



الارتقاء بالبحوث العلمية طريقنا لخدمة المجتمع

عزل وتنقية البروتينات المضادة للفطريات من عزلات فطرية متنوعة وتقييم كفاءتها داخل

وخارج الجسم الحي

عبد الله عبد الكريم حسن¹ ، لينه قاسم محمد الدوري²

¹ قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

² قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

عزلت 17 عزلة فطرية من مناطق (تكريت و العلم و الدور و سامراء، بلد والدجيل) ضمن محافظة صلاح الدين، اظهرت النتائج المختبرية ان الفطر *F. roseum* المعزول من منطقة العلم في محافظة صلاح الدين أكثر الفطريات تثبيطاً لنمو الفطر الممرض *F. solani* المسبب لمرض تعفن الجذور اذ بلغت منطقة التثبيط 3.75 ملم والذي اظهر تفوقاً معنوياً مقارنة بالفطريات الأخرى، ويليه كل من الفطر *F. oxysporum* و *Mucor microspores* و *A. fumigatus* و *Monilia* و *Candida sp.* و *A. oryzae*، اذ بلغ معدل التثبيط 3.2 و 3 و 2.75 و 2.75 و 2.1 و 2 ملم على التوالي. تم فصل وتنقية 16 بروتين من راشح الفطر *F. roseum* باستخدام تقانة كروماتوغرافيا التبادل الايوني [المبادل EDTA cellulose]، بلغت أقصاها امتصاصية 0.81 نانوميتر للجزء المفصول 47 يليها 0.73 نانوميتر للأجزاء 25 و 29 على التوالي، في حين بلغت أدنى امتصاصية هذه القمم 0.02 نانوميتر في الجزء 65. وعند تقدير تثبيط نمو الفطر الممرض *F. solani* لكافة الأجزاء المفصلة أظهرت النتائج ان هناك 9 بروتينات مثبطة لنمو الفطر كانت للأجزاء 18، 21، 27، 29، 33، 37، 43، 47، 59، اذ بلغت نسبة تثبيط نمو الفطر الممرض 41.13 و 48.16 و 37.26 و 81.41 و 53.2 و 71.38 و 76.12 و 82.04 و 49.07%، على التوالي. وعند تشخيص البروتينات المضادة لنمو الفطر الممرض، أظهرت النتائج ان عائدية البروتينات المضادة للفطريات في الأجزاء 18 و 21 و 27 و 29 و 37 و 47 و 59 كانت لأنزيمات اوكسيداز متعدد الفينول Polyphenol oxidase و البيروكسيداز Peroxidase و مثبط البروتين Chitinase-I و Protease inhibitor و البروتينز Protease و متناظرين لأنزيم الكايتيناز Chitinase-I و 2 و Chitinase و الكلوكانيز glucanase، اذ بلغت الفعالية النوعية لهذه البروتينات 17.63 و 8.11 و 28.93 و 18.66 و 24.47 و 27.41 و 12.81 وحدة انزيمية /ملمغ بروتين على التوالي. واطهرت النتائج أيضا ان كل من الأجزاء 33 و 43 والتي سجلت نسب تثبيط لنمو الفطر الممرض و *F. solani* بقيمة 53.2 و 76.12% لكنها لم تظهر أي فعالية انزيمية وعدت كبروتينات مضادة لنمو الفطريات AFP1 و AFP2 على التوالي.

معلومات البحث

الكلمات المفتاحية: مرض تعفن الجذور، نبات الباقلاء، المكافحة الإحيائية، البروتينات المضادة للفطريات AFPs، *F.solani*

الاسم: عبد الله عبد الكريم حسن

البريد الإلكتروني:

drabdullah.has67@tu.edu.iq

رقم الهاتف:

المقدمة

أغلب المناطق الزراعية في العراق، إذ بلغت المساحة المزروعة فيه لعام 2012 حوالي 58600 دونماً وكمية الإنتاج 114600 طناً [3] لهذا النبات أهمية في تحسين صفات التربة من خلال تثبيته للنتروجين الجوي في العقد الجذرية بالتعايش مع بكتريا *Rhizobium sp.* التي

يعود محصول الباقلاء (*Vicia faba* L) الى العائلة البقولية (Fabaceae) وهو أحد المحاصيل الشتوية المهمة من الناحية الاقتصادية في العديد من بلدان العالم ويأتي بالمرتبة الثانية بعد العائلة النجيلية في الأهمية الاقتصادية [1] و[2]. يزرع نبات الباقلاء في

1- عزل وتشخيص عزلات فطرية من بعض مناطق محافظة صلاح الدين.

2- تنقية وتشخيص البروتينات المضادة للفطريات AFPs من رواشح الفطريات المعزولة.

3- اختبار AFPs ضد الفطر الممرض *F. solani* مختبريا بالمقارنة مع أحد المبيدات الكيميائية.

المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة المختبرية في مختبرات قسم علوم الحياة -كلية العلوم، وفي مختبرات قسم وقاية النبات -كلية الزراعة -جامعة تكريت ونفذت التجربة الحقلية في أحد الحقول الزراعية في منطقة الدور للموسم 2017-2018. اما الدراسة المسحية الخاصة بجمع العينات فشملت مناطق مختلفة من محافظة صلاح الدين.

جمع العينات

جمعت العينات من ترب في مواقع مختلفة من حديقة كلية العلوم وسماذ عضوي متخمّر وسماذ متحلل في كلية الزراعة -جامعة تكريت وترب حقلية في منطقة الدور والعلم وبلد والدجيل وسامراء في محافظة صلاح الدين للعام (2016-2017) للفترة من شهر أيلول ولغاية تشرين الثاني لغرض عزل الفطريات الموجودة في التربة وتشخيصها بأخذ ثلاث عينات من كل موقع ووضعت في أكياس بلاستيكية تم غلقها بإحكام وسجل عليها موقع وتاريخ الجمع ونقلت الى المختبر ووضعت في الثلاجة لغرض الحفظ لحين اجراء العزل والتشخيص.

العزل من التربة بطريقة التخفيف Dilution plate method

استخدمت طريقة التخفيف المتسلسلة لعزل الفطريات من التربة، بأخذ 10 غم تربة جافة ووضعت في دورق سعة 250 مل يحتوي على 90 مل ماء مقطر معقم. رجّت جيدا بوساطة هزاز Shaker لمدة ثلاث دقائق، إذ عد التخفيف الأول 10^{-1} وبعدها أخذ 1 مل منه واضيف الى انبوبة تحتوي 9 مل ماء مقطر ومعقم ليصبح التخفيف الثاني 10^{-2} وحضر منها تخافيف متسلسلة لغاية التخفيف 10^{-4} ثم أخذ 1 مل من كل تخفيف بوساطة ماصة دقيقة معقمة ووضع في اطباق بتري بثلاث مكررات ثم صب الوسط الزرعي [MEA] عليها المحضر والمعقم والمبرد وحرك الطبق بصورة دائرية لضمان التجانس وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ \text{C}$ لمدة 3-5 ايام مع المتابعة الدورية للأطباق. [14]

تشخيص الفطريات

بعد انتهاء مدة التحضين اخرجت الاطباق المحتوية على المستعمرات الفطرية المختلفة من الحاضنة ونقيت المستعمرات كلاً على حدة عن طريق أخذ جزء من حافة المستعمرة ونقلها إلى اطباق بتري وحضنت الأطباق بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ \text{C}$ لمدة 3 ايام ثم شخصت الفطريات على مستوى الجنس وبعضها على مستوى النوع، وذلك بالاعتماد على شكل المستعمرة والابواغ وتركيب الحوامل والتراكيب الأخرى التي يكونها الفطر وفق الأسس التصنيفية المعتمدة [15].

تحفز تكوين تلك العقد الجذرية. لذا فهو يدخل في التعاقب المحصولي [الدورة الزراعية] لتحسين خواص التربة، فضلاً

عن احتواء الباقلاء نسبة عالية من البروتينات وعلى بعض الفيتامينات مثل: A و B1 و B3 وعدد من العناصر المعدنية مثل الكالسيوم والحديد والفسفور والبوتاسيوم [4].

تصاب الباقلاء بالعديد من الامراض الفطرية واهمها مرض تعفن الجذور وقواعد السيقان والذي يعد من الامراض ذات التأثير الكبير في محصول الباقلاء في العديد من مناطق العالم [5]، ففي السنوات الأخيرة لوحظ انخفاض في معدلات الإنتاج في محصول الباقلاء في العراق إذ بلغ الإنتاج في سنة 2000 بحسب ما أشار اليه المركز الاحصائي السنوي حوالي 221524 طن اما في سنة 2011 فقد بلغ الإنتاج 154400 طناً و في عام 2012 فبلغ الإنتاج 114600 طناً وان هذا الانخفاض في الإنتاج يعود الى أسباب كثيرة ومن ابرز هذه الأسباب هو الإصابة بالعديد من مسببات المرضية للنبات التي تتواجد في التربة واهمها فطريات *Fusarium sp.* و *Rhizoctonia solani* و *Pythium sp.* و *Macrophomina phaseolina* ، إذ تقوم هذه الفطريات بمهاجمة البذور والبادرات وجذور هذا المحصول مسببة تعفنه مما يؤدي الى حدوث خسائر كبيرة في الإنتاج [6] ، وتستخدم لمقاومة هذا المرض طرق عدة فيزيائية وكيميائية وإحيائية والأكثر شيوعاً هي استخدام المبيدات والمبخرات الكيميائية . ونظراً لما تسببه المبيدات الكيميائية من تلوث بيئي ومخاطر للإنسان والنبات والحيوان عبر السلسلة الغذائية وكذلك ظهور الآفات المقاومة فهي تعد غير مقبولة بيئياً [7]. لذلك فمن الضروري البحث عن طرائق بديلة تحل محل المبيدات الكيميائية تكون أكثر أماناً وغير مكلفة وصديقة للبيئة ومن بين اهم هذه الطرائق هو استخدام الطرائق الاحيائية مثل استخدام الأصناف المقاومة [8]، فضلاً عن استخدام الاحياء المقاومة للمسببات المرضية مثل فطريات *Trichoderma sp.* [9] التي نجحت كبديل للمبيدات الكيميائية، وفطريات المايكورايزا الحويصلية الشجرية *Vascular Arbuscular Mycorrhiza* مثل الفطر *Glomus intraradices* [10] ، الفطر *Pleurotus sp.* [11]. كما وأدت رواشح الاحياء المقاومة وبخاصة الفطريات منها الى نسب متفاوتة في تثبيط مسببات المرضية [12]، لاحتواء رواشح الفطريات على المواد المثبطة للنمو مثل المضادات الحيوية والسموم الفطرية والاحماض العضوية والانزيمات الهاضمة و تعد البروتينات المضادة لنمو الفطريات [AFP] Anti-Fungal Proteins من العوامل المهمة التي اثبتت دورها في تثبيط العديد من انواع الفطريات الممرضة للإنسان والحيوان والنبات [13].

نظراً لأهمية الخسائر التي تسببها امراض تعفن جذور الباقلاء ولعدم وجود دراسة سابقة في الفطر لتنقية وتشخيص AFPs من الفطريات وللبحث عن طرائق مقاومة تتسجم مع التوجهات الحديثة في العالم في التقليل من استعمال المواد الكيميائية في الزراعة فقد أجريت هذه الدراسة التي تهدف الى:

تنقية وحفظ العزلات الفطرية

تم تنقية العزلات الفطرية وذلك بنقل أجزاء من طرف كل مستعمرة بواسطة ابرة معقمة الى اطباق بتري حاوية على الوسط الزراعي MEA المعقم وحضنت الاطباق في درجة حرارة $25 \pm 2^\circ \text{C}$ لمدة سبعة أيام بعدها نقلت أجزاء من المستعمرات الفطرية كلاً على انفراد بواسطة ابرة معقمة إلى أنابيب إختبار تحتوي على الوسط الزراعي MEA المعقم المائل Slant المعامل بالمضاد الحيوي Cloxacillin وحضنت الأنابيب في درجة حرارة $25 \pm 2^\circ \text{C}$ لمدة سبعة أيام ومن ثم نقلت إلى الثلجة بدرجة حرارة $4-5^\circ \text{C}$ وحفظها لحين الاستعمال في الاختبارات اللاحقة.

تنمية الفطريات المعزولة في الوسط السائل PDB.

نميت الفطريات المعزولة في وسط مرق البطاطا المغذي PDB المعقم بحجم 100 مل من الوسط إذ لقح بلقاح عزلات الفطريات كلاً على انفراد بمعدل خمسة أقراص، قطر 0.5 سم لكل عذلة ووضعت الدوايق في الحاضنة على درجة حرارة $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ولمدة 3-7 أيام لحين اكتمال النمو.

استخلاص الراشح الفطري

بعد إتمام النمو رشحت المزارع الفطرية السائلة باستخدام ورق الترشيح (Whatman -1) في قمع بخنر وجمع الراشح في انابيب معقمة وحفظت في الثلجة بدرجة 4°C لحين اجراء التجارب اللاحقة عليها.

اختبار فاعلية رواشح الفطريات في تثبيط الفطر الممرض *F. solani*

استخدمت طريقة التخطيط في دراسة تأثير رواشح الفطريات المعزولة في الفطر الممرض *F. solani*، إذ لقحت أوساط MEA في اطباق بتري وذلك بنقل قرص قطره 0.5 سم من حافة المستعمرة الفطرية [حديثاً النمو] بواسطة ثاقب الفلين في مركز الطبق ونقل 0.1 مل من راشح كل فطر وتم نشره بشكل خط طوله 3 سم وبواقع أربعة خطوط حول مستعمرة الفطر على مسافة 2 سم واستخدم الماء المقطر للتخطيط بالطريقة نفسها [سيطرة]، وحضنت الاطباق بدرجة 25°C لمدة 3 أيام وتم قياس منطقة التثبيط [إن وجدت] بين خط راشح الفطر وحافة مستعمرة الفطر الممرض *F. solani*.

تنقية البروتينات المضادة للفطريات

تم اختيار راشح الفطر الأكثر كفاءة (*F. roseum*) الذي اعطى أعلى كفاءة في تثبيط نمو الفطر الممرض وتمت تنقية البروتينات المضادة للفطريات بحسب [16] بإجراء الخطوات الآتية:

الترسيب بكبريتات الامونيوم

رسب المحلول بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 80% إذ اضيف 53.2 غم لكل 100 مل من محلول البروتينات في بيكر مع الاستمرار بالتحريك الى ان تم اذابته بالكامل ووزعت على انابيب اختبار ونبذت بجهاز الطرد المركزي بواقع 5000 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق وبعدها تم التخلص من الراشح العلوي والاحتفاظ بالمحلول الخام المترسب في انابيب الاختبار.

الفرز الغشائي Dialysis

أنجزت هذه الخطوة بوضع محلول البروتينات الناتج من الخطوة السابقة في أكياس الديليزة بحجم طرد وزن جزيئي 14 كيلودالتون من شركة Guangzhou Zhenrui للأدوات الطبية ضد الماء المقطر بدرجة 4°C لمدة 24 ساعة مع تبديل الماء المقطر عدة مرات من اجل ازالة الاملاح من الخليط وأجريت له الفحوصات اللازمة.

كروماتوغرافيا التبادل الايوني

اضيف 10 مل من المحلول الناتج عن عملية الفرز الغشائي واجري الاسترداد elution باستخدام محلول متدرج التركيز من كلوريد الصوديوم [0-1] في محلول الفوسفات المنظم [pH7] وجمعت الأجزاء من العمود بواقع 3 مل/ جزء في انابيب اختبار وقدرت الامتصاصية عند 280 نانوميتر، فضلاً عن تقدير فعالية بعض الانزيمات والكفاءة التثبيطية لنمو الفطر الممرض *F. solani* لكل جزء.

تقدير الفعالية الانزيمية

قدرت فعالية بعض الانزيمات في الأجزاء المفصولة بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني والتي شملت تقدير البروتينات المضادة للفطريات وهي فعالية المحتوى البروتيني الكلي وانزيم البيروكسيداز Peroxidase وفعالية Polyphenol oxidase وفعالية البيتا-كلوكانيز β -glucanase وفعالية الكايتيناز Chitinase وفعالية Protease وفعالية مثبط البروتينز Protease inhibitor.

تقدير البروتينات الكلية

لتقدير البروتينات في المحلول استخدمت طريقة بايوريث، إذ اضيف 1 مل من الراشح الفطري في انابيب اختبار ثم اضيف اليها 4 مل من محلول بايوريث مزجت جيداً وحضنت بدرجة حرارة 37°C لمدة 20 دقيقة وقيست بعد ذلك الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على الطول الموجي 540 نانوميتر، ثم قدر تركيز البروتين اعتماداً على المنحنى القياسي لتركيز البروتين [17].

تقدير فعالية إنزيم البيروكسيداز Peroxidase

قدر انزيم البيروكسيداز حسب طريقة [18] من خلال قياس الامتصاصية على طول موجي 470 نانوميتر لخليط التفاعل المكون من 2.5 مل محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 او 0.1 مل من المستخلص البروتيني لكل معاملة وعرفت الوحدة الانزيمية بالتغير في الامتصاصية بمقدار 0.01 لكل دقيقة ثم قدرت الفعالية النوعية للأنزيم [وحدة/ ملغ بروتين] حسب المعادلة التالية:

الفعالية النوعية [وحدة/ملغ بروتين] = الفعالية الانزيمية [وحدة/مل] / تركيز البروتين [ملغ/مل] [19].

تقدير فعالية انزيم Polyphenol oxidase

تم تقدير فعالية انزيم بولي فينول اوكسيداز من خلال قياس الامتصاصية على الطول الموجي 470 نانوميتر لخليط التفاعل المتكون من 2.5 مل محلول chatechol و 0.1 مل من المستخلص البروتيني لكل جزء [20] وعرفت الوحدة الانزيمية بالتغير الحاصل في

تقدير الفعالية المضادة للفطر الممرض *F. solani*

قدرت الفعالية المضادة للفطر الممرض *F. solani* لكل جزء من الأجزاء المفصولة بطريقة الأوساط المسمومة [Poisonous plate method] بوضع 0.5 مل من المحلول البروتيني في 50 مل من الوسط [التركيز 1%]، ثم لقت الأوساط بالفطر الممرض بنقل قطعة من المستعمرة الفطرية على وسط MEA المسموم في مركز الطبق ووضعت الاطباق في الحاضنة لمدة 3 أيام وقدرت نسبة التثبيط حسب المعادلة الآتية:

النسبة المئوية للتثبيط = قيمة السيطرة - قيمة المعاملة / قيمة السيطرة $\times 100$ [23].

النتائج والمناقشة

عزل الفطريات وتشخيصها واختيار الفطر الأكثر تثبيطاً لنمو الفطر

الممرض *F. solani*

تم عزل 17 فطرا والتي شملت *A. clavati* و *A. fumigatus* و *A. niger* و *F. roseum* و *F. oxysporum* و *Cladosporium* و *sp.* و *F. ventricosum* و *T. viride* و *Candida sp.* و *Verticillium dahlia* و *Mucor microspores* و *Rhizoctonia solani* و *Rhizopus stolonifera* و *Monilia sp.* و *A. oryzae* و *A. carbommarum* و *Penicillium sp.* من التربة والاسمدة العضوية المتحللة من مناطق مختلفة من محافظة صلاح الدين والتي شملت [تكريت، العلم، الدور، سامراء، بلد، والدجيل]. ان جميع الفطريات المعزولة هي اختيارية المعيشة، اذ تم عزلها وتتميتها في الأوساط الغذائية الصناعية في المختبر وفي حال تواجد العائل النباتي المناسب فتقوم بمهاجمته واحداث المرض [24]. واوضحت النتائج المبينة في الشكل [1] ان هناك تبايناً واضحاً بين العزلات الفطرية المثبطة لنمو الفطر الممرض *F. solani* وبين الشكل نفسه ان الفطر *F. roseum* المعزول من منطقة العلم في محافظة صلاح الدين أكثر الفطريات تثبيطاً لنمو الفطر الممرض اذ بلغ معدل التثبيط 3.75 ملم والذي اظهر تفوقاً معنوياً مقارنة بالفطريات الأخرى، ويليه كل من الفطر *F. oxysporum* و *Mucormicrospores1* و *A. fumigatus* و *Monilia sp.* و *Candida sp.* و *A. oryzae* ، اذ بلغ معدل التثبيط 3.2 و 3 و 2.75 و 2.75 و 2.1 و 2 ملم على التوالي. قد يعزى سبب التثبيط بواسطة الفطريات التي أبدت تأثيراً تثبيطياً إلى إنتاجها المركبات السامة [السموم الفطرية] أو إنزيمات هاضمة تحلل مكونات خلية الفطر الممرض أو قد تنتج المضادات الفطرية المختلفة سواء كانت الفينولية [الحلقية] أو القلويدية أو بيهأ البروتينات المضادة للفطريات او قد تفرز الحوامض التي تخفض من الرقم الهيدروجيني للوسط مما يؤدي الى عرقلة نمو الفطر الممرض ان التباين في انتاج هذه المثبطات يعود بالدرجة الرئيسية الى التركيب الوراثي للعزلات الفطرية ، إذ إنّ الفطريات غالباً ما تكون متغايرة وراثياً مما ينتج عنه تباين في كثير من الصفات الفسلجية والمظهرية، ويعزى سبب انتاج مثبطات النمو المختلفة من قبل معظم

الامتصاصية بمقدار 0.01 لكل دقيقة ثم حسبت الفعالية النوعية للإنزيم حسب المعادلة السابقة.

تقدير فعالية إنزيم β -glucanase

يتكون مزيج التفاعل لتقدير إنزيم البيتا كلوكانيز من إضافة 1مل من محلول B-glucan إلى 1مل من المستخلص الأنزيمي ثم يحضن المزيج على درجة حرارة 35° م في حمام مائي لمدة 40 دقيقة ثم يؤخذ 1 مل من المزيج بعد التحضين ويضاف اليه 1مل من محلول DNS ويعقبه التسخين بالحمام المائي على درجة حرارة 100° م لمدة 5 دقائق بعدها اجري تبريد سريع للأنايبب واضيف 2مل ماء مقطر وقيست الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر، لاستخراج فعالية الأنزيم وحدة /مل تم اعتماد المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز عن طريق معادلة الخط المستقيم ، يعبر عن الفعالية الأنزيمية بالوحدات اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من الكلوكوز لكل مل بالدقيقة الواحدة ثم قدرت الفعالية النوعية للأنزيم [وحدة /ملغ بروتين]. [21].

تقدير فعالية إنزيم Chitinase

قدر هذا الانزيم حسب طريقة [22] بإضافة 1 مل من محلول الكايتين الى 1 مل من المستخلص البروتيني لكل جزء من الأجزاء وتم تحضين المزيج في حمام مائي بدرجة 37° م لمدة ساعتين ونبذ بالطرد المركزي 2000 دورة بالدقيقة لمدة دقيقتين فقط للتخلص من الشوائب ثم اخذ 1 مل من المستخلص بعد الطرد المركزي واضيف اليه 1 مل من DNS وترك المزيج داخل حمام مائي 100° م لمدة 5 دقائق بعدها تم تبريد الانايبب وقيست الامتصاصية على طول موجي 540 نانوميتر. اعتمد المنحنى القياسي لسكر N-Acetyl glucose amine في تقدير الفعالية الانزيمية اذ تم تعريف الفعالية الانزيمية بانها كمية الانزيم اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من سكر N-Acetyl glucose amine في الدقيقة الواحدة وحسب ظروف التفاعل.

تقدير فعالية البروتيز Protease

قدرت فعالية البروتيز عن طريق إضافة 1 مل من الراشح الفطري الى 9 مل من محلول الفوسفات المنظم pH8 وحضنت اناييبب الاختبار في حمام مائي بدرجة حرارة 37° م لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء الوقت المحدد تم اخراج الاناييبب من الحمام المائي واطافة 2 مل من ثلاثي كلور حامض الخليك [TCA] لغرض ايقاف التفاعل ثم نبذ الخليط في جهاز الطرد المركزي 6000 دورة/ دقيقة لمدة 3 دقائق للحصول على رائق التفاعل الذي تم قياس امتصاصيته في جهاز UV-spectrophotometer على طول موجي 280nm وعرفت الفعالية الانزيمية بتغير الامتصاصية عند 0.01 خلال الدقيقة الواحدة [19].

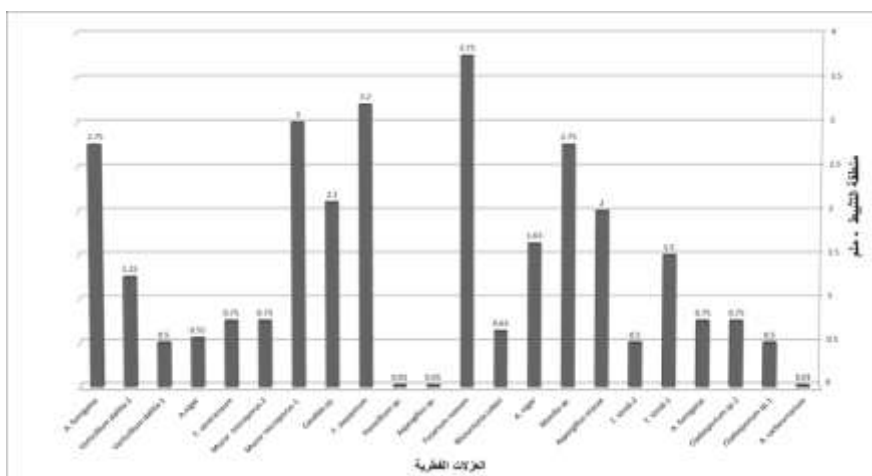
تقدير فعالية إنزيم مثبط البروتيز Protease inhibitor

استخدمت الفعالية المتبقية للإنزيم كمؤشر لتقدير مثبط البروتيز كما في المعادلة الآتية:

$$\text{فعالية مثبط البروتيز [\%]} = \frac{\text{فعالية الإنزيم بالمعاملة [وحدة/مل]} - \text{فعالية الإنزيم بالسيطرة [وحدة/مل]}}{\text{فعالية الإنزيم بالسيطرة [وحدة/مل]}} \times 100$$

الفطريات للطور الخصري فضلا عن كونها عوامل منافسة تحافظ على بقائها في البيئة [25] [26].

الفطريات المعزولة الى دورها في نمو وحياتية الفطر إذ إنّ لها تعبير منظم للتمايز اللاجنسي وكذلك لها دور مهم في نمو وتطور الخيوط



شكل [1] كفاءة الفطريات المعزولة في تثبيط الفطر الممرض *F. solani*

ان الترسيب بملح كبريتات الامونيوم يشمل جميع المحتوى البروتيني والانزيمي وعليه يتطلب خطوات أخرى لفصل وتنقية البروتينات من المحلول البروتيني الخام.

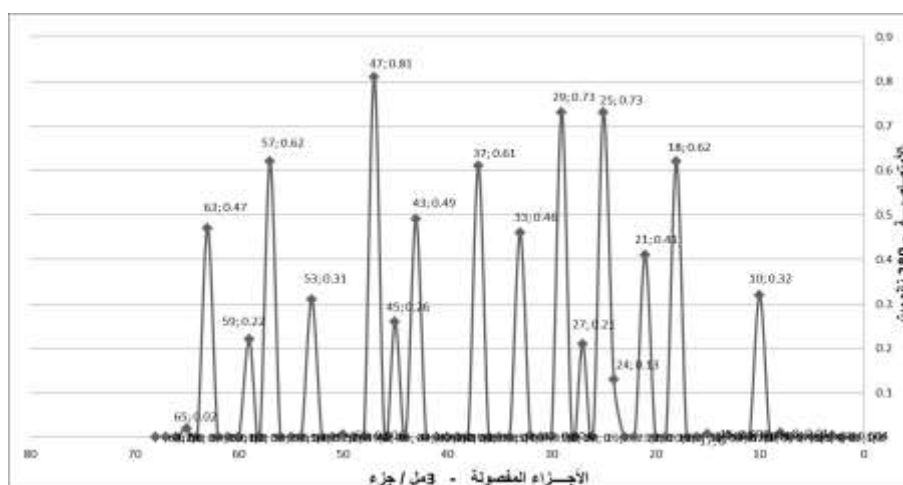
كروماتوغرافيا التبادل الايوني

يبين الشكل رقم [2] الأجزاء البروتينية المفصولة من راشح الفطر *F. roseum* باستخدام تقانة كروماتوغرافيا التبادل الايوني [المبادل EDTA cellulase]، إذ أوضحت النتائج وجود 16 قمة بروتينية بلغت أقصاها 0.81 nm للجزء المفصول 47 يليها 0.73 nm للأجزاء 29 و 25 في حين بلغت أدنى هذه القمم 0.02 nm في الجزء 65.

تنقية البروتينات المضادة للفطريات

الترسيب بكبريتات الامونيوم

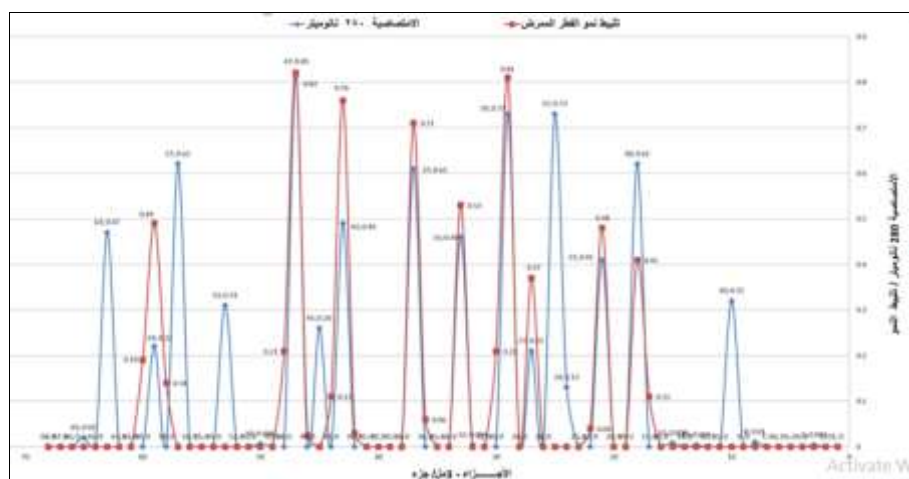
تم ترسيب المحلول البروتيني الخام بملح كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 80%. يعد ملح كبريتات الامونيوم من أكفأ الاملاح في ترسيب البروتينات والانزيمات والأكثر استعمالاً لذائبيته العالية وعدم تأثيره في الاس الهيدروجيني ولا يؤثر في ثبات الانزيم فضلا عن قلة كلفته، يعمل الملح على معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والاخلال بطبقة الماء المحيطة به مما يؤدي الى الترسيب بتأثير ما يعرف salting out [27].



شكل [2] كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام عمود المبادل الايوني DEAE-Cellulose بأبعاد [1.5x19.5] سم، اجري الغسل بمحلول متدرج من كلوريد الصوديوم [0-1مولاري] في محلول الفوسفات المنظم pH7 بواقع 3مل/جزء.

[41.13] و [48.16] و [37.26] و [81.41] و [53.2] و [71.38] و [76.12] و [82.04] و [49.07] على التوالي.

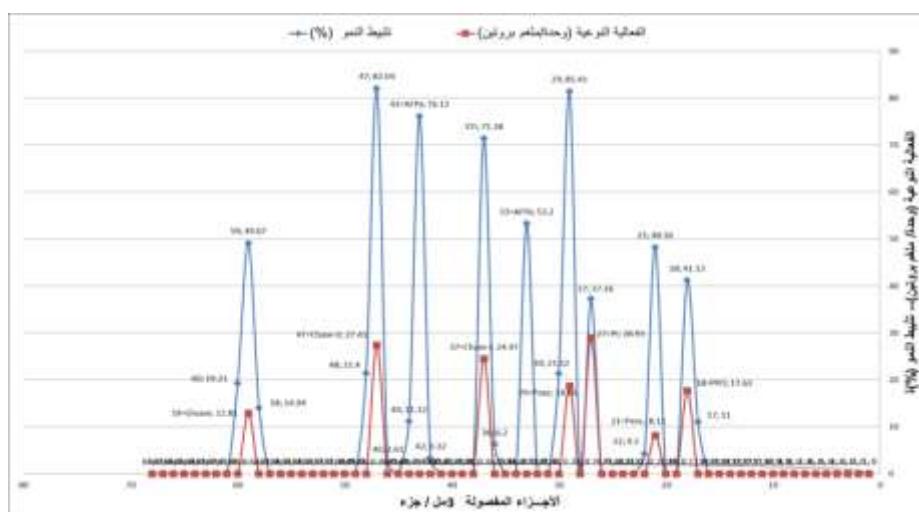
وعند تقدير تثبيط نمو الفطر الممرض *F. solani* للأجزاء المفصولة كافة أظهرت النتائج المدرجة في الشكل [3] ان هناك 9 بروتينات مثبطة لنمو الفطر كانت للأجزاء 18 و 21 و 27 و 29 و 33 و 37 و 43 و 47 و 59. إذ بلغ تثبيط نمو الفطر الممرض 0.41



شكل [3] قمم البروتينات المثبطة لنمو الفطريات المفصولة باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني [المبادل الايوني DEAE-Cellulose]

12.81 وحدة انزيمية /ملغم بروتين على التوالي. وظهرت النتائج أيضاً إن كل من الأجزاء 33 و 43 والتي سجلت نسب تثبيط لنمو الفطر الممرض *F. solani* بقيمة 53.2 و 76.12 % لكنها لم تظهر أي فعالية انزيمية وعدت كبروتينات مضادة لنمو الفطريات AFP1 و AFP2 على التوالي.

عند تشخيص البروتينات المضادة لنمو الفطر الممرض، أظهرت نتائج الشكل [4] أنَّ عائدة البروتينات في الأجزاء 18، 21، 27، 29، 37، 47، 59 كونها انزيمات Polyphenol oxidase و Peroxidase و Protease inhibitor و Protease و 1 و Chitinase و 2 و Chitinase و glucanase. إذ بلغت الفعالية النوعية لهذه البروتينات 17.63، 8.11، 28.93، 18.66، 24.47، 27.41،



شكل [4] قمم البروتينات المضادة للفطريات المشخصة والمفصولة باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني [المبادل الايوني DEAE-Cellulose] PPO=Cellulose Polyphenol Oxidase، Gluase=β,1-3 Glucanase، Perx=Peroxidase، Pase=Protease، Antifungal Protein1=AFP1، Chitinase=Chase، Antifungal Protein2=AFP2

تدخل في البناء الخلوي وبناء البروتينات والانزيمات المختلفة المهمة لإنتاج الوظائف الحيوية للفطر [28]. ولأنزيم البيروكسيداز فعالية تثبيطية ضد الفطريات الممرضة للنبات، وتكمن الية تلك الفعالية من خلال تثبيط الانبات ونمو واستطالة الانبوب الجرثومي عند انبات كوندات الفطريات الممرضة [29].

نظراً لأهمية الانزيمات في مكافحة الحيوية لذلك حظيت باهتمام الباحثين وطورت كمبيدات حيوية او كبروتينات دفاع كيميائية في النباتات المعدلة وراثيا او كعوامل مكافحة حيوية ميكروبية، تكمن قدرة انزيم الكايتيناز من خلال تحليل الفطريات للكايتين للاستفادة منه في التغذية إذ يتحلل الى وحدات ابسط وهي N-acetylglucosamin للحصول على الطاقة بتوفير السكريات للفطر والاحماض الامينية التي

من هذه البروتينات أو الأحماض الأمينية الناتجة من تحللها مما يؤدي إلى تعزيز نمو النبات وتصنيع عوامل المقاومة الجهازية والمكتسبة بالوقت نفسه، تزيد AFPs من مستويات الأوكسجين الحر reactive oxygen species [ROS] مما يدخل الخلية في الموت الخلوي المبرمج [PCD] programmed cell death [35]، [36]. وكذلك تتداخل AFP مع مكونات الغشاء البلازمي أو مع مستقبلات خاصة في الجدار الخلوي والغشاء البلازمي أو تتداخل مع مسار بناء الجدار الخلوي [37]، [38]، ويعد Defensins وهو مجموعة البروتينات الدفاعية، واحد من أهم البروتينات المضادة للفطريات التي يعتقد أنها تتداخل مع مجاميع الشحنة السالبة الموجودة في الغشاء البلازمي للأحياء الحساسة وبهذا فإنها تسبب خللاً في نضوجية هذا الغشاء [33]، فضلاً عن احتمال أن يكون هناك تشجيعاً لنمو النبات بفعل AFPs أو نواتج تحللها [تحرر الأحماض الأمينية] أو إفادة الأحياء المجهرية النافعة للنبات من هذه البروتينات أو الأحماض الأمينية الناتجة من تحللها مما يؤدي إلى تعزيز نمو النبات وتصنيع عوامل المقاومة الجهازية والمكتسبة بالوقت نفسه [39]. أثبتت دراسة مكملية أخرى [40] لهذه الدراسة دور هذه البروتينات المضادة للفطريات في كفاءتها حقلياً ضد الفطر الممرض *F. solani* على بعض أصناف الباقلاء، إذ أدت هذه البروتينات إلى تثبيط نمو الفطر الممرض وتشجيع صفات نمو النبات الخضري والإنتاجية. تعد هذه الدراسة الأولى من نوعها في القدر التي أثبتت كفاءة البروتينات المضادة لنمو الفطريات المفصولة والمشخصة من عزلة الفطر *F. roseum* المحلية في تثبيط نمو الفطر *F. solani* المسبب لأمراض تعفن الجذور وموت النباتات.

إن β -glucan هو من البوليمرات الموجودة في جدار الخلية الفطرية، ويؤدي إنزيم β -1,3 glucanase دوراً مهماً في التحليل المائي لهذه البوليمرات عند الإصابة إلى وحدات أبسط [سكريات بسيطة] مما يضعف الجدار الخلوي للفطر الممرض كنتيجة مباشرة لإصابة النبات بالمسببات المرضية ويعد هذا الإنزيم أيضاً من بروتينات المقاومة المكتسبة الجهازية في النبات [Systemic Acquired Resistance SAR] وهي البروتينات الخاصة بالمقاومة الجهازية المكتسبة ويرتبط وجودها أو نشاطها بشدة المقاومة الناشئة عن العدوى الأولية أو حث المقاومة [30]، ويعد إنتاج إنزيم β -1,3glucanase وإنزيم chitinase عوامل مهمة في مكافحة الحيوية لفطريات التربة لقابليتهما العالية على تحليل chitin و β -1,3 glucan الموجودة في جدران خلايا المسببات المرضية وإزالتها [31].

ذكرت دراسة سابقة [32] إن إنزيم Polyphenol oxidase يشترك في أكسدة الفينولات في المركبات الكينونية [المركبات المضادة للأحياء المجهرية] ويشترك في عملية تكوين اللكتين في الخلايا النباتية وزيادة فعاليتها في الدفاع ضد المسبب المرضي وإيقاف نموه، كما وتؤدي AFPs الدور نفسه بسبب التداخل الحاصل بين البروتينات المضادة والغشاء البلازمي والجدار الخلوي للفطر الممرض *F. solani* الذي يسبب تقوياً في الجدار ونضوح وانسياب المادة البروتوبلازمية وبالتالي موت الفطر الممرض [33] وهناك احتمال آخر هو حدوث تداخل بين البروتينات والمركبات الدهنية أو البروتينية للغشاء البلازمي وهذا يؤدي إلى نضوح بأيونات معينة مع تكوين ثقب أو ينتج عنه تكوين بروتينات ناقلة في داخل جدار الخلية [34]، [33]. فضلاً عن احتمال أن يكون هناك تشجيعاً لنمو النبات بفعل AFPs أو نواتج تحللها [تحرر الأحماض الأمينية] أو إفادة الأحياء المجهرية النافعة للنبات

المصادر

7. Bhattacharjee, R and U. Dey. 2014. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. African Journal of Microbiology Research, 8[17]:1749-1762.
8. عواد، مآرب احمد وحسن، عبد الله عبد الكريم، 2017. عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لمرض تعفن جذور الباقلاء المتسبب عن الفطر [Kuhn] *Rhizoctonia solani* وانتخاب الأنواع المثبطة للمرض كعوامل مكافحة حيائية. مجلة تكريت للعلوم الصرفة 22[1]:60-77.
9. Montealegre, J., Valderrama L., Sanchez, S., Herrera R., Besoain, X., and Perez L. 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato with *Trichoderma harzianum* mutants. Electronic Journal of Biotechnology. 13[2]: 1-11.
10. El- Khallal, S. M. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against Fusarium wilt disease by bioagent fungi [arbuscular mycorrhiza] and/or hormonal elicitors [Jasmonic acid & Salicylic acid]: 2-Changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-

1. Graham, P.H., and C.P. Vance. 2003. Legumes: Importance and constraints to ISSN 2072-3875.
2. FAO. 2006. FAO statistical yearbook 2005-2006, Available at: http://WWW.fao.org/statics/yearbook/vol_1_1/index.asp [online, verified 11 July 2008].
3. الجهاز المركزي للإحصاء. 2012. المجموعة الإحصائية السنوية. وزارة التخطيط. العراق.
4. Diaz, D.; M. Morlacchini; F. Masoero; M. Moschini; G. Fusconi and G. Piva. 2006. Pea seeds *Pisum sativum*, faba beans *Vicia faba* var. minor and lupin seeds *Lupinus albus* var. multitalia as protein sources in broiler diets: effect of extrusion on growth performance. Ital. J. Anim. Sci., 5: 43-53.
5. ICARDA. 2003. Faba bean pathology progress report. food Legume Improvement program. ICARDA. Aleppo. Syria.
6. Van Leur, J.A.G.; R.J. South well; and J.M. Mackie. 2008. Aphanomyces root rot on faba bean in northern NSW. Journal Australasian Plant Disease Notes, 3: 8-9.

25. Meyer, V. 2008. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78, pp. 17-28.
26. Meyer, V., Wedde, M., and Stahl, U. 2002. Transcriptional regulation of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. Mol. Genet. Genomics, 266, pp. 747-757.
27. عبد الرحمن، سوسن مصطفى. 2009. فصل وتنقية وتوصيف جزئي للإسوزائم من زهرة القرنبيط. مجلة العلوم الزراعية العراقية [2]40: 111-119.
28. Karthik, N., Akanksha K., Binod, P. and Pandey A. 2014. Production, purification and properties of fungal chitinases-Areview. Indian Journal of Experimental Biology. 1025-1035.
29. Caruso, C., Chilosi, G., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P., Buonocore, and V., Caporale, C. 2001. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. Phytochemistry. V.58, Issue5, P743-750.
30. Dubos, C. and Plomion, C. 2003. Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine [*Pinus pinaster* Ait] roots. Plant molecular Biology 51: 249-262.
31. Cota, I.E., R. Troncaso-Rojas. R. Sotelo-Mundo, A. Sanchez-Estrada and M.E. Tiznado-Hernandez, 2007. Chitinase and β -1,3- glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. Scientia Horticulturæ., 112:42-50.
32. Melo, G.A., M.M. Shimizu and P. Mazzafera. 2006. Polyphenoloxidase Activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. Phytochemistry., 67:277-285.
33. Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 3, 238-250
34. Marx, F., Binder, U., Leiter, E., and Pócsi I. 2008. The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. Cell Mol. Life Sci ;65[3]:445-454. Review.
35. Aerts, A.M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., Francois, I.E., Madeo, F., Santos, R., Carmmue, B.P., and Thevissen, K. 2009. The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. FEBS Lett., 583, pp.2513-2516.
36. Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Carmmue, B.P., and Thevissen, K. 2011. The antifungal plant defensin RsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. Front. Microbiol. 2, p. 47.
37. Leiter, H.; H. Szappanos, C. Oberparleiter, L. Kaiserer, L. Csemoch, T. Pusztahelyi, T. Emri, I. Pócsi, W. Salvenmoser, and F. Marx. 2005. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and proteins. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 1[4]: 717-732.
11. حسن، عبد الله عبد الكريم، الكرطاني، عبد الكريم عريبي، افتخار موسى و خلدون فارس. 2011. تقييم فعالية الفطر الغذائي *Pleurotus* sp. كمبيد حيوي ضد ممرضات النبات: الديدان الثعبانية وفطريات التربة. المؤتمر العلمي الخامس، كلية الزراعة، جامعة تكريت، 26-27 نيسان.
12. Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Lacadena J., Del Pozo A. M., Gavilanes J. G., and Rico M. 1995. NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. Biochemistry, 34[9], pp 3009-3021.
13. Do, T.T., Le T.H., Nguyen T.T., Dao T.M.A. 2017. Purification and characterization of an antifungal protein from *Bacillus subtilis* XL62 isolated in Vietnam. Scienceasia 1513-1874.
14. Johnson, L.E., Curl, J., Bond, and Fribourg, H. 1959. Methods for studying soil microflora-plant disease relationships. Minneapolis: Burgess Publishing Company.
15. Watanbe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi, CRC Press. Washington, 486pp.
16. Harisha, S. [Ed]. 2007. Biotechnology procedures and experiments handbook. Infinity Science Press LLC, New Delhi, India.
17. Cooper, C., 1977. The Tools of Biochemistry. John wily and Sons Inc. USA.
18. Hammerschmidt, R., Nuckles, E. and Kuc, J. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiologia plantarum, 20, 73-80.
19. Whitaker, G. R. and Granum, P. E. 1980. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 250 nm. Anal. Biochem. 109: 156-159.
20. Mayer, A.M., Harel, E. and Shaul, R.B. 1965. Assay of catechol oxidase acritical comparison of methods phytochemistry, 5:783-789.
21. Pan, S.Q., X.S. Ye and J. Kuc. 1991. Association of β -1,3 glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with peronospora tabacae or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. physiol. Mol. plant pathol., 39:25-39.
22. Tweddell, R.J., Jabaji-Hare, S.H. and Charest, P.M. 1994. Production of chitinase and β -1,3 glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Appl Environ Microbial., 60:489-495.
23. Mahadevan, A. and Sridhar, R. 1986. Methods in physiological plant pathology. Sivakami Publication. Madras, India.
24. Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycological Research. 111: 509-547.

وتقييم كفاءتها في مقاومة المرض. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد [18]. عدد خاص بوقائع المؤتمر العلمي السابع والدولي الأول للبحوث الزراعية 10-11 نيسان 2018 [ISSN-1813-1646].
40. حسن، عبدالله عبدالكريم ، الدوري ، لينه قاسم محمد 2018. عزل وتنقية البروتينات المضادة للفطريات من عزلات فطرية متنوعة وتقييم كفاءتها داخل وخارج الجسم الحي [2]. تجارب داخل الجسم الحي]. تحت النشر.

induces an apoptosis-like phenotype Antimicrob. Agents chemother., 49, pp. 2445-2453.

38. Ouedraogo, J.P., Hagen, S., Spielvogel, A., Engelhardt, S., Meyer, V. 2011. Survival strategies of yeast and filamentous fungi against the antifungal protein AFP. J. Biol. Chem., 286. Pp. 13859-13868.

39. حسن، عبد الله عبد الكريم، احمد، عوف عبد الرحمن. 2018.

عزل وتنقية البروتينات المرتبطة بأمراض بعض الفطريات المسببة والمصاحبة لمرض تعفن جذور الفلفل [Capsicum annuum L.]

Isolation and Purification of Antifungal Proteins (AFPs) from various fungal isolates and evaluation of their in vivo and in vitro efficiency

Abdullah A. Hassan¹, Lena Kassim M. Aldoori²

¹ Department of Plant protection , College of Agriculture , University of Tikrit , Tikrit , Iraq

² Department of Biology , College of Science , University of Tikrit , Tikrit , Iraq

Abstract

Seventeen fungal isolates were isolated from regions of [Tikrit, Al-alam, Al-dor, Samara, Balad and Al-degial] within Salah-Aldin governorate. The laboratory results showed the highest inhibited fungus *F. roseum* isolated from Al-alam region against the pathogenic fungus *R. solani* caused rot root disease in plants, the inhibition zone was 3.75 mm with a significant superiority on other fungal isolates, followed by *F. oxysporum*, *Mucor microspores* 1, *A. fumigatus*, *Monilia* sp., *Candida* sp. And *A. oryzae* in which the inhibition zone were 3.2, 3, 2.75, 2.75, 2.1 and 2 mm, respectively. Sixteen protein type were separated and purified from *F. roseum* filterate using ion exchange chromatography (EDTA cellulose), the highest absorbance was 0.81 nm of the fraction 47 followed 0.73nm of the both fractions 25 and 29, respectively, while the lowest absorbance was 0.02 nm of the fraction 65. In the determination of *F. solani* growth inhibition for all separated fractions, the results showed there are nine proteins inhibited the pathogenic fungus growth which were 18, 21, 27, 29, 33, 37, 43, 47 and 59 in which the inhibition percentage were 41.13, 48.16, 37.26, 81.41, 53.2, 71.38, 76.12, 82.04 and 49.07%, respectively. The identification results of the separated proteins which exhibited antifungal activity showed the antifungal proteins in fractions 18, 21, 27, 29, 37, 47 and 59 were related to Polyphenol oxidase, Peroxidase, Protease inhibitor, Protease, Chitinase-I , Chitinase –II and glucanase, the specific activity of these enzymes were 17.63, 8.11, 28.93, 18.66, 24.47, 27.41 and 12.81 unit/mg protein, respectively. The results also showed both fractions 33 and 43 which recorded the inhibition of the pathogenic fungus *R. solani* resulting in 53.2 and 76.12%, respectively, but they haven't any enzymatic activity, and regarded as antifungal proteins (AFP-1 and AFP-2), respectively.