التاثير الوراثي لعالق فطر *Trichodermaharzianum* على فطر *nigerAspergillus*

هدى وليد هادي و نديم احمد رمضان

جامعة الموصل /كلية العلوم/قسم علوم الحياة –العراق

DOI : doi.org/10.46617/icbe6009

الخلاصة : جرى في هذا البحث عزل جنسين مختلفين من الفطريات هما: *Aspergillus niger* والفطر *Trichoderma harzianum* كما تمت دراسة التاثير التضادي بين الفطرين وبطرق مختلفة اولها زراعة كلا الفطرين على الاطباق اما الطريقة الاخرى فتمثلت بايجاد التركيز المثبط الادنى من راشح افرازات الفطر *T.harzianum*.كما تم عزل سلالات طافرة مقاومة تلقائية من الفطر *A.niger* وبالتركيزين القاتل وتحت القاتل من راشح عامل السيطرة الاحيائي (1و0.5مل/مل) على التوالي وبطريقتين مختلفتين احداهما رمز لها (التجربة1)و(التجربة 2).اذ أعطت التجربة1 متوسط تكرار طافرات قدر ب 9.25×10^{-6} و10.62×10^{-6} وكانت اعلى من التجربة2 التي سجلت متوسط تكرار 6.53×10^{-6} و5.98×10^{-6}.بينت نتائج التحليل الاحصائي امكانية تكون طافرات مقاومة في الفطر *A.niger* فيما اذا استخدم الراشح الفطري وبحالته الطبيعية كمبيد حيوي في الحقول الزراعية.فطر

كلمات مفتاحية: *فطريات Aspergillus niger* و*Trichoderma harzianum* التاثير التطفيري.

المقدمة:

يعد الفطر *Aspergillus niger* من الفطريات المسببة لخسائر في المحاصيل الزراعية على المستوى الاقتصادي (Sharma, 2012) ونظرا لان اغلب المبيدات الفطرية المستعملة اتجاه هذه المسببات تعد سهلة الاستعمال وبتراكيز قليلة في اغلب الاحيان (شعبان والملاح,1993;Agrios,2005) لكنها تؤدي في الغالب الى ظهور مسببات مقاومة لهذه المبيدات نتيجة حدوث طفرات مقاومة في جينات هذه المسببات (Buchenauer,1995; Klaassen,*et.al*.,2012) كماانها في نفس الوقت تؤدي الى تحطيم نوعية التربة وتراكم المركبات السامة على النباتات (Matei,*et al*.,2011) . وحاليا تستخدم طرق المكافحة الحيوية لكونها طرق امنة نسبيا وذات مفعول مؤثر عوضا عن استخدام المبيدات الكيمياوية (Lewis and Larkin, 1997;Lewis and Fravel,1996). لكن هناك تساؤل حول هذه الطرق هل تبقى امنة بمرور الوقت وبالاستعمال المتكرر, لذلك يهدف البحث الحالي الى التحري عن ايجاد التراكيز القاتلة من راشح افرازات الفطر *Trichoderma harzianum* ومن ثم التحري عن التأثير الوراثي لهذا المبيد الفطري الطبيعي في انتاج او عدم انتاج طافرات تلقائية مقاومة من الفطر *A.niger* .

المواد وطرائق العمل:

1- الاوساط المستعملة: وسط Potato DextroseAgar(PDA) ووسط الاملاح الداني .

2-عزل الفطريات وتشخيصها: تم عزل الفطر *Aspergillus niger* من البصل وذلك بأخذ النسيج النباتي المصاب وتعقيمه سطحيا ثم غسله بالماء المعقم وزرعه على اطباق وسط PDA اما الفطر *Trichodermaharzianum* فقد تم عزله من عينات تربة قريبة من الاشجار في حديقة جامعة الموصل بحيث اجريت سلسلة من التخفيف حسب (Mustafa,*et. al.*,2009;Elad,*et. al.*,1981) او بالزرع المباشر على اطباق PDA وفي الحالتين جرى التحضين عند 28°م لمدة اربعة ايام او لحين ظهور مستعمرات جيدة التكوين.

اما التشخيص فقد تم بعمل مسحات مجهرية من المستعمرات النقية للفطريات وبالاعتماد على كلتا الصفتين المجهرية والصفات المورفولوجية للمستعمرات من حيث الشكل والقوام واللون وبالعتماد على المصادر

(Webster and Weber, 2007 ;Pitt and Hocking, 2009) تم تشخيص الفطريات الى مستوى النوع.

3-دراسة خواص انتاج المضادات للفطر *Trichoderma harzianum*

زرع كل من الفطرين *Trichoderma harzianum* و *Aspergillus niger* على وسط PDA في الاطباق وبتحديد اتجاه الزرع لكل فطر كما تم زراعة كل فطر على حدى للمقارنة.

4- ايجاد التركيز القاتل من راشح الفطر *Trichoderma harzianum*

زرع الفطر *T.harzianum* على وسط PDA السائل لمدة لاتقل عن الاسبوعين في درجة حرارة 28°م ثم اخذت تراكيز متزايدة من الراشح الى وسط الاملاح الداني ثم زرعت هذه الاطباق بفطر *A.niger* بالوخز وحضنت عند 28°م وملاحظة مدى تأثير هذه التراكيز على نمو الفطر من خلال قياس اقطار المستعمرات النامية, واي منها يؤدي الى القتل الكلي للفطر تم حساب هذه التراكيز بالطرقة الحجمية حجم/حجم.كما تم حساب النسبة المئوية للقتل كما يلي:

النسبة المئوية للقتل= : $\frac{\text{متوسط المقارنات} - \text{المعاملة بالراشح}}{\text{متوسط المقارنات}} \times 100$

5- عزل الطافرات التلقائية المقاومة

جرى عزل هذه الطافرات بطريقتين :

أ- **التجربة 1:** تحضين الفطر *A.niger* مع التركيز القاتل والتركيز تحت القاتل من راشح الفطر *T.harzianum* ثم اخذ 0.1 مل من كل تركيز ونشره على اطباق وسط الاملاح الداني مع زرع اطباق مقارنة في نفس الوقت وزرعت كل من اطباق المعاملة والمقارنة لمدة اربعة ايام عند 28°م اولحين ظهور مستعمرات واضحة المعالم.

ب - **التجربة 2** :عمل عالق بوغي من مستعمرة جيدة النمو من الفطر *A.niger* ثم ترشيحه بواسطة شاش او قطن معقم اعتبر هذا التخفيف 10^0 اخذ 0.1 مل منه وتم نشره على اطباق حاوية على التركيز القاتل

والتركيز تحت القاتلمن المضاد , كما تم عمل تخافيف متسلسلة من التخفيف10^0لحد تخفيف10^{-6}جرى الزرع منها على اطباق الاملاح الداني وذلك لحساب العدد الحي المتوقع للفطر حضنت الاطباق جميعها عند28°م ولمدة اربعة ايام اولحين ظهور مستعمرات واضحة المعالم. تم عزل الطافرات التلقائية المقاومة بواقع ثلاث مكررات لكل تجربة كما تم حساب تكرار الطافرات كما يلي:

$$\text{تكرارالطافرات} = \frac{\text{عدد الطافرات المقاومة}}{\text{العدد الحي المتوقع}} \times 100$$

قدر العدد الحي المتوقع من العالق غير المخفف من خلال المعادلة الاتية :

العدد الحي المتوقع = معدل عدد المستعمرات (المقارنة)×مقلوب التخفيف× عددالأطباق الملقحة من العالق10^0

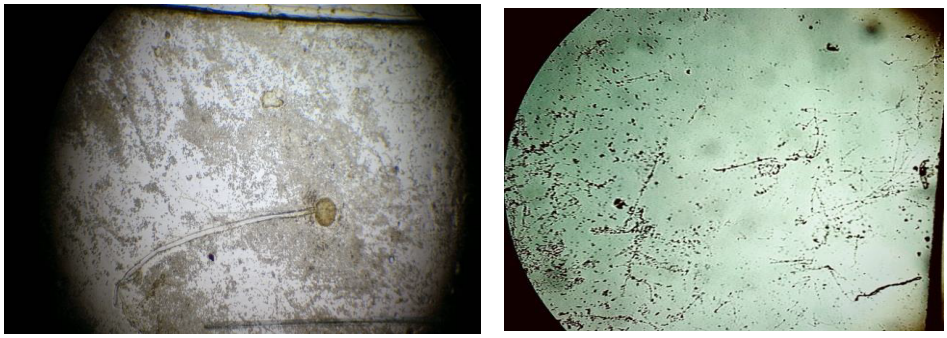
6-التحليل الاحصائي:

تم حساب التحليل الاحصائي من خلال حساب الوسط الحسابي ومجموع القيم وحساب النحراف المعياري و الخطأ القياسي ومن ثم ايجاد قيمة (t) المعنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

النتائج والمناقشة

1- عزل الفطريات و تشخيصها:

تم تشخيص العزلات الفطرية بعد الحصول على عزلات نقية وملاحظة الصفات الشكلية للمستعمرات والصفات المجهرية ومقارنتها مع المصادر (Webster and Weber ,2007Mutiaand Prilya, 2017;and Hocking, 2009;Pitt) تم التأكد بان العزلات الفطرية هي للأنواع:*harzianumTrichoderma* و*Aspergillus niger*و يبين الشكل(1-أ وب) التفاصيل المجهرية لكلا الفطرين.



-أ- - ب-

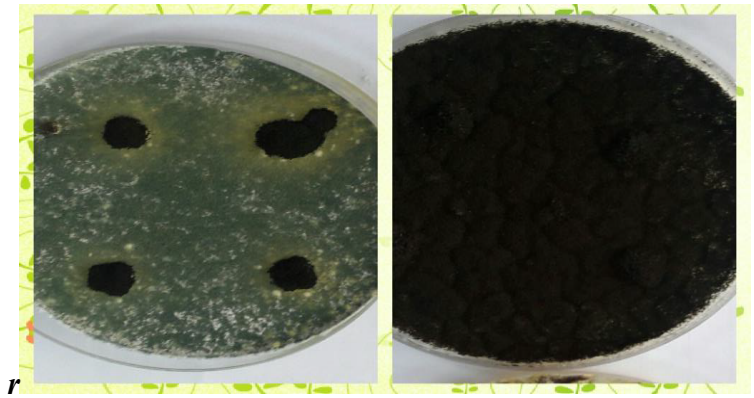
الشكل 1:الفحص المجهري للفطرين.

أ- **الفطر *harzianumTrichoderma* و ب- الفطر *Aspergillus niger***

2-دراسة خواص انتاج المضادات للفطر *Trichoderma harzianum*

من خلال الزرع لكلا الفطرين *T.harzianum* و *A.niger* على اطباق وسط PDA وجد انه بالرغم من انتاج الفطر *A.niger* العديد من المواد المضادة للأكسدة والمثبطة للفطريات(Kawai,*et.al.*,1993) الا ان الفطر *T.harzianum* هو الذي تغلب على فطر *A.niger* وهذا ماحصل ايضا (Hinampas,*et.al.*,2013) ويرجع سبب ذلك الى القدرة العالية للفطر *T.harzianum* في انتاج المضادات المجهرية للفطريات (Green,*et.al*.,1999 ,2002 Kugukand Kivang; وكذلك بسبب التصاق الفطر على المسبب المرضي وتحليله وذلك لأنه فطر ذو نشاط ايضي عالي لا سيما الايض الثانوي المسؤول عن انتاج هذه المواد الفعالة.كما هو مبين في الشكل (2).

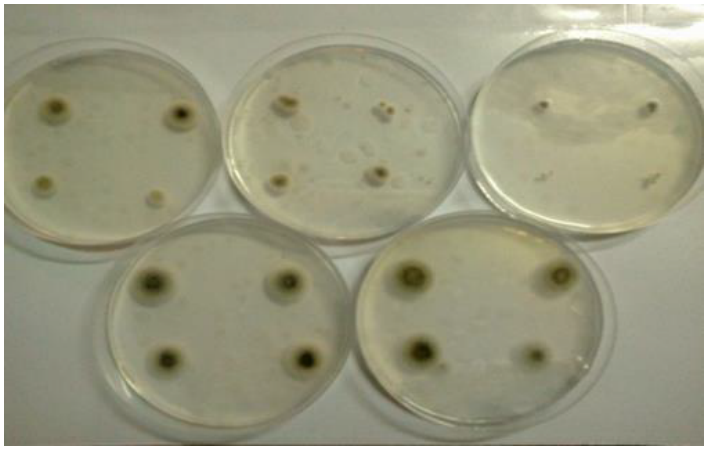
(Schusterand Schmoll,2010;Błaszczyk,*et.al*.,2014;Mukherjee,*et.al.*,2013)



الشكل2: تغلب الفطر *T.harzianum* في النمو على الفطر *A.nige*

2- ايجاد التركيز القاتل من راشح الفطر *Trichoderma harzianum*

بعد ان تبين ان الفطر *Trichoderma harzianum* هو المتغلب في انتاج المواد المثبطة لنمو الفطر *A.niger* تم استعمال راشح افرازات الفطر *T.harzianum* بشكله الخام (الافرازات الخالية من أى تركيب فطرى) وبتراكيز متصاعدة من اجل الوصول الى التركيز القاتل وحسب (الجدول 1) اذ تبين ان التركيز القاتل هو 1مل/مل اما التركيز تحت القاتل فقد كان 0.5مل/مل من الوسط الزرعي وتتالت بقية التراكيز تباعا, كذلك يوضح (الشكل 3) تاثير بعض تلك التراكيز لاحدى تجارب قياس التركيز القاتل



الشكل 3: احدى تجارب قياس التركيز القاتل لراشح الفطر *T.harzianum*

الجدول 1: أقطار مستعمرات الفطر *A.niger* المزروعة على الوسط الاملاح الداني المضاف إليه تراكيز متصاعدة من راشح افرازات الفطر *Trichodermaharzianum*

راشح افرازات الفطر حجم/حجم	قطر المستعمرة (R) سم				متوسط قطر المستعمرة	النسبة المئوية للقتل%
	R1	R2	R3	R4		
الراشح الخام	1.5	1.8	1.5	2.0	1.7	0
0.05	0.5	0.6	0.7	0.5	0.6	64.7
0.0125	0.5	0.5	0.4	0.5	0.48	71.76
0.2	0.4	0.2	0.4	0.3	0.32	81.17
0.25	0.2	0.3	0.3	0.2	0.25	85.3
0.3	0.2	0.1	0.1	0.2	0.15	91.17
0.4	0.1	0.2	0.1	0.1	0.125	94.1
0.5	0	0.1	0	0.1	0.05	97.1
1	0	0	0	0	0	100

3- عزل الطافرات التلقائية المقاومة

تم الحصول على طافرات تلقائية مقاومة وذلك حسب (التجربة1 والتجربة 2) المذكور تفاصيلهما في مواد وطرائق العمل وكما مبين في (جدول 2) اذ نلاحظ ان تكرار الطافرات التلقائية ولثلاث تجارب متتالية كانت في تجربة 1 هي 8.13 و9.75 اذ كانت اعلى من التجربة 2 6.73 و 5.32 وهذا يأتي ربما نتيجة للتفاعل الذي حدث بين المنتجات الايضية لراشح الفطر *T.harzianum* وخلايا الفطر *A.niger* اذ سمحت فترة التحضين لمدة يومين لدخول هذه المكونات الى الخلايا الفطر الثاني وبالتالي اثر ذلك على زيادة الطافرات المقاومة في هذا الفطر.وهذا يؤكد انه ربما ان هناك خطورة محتملة من استعمال راشح الفطر على الافات الزراعية لفترات كافية بحيث تؤدي الى ظهور الطافرات المقاومة لهذا المبيد الطبيعي اضافة لكثير من المواد السامة التي يمكن ان يفرزها الفطر مثل مادة pyrones و السموم الاخرى(Barakat,*et.al*.,2006).

ومن خلال التحليل الاحصائي(الجدول 3) وايجاد قيمة (t) المحسوبة ومقارنتها مع قيمها الجدولية عند مستوى احتمالية 0.05 وجد ان هناك فروق معنوية عند مقارنتها بمعدلات الطفرات المقاومة التلقائية التي يمكن ان تحدث بدون التعرض لهذه السيطرة الحيوية في كونيدات الفطر*A.niger* اذ يمكن حدوث طفرات مقاومة لراشح الفطر*T.harzianum* وهذا امر طبيعي كون الراشح الخام لعامل السيطرة الحيوية يحوي الكثير من المواد السامة (Ibraheem, 2009) وهو يستعمل بصورة واسعة حول العالم وبشكله الخام كسبورات معدة للرش المباشر على النباتات (Woo,*et.al*.,2014; Kumar,*et.al*.,2014) وهذا لا ننصح به في دراستنا الحالية اذ يجب استخلاص المواد ذات الفائدة لكي يكون مفعولها افضل وتأثيراتها المستقبلية قليلة قدر الامكان.

الجدول 2 : تكرار الطافرات التلقائية $\times 10^{-6}$ للفطر*A.niger* لثلاث مكررات وفي نوعين من التجارب

نوع التجربة	تركيز الراشح	تكرار الطافرات المقاومة$\times 10^{-6}$			متوسط تكرار الطافرات	الانحراف المعياري	الخطا القياسي
		R1	R2	R3			
تجربة (1	0.5	9.52	10.1	8.13	9.25	1.01	0.584
	1	10.71	11.4	9.75	10.62	0.82	0.478
تجربة(2	0.5	7.21	5.61	6.73	6.53	0.78	0.454
	1	5.76	6.91	5.32	5.98	0.82	0.478

الجدول 3 قيم tالمحسوبة ل(تكرار الطافرات التلقائية المقاومة $\times 10^{-6}$) A.nigerوالمعاملة براشح T. harzianum

نوع التجربة	تركيز الراشح	المكررات لتكرار الطافرات المقاومة$\times 10^{-6}$			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة tالمحسوبة
		R1	R2	R3		
مقارنة	0	1.75	1.9	2.1	0.1±1.91	_
التجربة 1	0.5	9.52	10.1	8.13	0.584±9.25	1.782
	1	10.71	11.4	9.75	0.478±10.62	1.734
التجربة 2	0.5	7.21	5.61	6.73	0.454±6.53	1.782
	1	5.76	6.91	5.32	0.47±5.98	1.86

المصادر العربية

شعبان،عواد والملاح نزارمصطفى.1993.المبيدات.دار الكتب للطباعة ,العراق.

المصادر الاجنبية

Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier, Amsterdam.

Barakat,R. M., Fadel Al– Mahareeq and Mohammad I.Al– Masri.(2006). Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Tricoderma* spp. Isolated from Palestine. HerbronUniversity ResearchJ . Vol. (2) . No. (2) . pp. (27–47) .

Błaszczyk L, Siwulski M, SobieralskiK, Lisiecka J, Jędryczka M. (2014)*Trichoderma*spp.Application and prospects foruse in organic farming and industry. J. of Plant Protection Research. 54(4):309-317.

Buchenauer, H.(1995 .)DMI-fungicides: Side effects on the Plant and Problems of resistance. In Modern Selective Fungicides. Properties , Applications , Mechanisms of Action (H– Lyr , ed) Gustav Fisher – Verlag , Jena Germany , 280 – 290 .

Elad Y, Chet I, Henis Y. (1981) .A selectivemedium for improving quantitativeisolation of *Trichoderma* spp. from soil.Phytoparasitica.9(1):59-67.

Green, H., Larsen, J., Olsson, P. A., Jensen, D. F., & Jakobsen, I. (1999). Suppression of the Biocontrol Agent*Trichoderma harzianum* by Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus Glomus intraradices in Root-Free Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, *65*(4), 1428-1434.

Hinampas, Venus B., Ina Marie P. Kintanar, and Jan Gabrielle M. Reyes, (2013). "Biocontrol Potential of *Aspergillus niger*on *Oryza sativa* (Rice) by *Trichoderma harzianum*Under Experimental Conditions". A Research Paper. Philippine ScienceHighSchool.Central Visayas Campus, Talaytay, Argao, Cebu.

Ibraheem, B.Y. (2009). Induced biotypes from the fungus *Trichoderma* types to improvebiocontrol and enhancement plant growth parameters. Ph.D. Thesis. College ofAgriculture and Forestry, Mosul Univ., Iraq (In Arabic with English abstract).

Kawai,Y.; Oeda, Y.; Otaka,M.; Kasakawa,T.; Inoue,N. andShinano,H.(1993). Screening andidentification of antioxidantproductionstrains in food- borne fungi.Bull. Fac. Fish. HokkaidoUniv. 44:141-146.

Klaassen, C.H., Gibbons, J.G., Fedorova, N.D., Meis ,J.F., Rokas, A. (2012). Evidence for genetic differentiation and variable recombination rates among Dutch populations of the opportunistic human pathogen Aspergillus fumigatus. Mol Ecol 21(1): 57–70.

Kuguk,C.and Kivang,M. (2002 .)Isolation of *Trichoderma*spp.and determination of their antifungal, biochemical and physiological feature. Turky, J. Biol. 27: 247 - 253 .

Kumar S, Thakur M, Rani A.(2014)*Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, deliveryand its scope incommercializationin India for the management ofplant diseases. African J. ofAgricultural Research.9(53):3838-3852. Available from: http://www. Academic J.org/AJAR.

Lewis,J.A.andFravel , D.R. .(1996). Influence of Pyrax / Biomass of Biocontrol Fungi on Snap bean damping – off caused by *Sclerotium rolfsii* in the Field and Germination of Sclerotia . Plant Dis. 80: 655-659.

Lewis,J.A..andLarkin , R. P. (1997 .) Extruded GranularFormulationwith Biomass of Biocontrol *Gliocladumvirens* and *Trichoderma* spp. caused by *Rhisoctoniasolani* and saprophytic Growth of Pathogen in Soil less Mix . Biocontrol Science Technol. 5:397- 404 .

Matei S, Matei G-M, Cornea P, Popa G.(2011 .)Characterization ofsoil*Trichoderma* isolates for potentialbiocontrol of plant pathogens. Factorişiprocesepedogenetice din zonatemperată. 10:29-37 .

Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmoll M, Kenerley CM.(2013)*Trichoderma* researchin the genome era. Annual Review ofPhytopathology.51(1):105-129.Available from: http://www. annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-082712-102353.

Mustafa A, Khan AM, Inam-ul-HaqM, Pervez AM, Umar U-D. (2009)Usefulnessof different culture media for *in-vitro*evaluation of *Trichoderma* spp. against seed-borne fungi of economicimportance. Pakistan Journal ofPhytopathology.21(1):83-88 .

Mutia D, Prilya F. (2017).Exploration of*Trichoderma* spp. and fungal pathogenthat causes a strawberry anthracnoseand examination of in vitro antagonisticactivity. Biotika.;5(18):58-68.

Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009). Fungi and Food Spoilage. Springer.

Schuster A, Schmoll M. (2010 .)Computerassistedcorneal topography. Highresolutiographic presentation andanalysis of keratoscopy. AppliedMicrobiology and Biotechnology. 87:787-799 .

Sharma, R. (2012). Pathogenecity of *Aspergillus niger* in plants. *Cibtech journal of microbiology*, *1*(1), 47-51.

Webster, J. and Weber, R.W.S. (2007). *Introduction to Fungi*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, New York, pp: 469-471.

Woo SL, Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, *et al*.(2014)*Trichoderma*-based products and theirwidespread use in agriculture. The OpenMycology Journal. 8(1):71-126. Available from: http://benthamopen. Com/ABSTRACT/TOMYCJ-8-71.

الملخص الانجلـيزى

Genetic effectof *Trichodermaharzianum* suspension on *Aspergillus niger*

Huda W. Hadi and Nadeem A. Ramadan

Mosul university/Science college/Biology department / Iraq

Abstract

In this research two different genera were isolated the first was *Aspergillus niger*and the second was*Trichoderma harzianum* .The antimicrobial effect between two fungi was studied in different ways :the first is the cultivation of both fungi on the petri dishes whereas , the other methods relied on finding minimum inhibitory concentration of *T. harzianum* suspension secretions. Furthermore,resistant spontaneous mutations were isolated from *A.niger*by two different methodsusinglethal and sub lethal concentration from bio control factor suspension (1, 0.5ml/ml) respectively, one of these methods named (experiment 1) and second called (experiment 2). Experiment 1 recorded an average frequency of mutants estimated at $^{6-}$10 ×0.62 and $^{6-}$10×9.25higher than Experiment 2, which recorded an average frequency of $^{6-}$10×6.53and $^{6-}$10×5.98. Statically data showed possibility of resistant mutant's formation in *A.niger*fungi weather suspension use with natural state in agricultural fields as bio control fungicide.

Keywords:*Trichodermaharzianum* ;*Aspergillus niger*; Genetic effect