عند قيم الرقم الهيدروجيني 8 و9 .



شكل (6) تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم الكايتنيز

كما بينت دراسة قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم إن الإنزيم أكثر ثباتا عند الرقم الهيدروجيني 6 و7 إذ كانت الفعالية المتبقية 100 لكلا القيمتين على التوالي في حين إنخفضت الفعالية الإنزيمية عند قيم الرقم الهيدروجيني 8 و9 إذ بلغت 93.67 و68.23 % على التوالي .(الشكل7)



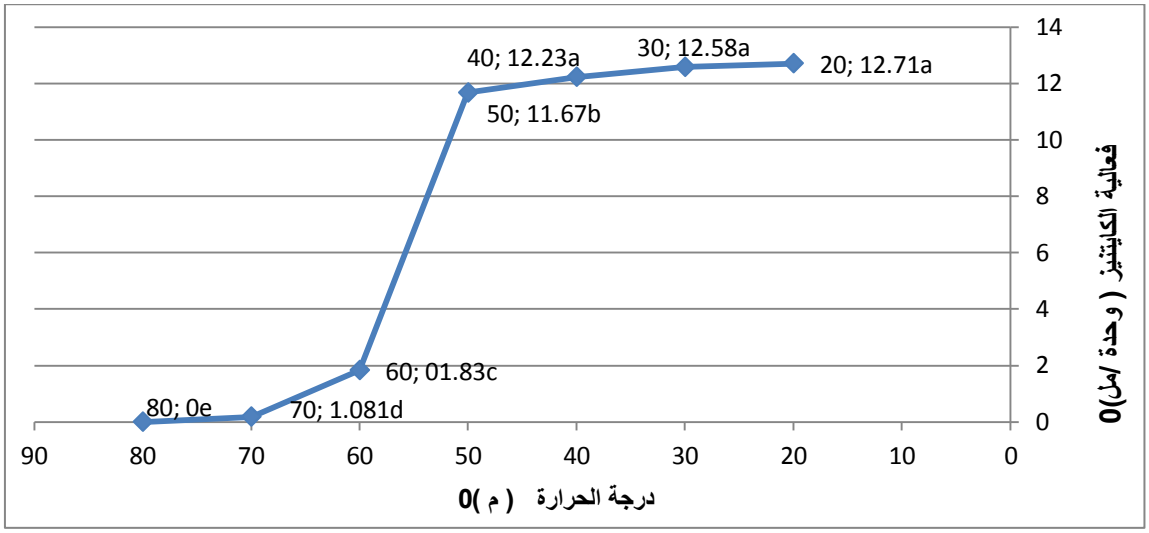
شكل(7) تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات إنزيم الكايتنيز المنقى من الفطر *A. niger* K17

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

ذكر حسن ,(2005) إن أهم أسباب إنخفاض الفعالية الإنزيمية يعزى إلى إحتمالية المسخ البروتيني في الظروف الحامضية والقاعدية وهذا يفسره وجود مجاميع جانبية لثمالات الأحماض الأمينية بأشكال غير ملائمة لإرتباط الإنزيم بالمادة الأساس , كما أن الصيغة الأيونية للمادة الأساس نفسها تتأثر بالرقم الهيدروجيني

درجة الحرارة المثلى للفعالية وثبات الإنزيم

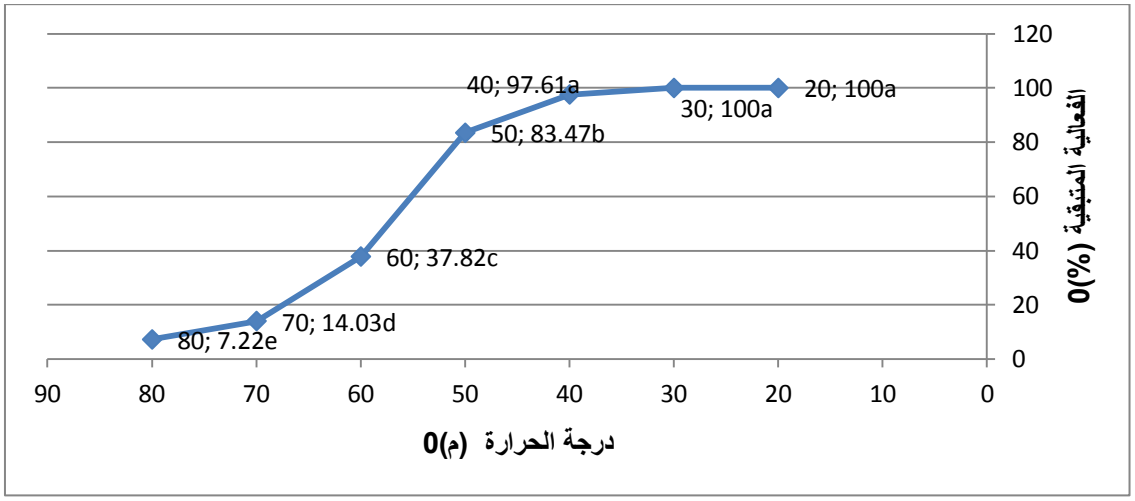
يبين الشكل (8) إن أقصى فعَّالية إنزيمية كانت عند درجات الحرارة 20 و30 و40°م والتي بلغت 12.71 و12.58 و12.23 وحدة /ميليلتر على التوالي إذ لاتوجد فروق معنوية بين هذه الدرجات ثم إنخفضت فعالية الإنزيم بشكل كبير عند إرتفاع درجة الحرارة الى 60°م , إذ بلغت 1.83 وحدة /ميليلتر.



شكل (8) تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم الكايتنيز المنقى من الفطر *A.niger* K17

أما عند دراسة الثبات الحراري للإنزيم أظهرت النتائج, إن الإنزيم ثابت بدرجة الحرارة 20 و30 و40 ثم بدأ الإنزيم يفقد جزءاً من فعَّاليته معنويا عند الدرجة 50°م إذ بلغت الفعالية المتبقية 83.47% في حين فقدت الفعَّالية بشكل سريع عند درجات الحرارة 60 و70 و80°م. (شكل9)

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/



شكل (9) الثبات الحراري لإنزيم الكايتنيز المنقى من الفطر *A.niger* K17

إن أهم أسباب إنخفاض فعالية الإنزيم في درجة 60°م أو الدرجات الأعلى من هذه الدرجة يعود إلى أن الإنزيم هو بروتين وعدم ثباته إذ تؤدي هذه الدرجات إلى مسخ البروتين أو هناك إحتمالية لحدوث تغيرات في التركيب الهندسي الفراغي للإنزيم وتؤدي كلتا الحالتين إلى فقدان فعاليته (Dixon وWebb, 1971).

التجربة الحقلية

أجريت تجربة حقلية لغرض تقييم فعالية كلاً من مبيد التيشيجارين وإنزيم الكايتنيز والفطر *A.niger* K17 في تحسين نمو النبات ومقاومة الفطر *R.solani*

معايير الإصابة

تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في شدة الإصابة (%) لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

من الجدول (2) تبين أن هناك تفوق معنوي لمعاملة مبيد التيشيجارين مع الفطر *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز في متوسط شدة الإصابة لأصناف الطماطة الثلاثة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض إذ بلغ متوسط شدة الإصابة 18.48%.

أمَّا تأثير الأصناف المدروسة فقد أبدى الصنف رشيدة أدنى متوسط لشدة الاصابة وبتفوق معنوي مقارنة بالأصناف الأخرى إذ بلغ 29.59% , أمَّا التداخل فقد سجل صنف الطماطة رشيدة أقل متوسط لشدة الاصابة وبتفوق معنوي مقارنة بالمعاملات والاصناف الاخرى إذ بلغ15.98% في المعاملة الثلاثية فيما بلغ أعلى متوسط لشدة الاصابة للصنف نون ضمن معاملة الفطر الممرض فقط إذ بلغ 90.67% .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

إن زيادة شدة الإصابة لمعاملة الفطر الممرض *R.solani* يعود إلى إفراز الفطر لإنزيمات محللة كإنزيم السليليز Cellulase والبكتنيز Pectinase وغيرها من الإنزيمات المهمة ذات التأثير السام مثل سم Phenyl acetic acid (PAA) كما ويعمل على إفراز بعض المركبات السامة التي تؤدي إلى قتل أجنة البذور كما ويعمل على إفراز إنزيمات محللة للسليلوز والكايتين والبروتين والتي تسبب تعفن البذور والجذور. أما إنخفاض نسبة وشدة الإصابة في معاملة إنزيم الكايتنيز والفطر المنتج للإنزيم ومبيد التيشيجارين يعود إلى إن إنزيم الكايتنيز يؤثر تأثير مباشر على الفطر الممرض فالإنزيم هو أحد إنزيمات التحلل المائي الذي يحلل بوليمر الكايتين وبذلك يعمل على تحلل الكايتين الموجود في جدر خلايا الفطر مما يؤدي لإضعاف الفطر وموته بسبب إختلال النفاذية وتعرض محتوى الخلية الفطرية للظروف البيئية المحيطة, أما الفطر *A.niger* K17 المنتج للإنزيم فله القدرة العالية على النمو والتنافس على الغذاء مع بقية الفطريات كما وله قدرة تضادية عالية مع العديد من الفطريات الممرضة للنبات مثل *R. solani* و *F.oxysporium* ويؤدي دور مهم في تشجيع نمو النبات إذ يعمل على إذابة الفوسفات وزيادة العديد من العناصر الغذائية الموجودة في التربة بصورة غير جاهزة للإمتصاص من قبل النبات كالفسفور والحديد والنحاس والزنك إذ إن وجود العناصر المعدنية ليس مهماً لتشجيع نمو النبات فقط وإنما مهم جداً في تشجيع إستحثاث المقاومة الجهازية للنبات ضد الممرضات كما وأثبتت دراسات عدة إن الفطر يشجع نمو بادرات الطماطة وأدى إلى زيادة أطوالها وأوزانها بشكل ملحوظ وتأثيره الإيجابي في تحسين معظم مؤشرات النمو في النبات أما مبيد التيشيجارين فهو ذو أثر منشط للنبات وفعال ضد العديد من المسببات الفطرية الممرضة وفعاليته تنشط بوجود أيونات الحديد والألمنيوم في التربة ويتحطم المبيد عند دخوله إلى النبات إلى نوعين من السكريات, سكريات على شكل أوكسجين لها فعالية مزدوجة تتمثل في تأثيرها ضد الفطريات المرضية وتأثير آخر منشط لنمو النبات ,وسكريات على شكل نتروجين وهي ليست فعالة ضد الفطريات ولكن منشطة لنمو النبات ايضا (C.P.D, 1995 ; حسون, 2005 ; راضي وآخرون ,2010)

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

جدول (2) تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في شدة الإصابة (%) لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

المعاملات	الاصناف			متوسط المعاملات
	رشيدة	نون	سان	
الفطر الممرض *R.solani*	88.71	90.67	84.71	88.03
Chitinase+ *R. solani*	23.25	28.04	26.06	25.78
R. solani + تيشيجارين	22.28	25.67	24.33	24.09
A. niger K17+ *R. solani*	24.05	31.18	26.33	27.19
Chitinase +*R. solani* +تيشيجارين	18.18	24.10	21.11	21.13
A. niger K17+ Chitinase +*R. solani*	23.25	26.04	25.07	24.78
A. niger K17+*R. solani* +تيشيجارين	21.02	26.02	23.06	23.37
A.niger K17+Chitinase +*R. solani* +تيشيجارين	15.98	20.85	18.60	18.48
متوسط الاصناف	29.59	34.07	31.16	
اقل فرق معنوي تحت مستوى 0.05	الاصناف=0.24 المعاملات= 0.40 الاصناف×المعاملات=0.69			

المعايير الإنتاجية

تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في إنتاجية النبات الواحد(غم) لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

يبين الجدول (3) أن متوسط إنتاجية النبات الواحد لأصناف الطماطة الثلاثة تحت ظروف الممرض في معاملة مبيد التيشيجارين مع فطر *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز كان له تفوق معنوي إذ بلغ 4101.38 غم في حين أن معاملة الفطر *R.solani* فقط بلغت أدنى إنتاجية إذ بلغت 2058.40 غم.

فيما يخص تأثير الأصناف المدروسة فقد سجل الصنف رشيدة أعلى إنتاجية وبتفوق معنوي مقارنة بالأصناف الأخرى إذ بلغ 4009.23 غم , أما التداخل بين الأصناف والمعاملات فقد سجلت معاملة مبيد التيشيجارين وفطر *A.niger* K17

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

وإنزيم الكايتنيز للصنف رشيدة أعلى إنتاجية إذ بلغ 4782.15 غم في حين بلغ أدنى متوسط للإنتاجية في معاملة الفطر الممرض فقط للصنف نون إذ بلغ 1640.98 غم.

جدول(3) تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في إنتاجية النبات الواحد(غم) لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

المعاملات	الاصناف			متوسط المعاملات
	رشيدة	نون	سان	
الفطر الممرض *R.solani*	2671.68	1640.98	1862.54	2058.40
Chitinase+ *R. solani*	3986.48	3386.46	3220.52	3531.15
R. solani + تيشيجارين	4087.72	3412.59	3552.04	3684.12
A. niger K17+ *R. solani*	3921.70	3314.55	3086.39	3440.88
Chitinase +*R. solani* +تيشيجارين	4431.75	3510.79	3770.71	3904.42
A. niger K17+ Chitinase +*R. solani*	4074.66	3406.52	3505.71	3662.30
A. niger K17+*R. solani* +تيشيجارين	4117.70	3473.38	3709.71	3766.75
A.niger K17+Chitinase +*R. solani* +تيشيجارين	4782.15	3559.62	3962.36	4101.38
متوسط الاصناف	4009.23	3213.11	3333.68	
اقل فرق معنوي تحت مستوى 0.05	الاصناف=0.66 المعاملات=1.08 الاصناف×المعاملات=1.87			

إن سبب تفوق معاملة إنزيم الكايتنيز والفطر المنتج للإنزيم ومبيد التيشيجارين في المعايير الإنتاجية يعود إلى إن إنزيم الكايتنيز هو أحد إنزيمات التحلل المائي الذي يحلل بوليمر الكايتين ويعزى سبب تأثيره ضد الفطر الممرض *R.solani* وذلك بوجود الكايتين في جدر خلايا هذا الفطر وإن تحلل الكايتين يؤدي إلى إضعاف أول عناصر حماية الفطر وهو الجدار الخلوي مما يؤدي إلى موت الفطر أما الفطر *A.niger* فله القدرة العالية على النمو والتنافس على الغذاء مع بقية الفطريات وله قدرة تضادية عالية مع العديد من الفطريات الممرضة للنبات مثل *R. solani* و *F.oxysporium* كما وله دور مهم في تشجيع نمو

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

النبات إذ يعد من الفطريات المذيبة للفوسفات ويعمل على زيادة العديد من العناصر الغذائية الموجودة في التربة بصورة غير جاهزة للإمتصاص من قبل النبات كالفسفور والحديد والنحاس والزنك وهذا بدوره يشجع إستحثاث المقاومة الجهازية للنبات ضد الممرضات (راضي وآخرون, 2010 ; Brzezinska و Jankiewicz , 2012 ; Aida و Taghred, 2014) .

أما مبيد التيشيجارين فهو ذو تأثير منشط للنبات وفعال ضد العديد من المسببات الفطرية الممرضة وفعاليته تنشط بوجود أيونات الحديد والألمنيوم في التربة ويتحطم المبيد عند دخوله إلى النبات إلى نوعين من السكريات, سكريات على شكل أوكسجين لها فعالية مزدوجة تتمثل في تأثيرها ضد الفطريات المرضية وتأثير آخر منشط لنمو النبات ,وسكريات على شكل نتروجين وهي ليست فعالة ضد الفطريات ولكن منشطة لنمو النبات أما إنخفاض المعايير الإنتاجية لمعاملة الفطر الممرض *R.solani* فيعود إلى قدرة الفطر على إفراز الإنزيمات المحللة ذات التأثير السام مثل سم Phenyl acetic acid (PAA) أو مشتقاته الهيدروكسيلية كما ويعمل الفطر على تعفن البذور وموت البادرات قبل وبعد البزوغ وهذا يعود إلى طبيعته التطفلية إذ يهاجم بذور العديد من العوائل النباتية مؤديا إلى تعفنها أو منعها من الإنبات بإفراز بعض المركبات السامة التي تؤدي إلى قتل أجنة البذور . (C.P.D, 1995 ; راضي وآخرون, 2010)

المعايير النوعية

تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في نسبة العصير (%) لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

يبين الجدول (4) بأن متوسط نسبة العصير للمعاملة الثلاثية المتضمنة مبيد التيشيجارين وفطر *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز قد تفوقت معنويا عن باقي المعاملات إذ بلغ متوسط نسبة العصير 62.88 % تلاه معاملة مبيد التيشيجارين وإنزيم الكايتنيز إذ كان متوسط نسبة العصير 63.78 % في حين بلغ متوسط نسبة العصير لمعاملة الفطر الممرض فقط 70.48 % , أما تأثير الأصناف فقد سجل الصنف سان أعلى متوسط لنسبة العصير وبتفوق معنوي عن باقي الأصناف المدروسة إذ بلغ 66.97 % . وفيما يخص التداخل فقد أعطى الصنف سان في معاملة الفطر الممرض أعلى متوسط لنسبة العصير إذ بلغ 70.77% فيما سجل الصنف رشيدة في المعاملة الثلاثية التي شملت مبيد التيشيجارين وإنزيم الكايتنيز والفطر *A.niger* K17 المنتج للإنزيم أقل متوسط لنسبة العصير إذ بلغ 62.48% .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

جدول (4) تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في نسبة العصير (%) لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

المعاملات	الاصناف			متوسط المعاملات
	رشيدة	نون	سان	
الفطر الممرض *R.solani*	69.62	71.06	70.77	70.48
Chitinase+ *R. solani*	66.77	67.52	67.37	67.22
R. solani + تيشيجارين	65.81	66.34	67.68	66.61
A. niger K17+ *R. solani*	66.70	67.69	68.11	67.50
Chitinase +*R. solani* +تيشيجارين	62.90	63.73	64.72	63.78
A. niger K17+ Chitinase +*R. solani*	65.81	66.74	67.42	66.66
A. niger K17+*R. solani* +تيشيجارين	64.91	64.73	66.71	65.45
A.niger K17+Chitinase +*R. solani* +تيشيجارين	62.48	63.22	62.94	62.88
متوسط الاصناف	65.63	66.38	66.97	
اقل فرق معنوي تحت مستوى 0.05	الاصناف=0.15		المعاملات=0.25	
	الاصناف×المعاملات=0.43			

يتضح من النتائج أعلاه ان معاملة الفطر الممرض أدت إلى أعلى إرتفاع في النسبة المئوية للعصير في حين أدت جميع المعاملات إلى تخفيض في هذه النسبة وعليه فإن صفة إرتفاع النسبة المئوية للعصير تعد صفة غير مرغوبة وذلك ربما يعزى سبب إرتفاع نسبة العصير الى سرعة النضج في ثمار الطماطة وعملية النضج السريع بحد ذاتها تعد عامل سلبي في حاصل الطماطة إذ يؤدي ذلك إلى سرعة تدهورها وإصابتها سواء بالممرضات أم بالأحياء المجهرية (فطريات وبكتريا) الرمية المعيشة . من ناحية أخرى إن النبات المصاب بشكل عام غالبا مايزداد فيه نسبة العصير والاخير يزيد من عملية النضج أكثر مقارنة بغير المصاب (عبدالهادي وآخرون ,2010)

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في الأملاح الكلية الذائبة(ملغ/لتر) لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

يبين الجدول (5) أن هناك تفوق معنوي لمعاملة مبيد التيشيجارين وفطر *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز في إنخفاض متوسط الأملاح الكلية الذائبة إذ بلغ متوسطها 1336.44 ملغم/لتر وتفوقت معنويا عن باقي المعاملات فيما بلغ أعلى متوسط الأملاح الكلية لمعاملة الفطر الممرض فقط 1774.07 ملغم/لتر. فيما يخص الأصناف الثلاثة المدروسة فقد أبدى الصنف نون أقل متوسط للأملاح الكلية الذائبة إذ بلغ 1290.57 , أما التداخل فقد تفوق الصنف نون معنويا في معاملة مبيد التيشيجارين وفطر *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز ومعاملة مبيد التيشيجارين وإنزيم الكايتنيز فقط تحت ظروف الإصابة بالممرض إذ بلغ متوسط المعاملات 1214.20 و1213.70 ملغم/لتر على التوالي بينما بلغ أعلى متوسط للأملاح الكلية الذائبة في معاملة الفطر الممرض فقط للصنف سان إذ بلغ 1931.45 ملغم/لتر.

تعد صفة زيادة محتوى الأملاح الكلية الذائبة غير مرغوبة لثمار الطماطة إذ بينت النتائج أن أعلى ذلك المحتوى كان في معاملة الفطر الممرض وقد أدت المعاملات إلى تخفيض في الأملاح الكلية الذائبة والسبب في ذلك يعود إلى إن الثمار المتضررة تفقد محتواها الرطوبي أعلى من الثمار السليمة , إن فقد المحتوى الرطوبي بالوقت نفسه يؤدي إلى زيادة في تركيز الأملاح الكلية الذائبة مما يزيد من محتواها وبالرغم من إن عملية التنفس المستمرة في الثمار تستهلك جزء من الأملاح الصلبة الذائبة الا إن ذلك الإستهلاك يعد الأقل مقارنة من فقدان الماء (Burton , 1982) .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

جدول (5) تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في الأملاح الكلية الذائبة (ملغ/لتر) لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

المعاملات	الاصناف			متوسط المعاملات
	رشيدة	نون	سان	
الفطر الممرض *R.solani*	1737.91	1652.85	1931.45	1774.07
Chitinase+ *R. solani*	1465.38	1256.73	1510.92	1411.01
R. solani + تيشيجارين	1431.76	1245.78	1502.87	1393.47
A. niger K17+ *R. solani*	1457.04	1262.73	1516.85	1412.20
Chitinase +*R. solani* +تيشيجارين	1324.69	1213.70	1493.94	1344.11
A. niger K17+ Chitinase +*R. solani*	1430.89	1258.04	1502.69	1397.21
A. niger K17+*R. solani* +تيشيجارين	1390.39	1220.54	1495.84	1368.92
A.niger K17+Chitinase+ *R. solani* +تيشيجارين	1253.95	1214.20	1541.17	1336.44
متوسط الاصناف	1436.50	1290.57	1561.97	
اقل فرق معنوي تحت مستوى 0.05	الاصناف=1.42 المعاملات=2.32 الاصناف×المعاملات=4.01			

تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في الرقم الهيدروجيني قبل الخزن لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

من الجدول (6) تبين أن أدنى متوسط للرقم الهيدروجيني سجل في معاملة مبيد التيشيجارين والفطر *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز ومعاملة مبيد التيشيجارين مع الإنزيم تحت ظروف الإصابة بالممرض إذ كان متوسط الرقم الهيدروجيني للمعاملتين 6.13 و6.14 على التوالي في حين كان متوسط الرقم الهيدروجيني في معاملة الفطر الممرض فقط 6.68 .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

أما تأثير الأصناف فقد سجل الصنف رشيدة أدنى متوسط للرقم الهيدروجيني وبدون تفوق معنوي عن الأصناف الأخرى إذ بلغ 6.30 , أما التداخل فقد أعطى الصنف رشيدة في المعاملة الثلاثية (معاملة مبيد التيشيجارين وفطر *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز)تحت ظروف الإصابة بالفطر *R.solani* أفضل متوسط للرقم الهيدروجيني تلاه متوسط معاملة المبيد مع الإنزيم تحت ظروف الإصابة إذ بلغ متوسط المعاملتين 6.06 و6.10 على التوالي في حين سجل الصنف نون والصنف سان أعلى متوسط للرقم الهيدروجيني إذ بلغ 6.70 لكلا الصنفين وبوجود الفطر الممرض .

جدول (6) تأثير عزلة الفطر المحلية *A.niger* K17 وإنزيم الكايتنيز المنقى منه والمبيد الكيميائي التيشيجارين في الرقم الهيدروجيني قبل الخزن لثلاثة أصناف من الطماطة تحت ظروف الإصابة بالفطر الممرض *R.solani*

المعاملات	الاصناف			متوسط المعاملات
	رشيدة	نون	سان	
الفطر الممرض *R.solani*	6.63	6.70	6.70	6.68
Chitinase+ *R. solani*	6.40	6.37	6.40	6.39
R. solani + تيشيجارين	6.30	6.30	6.30	6.30
A. niger K17+ *R. solani*	6.37	6.40	6.40	6.39
Chitinase +*R. solani* +تيشيجارين	6.10	6.13	6.20	6.14
A. niger K17+ Chitinase +*R. solani*	6.30	6.30	6.30	6.30
A. niger K17+*R. solani* +تيشيجارين	6.20	6.20	6.20	6.20
A.niger K17+Chitinase+ *R. solani* +تيشيجارين	6.06	6.16	6.16	6.13
متوسط الاصناف	6.30	6.32	6.33	
اقل فرق معنوي تحت مستوى 0.05	الاصناف=0.03		المعاملات=0.06	
	الاصناف×المعاملات=0.10			

تعبر قيم الرقم الهيدروجيني عن حالة الأوساط الحامضية والقاعدية والمتعادلة وبينت نتائج الدراسة الحالية, إن قيم الرقم الهيدروجيني للمعاملات كافة تميل إلى الحامضية إذ كانت أقل من 7 ومع ذلك يلاحظ أن هناك تباين في قيم الرقم الهيدروجيني بتباين المعاملات المختلفة . تعد صفة الحامضية الواطئة من الصفات غير المرغوبة إذ يدل ذلك على معدل تنفس سريع (سواء

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

كان بسبب عامل فسلجي وراثي يخص الصنف أم مرضي) وهذا يؤدي إلى نضج أسرع والأخير بدوره غير مرغوب في ثمار الطماطة .

إن إنخفاض نسبة الأحماض في ثمار الطماطة المعاملة بالفطر الممرض فقط يدل على أن الاحماض أستهلك جزء كبير منها بعملية التنفس المتسبب عن الإصابة مع كون ثمار الطماطة ذات خواص كلايمتيريكية Climacteric properties وتكون الأحماض العضوية أولى المركبات التي تستهلك بعملية التنفس (Morris و Kader, 1975) وعليه فإن جميع معاملات الدراسة الحالية وخاصة معاملتي (المبيد مع الممرض والإنزيم والفطر *A.niger* K17) و (الإنزيم مع المبيد والممرض) تعد أفضل المعاملات التي حافظت على الصفات النوعية لأصناف الطماطة .

المراجع : References

حسن, عبدالله عبدالكريم,(2005).إنتاج البروتيز المحلل للخثرة الدموية من الفطر *Pleurotus ostreatus* بوساطة تخمر الحالة الصلبة. إطروحة دكتوراه – كلية العلوم–جامعة بغداد.

حسن,عبدالله عبد الكريم ,الكرطاني,عبد الكريم عريبي,افتخار موسى,سعيد ،خلدون فارس(2011).تقيم فعالية الفطر *Pleurotus* sp. كمبيد حيوي ضد ممرضات النبات:الديدان الثعبانية وفطريات التربة.المؤتمر العلمي الخامس,كلية الزراعة,جامعة تكريت,26_27 نيسان.

حسون, إبراهيم خليل.(2005). المكافحة البايولوجية والكيميائية لمسبب مرض تقرح ساق البطاطا *Rhizoctonia solani* Kun . إطروحة دكتوراه , كلية الزراعة– جامعة بغداد .

راضي, وسام عدنان وعبدالكريم فراس شوكت وهاتف, دنيا حسين,(2010). دور الفطر *Aspergillus niger* في حماية محصول الطماطة من الإصابة ببعض الفطريات المرافقة له والفطر *Rhizoctonia solani* المسببة لمرض تعفن البذور وموت بادرات الطماطة *Lycopersici esculantum* (Mill) .مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة .2(1)

عبدالرحمن, سوسن مصطفى .(2009) .فصل وتنقية وتوصيف جزئي للايسوزائم من زهرة القرنابيط.مجلة العلوم الزراعية العراقية 40(2) :111-119.

عبدالهادي, عبدالإله مخلف ورستم, أديبة نجم وعبدالله, أياد وليد .(2010). أثر التغطيس تحت التفريغ بالجبرلين والبنزل أدنين في القابلية الخزنية للطماطة.مجلة العلوم الزراعية العراقية . 41(5):24-37.

Agrios , G.N. (2005). Plant Pathology. 5th Edition Academic Press . 635 p.

Aida, F. M. and Taghreed,A. S. (2014).Production,optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terrus*. Academic Journals.13(14):1567-1578.

Benites,T.;A.M.Rincon;M.C.Limon and Codon, A. (2004).Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strain .Interational microbiology. 7(4):249-260.

Brzezinska,M.S.and Jankiewicz U. (2012).Production of Antifungal chitinase by *Aspergillus niger* Lock 62 and Its Protential Role in the Biological control. Curr. Microbiol.65:666-672.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

Burton,W. G.(1982).Postharvest physiology of food crops.Longman, New York, 310PP.

C.P.D. (Crop Protection Department (1995), sankyo Co.ctd,Ginza) Japan.

Cooper,C.,(1977).The Tools of Biochemistry.John wily and Sons Inc.USA.

Damalas,C. A., and Koutroubas,S. (2016): Farmers' Exposure to Pesticides: Toxicity Types and Ways of Prevention. *Environmental Systems Research* J.; 4(1):1-10.

Dixon, M. and Webb, E. (1971).Enzymes ,2nd ed. William Clowes and Sons. London.

Estrella , A. H. and Chet, I. (1999).Chitin and chitinases (ed P. Jolles and R.A.A. Muzzarelli) BirkhauserVerlagBasel,Switzerlandpp.171-184.

Karthik, N., Akanksha K., Binod ,P. and Pandey A. (2014).Production, Purification and properties of fungal chitinases-Areview.Indian Journal of Expermental Biology.1025-1035.

Mckinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. J. Agric. Res. 26: 195-217.

Montealegre,J., Valderrama L., Sanchez. S., Herrera R. Besoain X . and Perez L .(2010).Biological conrol of *Rhizoctonia solani* in tomato with *Trichoderma harzianum* mutants.Electronic Journal of Biotechnology. 13(2):1-11.

Morris, L. L. and Kader A. A. (1975).Postharvest physiology of tomato fruits. Univ. Calif. Dept.Veg. Crops Ser. 171:36-48.

Ozby,N.and Newman, S.E.(2004).Biological control with *Trichoderma* Spp.with emphasis of *Trichoderma harzianum* .Pakistan Journal of Biological Sciences 7(4):478-484.

Papavizas, G.C.(1985). *Trichoderma and Gliocladium*, biology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, 32-54.

Savary S., Ficke A., Aubertot J.-N., Hollier C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. Food Secur. 4, 519–537

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

Verma,M., Brar, S.K., Tyagi,R.D., Surampalliand R.Y.and Valero J.R.(2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.;Panoply of biological Control. Biochemical Engineering Journal 37:1-20.