# الكشف عن المواد الشبيهة بالجبرلينات والاكسينات وهرمون الاثلين في راشح نمو ثلاث عزلات محلية من الفطر *Trichoderma harzianum*

*هادي مهدي عبود ** مؤيد رجب عبود فالح حسن سعيد

*وزارة العلوم والتكنولوجيا **كلية الزراعة/جامعة بغداد

**المستخلص**

نفذت هذه الدراسة للتحري عن كفاءة ثلاث عزلات محلية من الفطر *Trichoderma harzianum* T28.T26.T9 على انتاج بعض الهرمونات النباتية المحفزة لنمو النبات مثل المواد الشبيهة بالجبرلينات والاكسينات وهرمون الاثلين.اظهرت النتائج قابلية العزلات الثلاثه T28.T26.T9 على انتاج المواد الشبيهه بالجبريلينات والمواد الشبيهه بالاوكسينات عند تنميتها على مستنبت البطاطا سكروز السائل لمدة 14 يوما على درجة حرارة 25±2 م°، الا انها تباينت معنويا فيما بينها بقدرتها على انتاج كلا الهرمونين فقد اظهرت نتائج الكشف الكميائي لراشح مزارع العزلات المختبرة بأستخدام تقانة كروموتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي High-Performance Liquid Chromatography (HPC) تفوق العزلة T9 معنويا في مقدرتها على انتاج المواد الشبيهه بالجبريلينات مقارنة بالعزلتين T26 و T28 اذ بلغ معدل تركيزه في راشح نمو مزرعة العزلة T9 43.39 ملغم /لتر مقارنة بـ 18.24 و 0.59 ملغم/لتر للعزلتين T26 و T28 بالتتابع بينما سجلت العزلة T26 تفوقا معنويا في قدرتها على انتاج المواد الشبيهه بالاوكسينات اذ سجلت 22.3 ملغم/لتر مقارنة ب 0.00 و 0.06 ملغم /لتر للعزلتين T9 و T28بالتتابع.كما اظهرت نتائج فحص الحيز الغازي لبيئة مزارع العزلات النامية لمدة اربعة ايام على الوسط الزراعي Czapek's broth على درجة حرارة25 ±2 م° باستخدام جهاز المطياف الغازي Chromatography عن وجود الاثلين بمستويات متباينة من خلال ملاحظة منحنى الاثلين المنتج من كل منها ومقارنته بمنحنى الاثلين القياسي، ان هذه النتائج تؤكد فرضية انتاج الهرمونات النباتية المحفزة لنمو النبات من قبل عزلات الفطر *Trichoderma spp* كإحدى اهم آليات تحفيز نمو النباتات المعاملة بها.

**The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (2): 12-18 (2008) Abood et al .**

## DETECTION OF GIBBERELLINS AND AUXINS LIKE COMPOUNDS AND THE PHYTOHORMONETHYLENE IN CULTURE FILTERATE OF THREE ISOLATES OF *Trishoderma harzianum.*

* H. M. Abood F. H Saeed ** M.R. Abood

**Ministry of Science and Technology.** *** Dept. of Hort. – Coll. of Agric. / Univ. of Baghdad.**

**ABSTRACT**

This study was conducted to detect the efficiency of three local isolates of *Trichoderma harzianum* (T9, T26 and T28) in producing some plant growth enhancement hormones like gibberellins , auxins and ethylene. The results showed the ability of the three tested isolates T9, T26 and T28 in producing gibberellins and auxins when cultivated on potato sucrose broth medium for 14 days on 25±2 °C , but their production ability was varied significantly in producing the two studied hormones. The results of chemical analysis of culture filtrates using (HPLC) High-Performance Liquid Chromatography technique showed the superior of isolate T9 in their ability to produce gibberellins compared to T26 and T28 which recorded 43.39 mg/L compared to 18.24 and 0.59 mg/L for isolates T26 and T28 respectively while isolate T26 recorded high efficiency in production auxins 22.3 mg/L compared to the productivity of isolate T9 and T28 which recorded 0.00 and 0.06 mg/L respectively.Gas chromatography technique showed the occurrence of ethylene in different quantities in the cultures of the three tested isolates of *T. harzianum* cultivated on Czapek 's broth medium for four days on 25±2 °C . This results confirmed the hypothesis of phytohomones production which enhance plant growth by some isolates of *Trichoderma spp* to be used as an important tool for plant growth enhancement.

---

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث .

**المقدمة**

تعد الفطريات احد اهم عناصر النظام البيئي للتربة، اذ انها تؤثر وتتأثر وبشكل فعال بما يحيطها من عناصر هذا النظام وخاصة جزءه الاحيائي والذي من اهم عناصره النبات. واعتماداً على طبيعة العلاقة بين الفطريات والنباتات فقد قسمت إلى فطريات ممرضة بفعل قدرتها على اصابة النبات واحداث مدى واسع من الضرر ابلغه موت النبات(18)وفطريات تكافلية لقدرتها على انشاء علاقة تبادل منفعة بينها وبين النبات بما يؤدي إلى زيادة مقدرته على امتصاص بعض العناصر الغذائية والماء فضلاً على تحمله لظروف الاجهاد البيئي (10) وبين افراد هذه المجموعة من الفطريات وتلك توجد انواعاً اخرى ذات معيشة ترممية سجلت مقدرة بعضها على التضاد مع أفراد المجموعة الاولى(18)ويعتبر الفطر *Trichoderma spp.* احد اهم أفراد هذه المجموعة، الذي برزت أهميته خلال القرن الماضي عندما سجلت فعاليته في خفض الإصابة بالمسببات المرضية من خلال آليات اصبحت معروفة والتي منها التضاد الحيوي والتنافس (16) ان ما زاد من اهمية بعض أنواعه تأثيرها الإيجابي في زيادة مختلف معايير نمو النباتات المعاملة بها حتى في حالة غياب المسببات المرضية (9) و(23). ومن بين أهم الفرضيات المقترحة لتفسير هذه الظاهرة هي قدرة هذه الفطريات على انتاج عوامل محفزة لنمو النبات والتي اقترحها لاول مرة الباحث (23) واكدتها نتائج الدراسة التي قام بها (12) اما (16) فقد سجل فعالية السلالة T.22 من الفطر *T. harzianum* في تحفيز تجذير عقل نباتات الطماطة بما يكافئ فعالية المستحضر التجاري لهرمون التجذير Rootone وهي ذات النتيجة التي توصل إليها (21) عندما وجدوا ان عقل نبات الاقحوان تصبح اكثر مقدرة على التجذير بعد معاملتها بالفطر *T. harzianum* واستنتج ان ذلك ربما يعود إلى مقدرة هذا الفطر على انتاج مركبات هرمونية محفزة لنمو النبات. اما فيما يخص نوع الهرمونات النباتية التي تفرز من هذا الفطر فعلى الرغم من ندرة الدراسات في هذا المجال الا ان (6) سجل مقدرة بعض عزلات الفطر *Trichoderma spp.* على انتاج هرمون الاثلين. لذا جاءت هذه الدراسة لمتابعة التحري عن مقدرة ثلاثة عزلات من الفطر *T. harzianum* ثبتت قدرتها التحفيزية لنمو النبات في دراسة سابقة (3) على انتاج المواد الشبيهة بالجبرلينات والاوكسينات وهرمون الاثلين.

**مواد البحث وطرائقه**

استخدمت في هذه التجربة ثلاث عزلات من الفطر *T. harzianum* وهي T.28, T.26, T.9 تم الحصول عليها من قسم انتاج المبيدات الاحيائية/ دائرة البحوث الزراعية وتكنولوجيا الغذاء/ وزارة العلوم والتكنولوجيا. والتي اظهرت قدرة عالية في تحفيز انبات بذور ونمو بعض نباتات المحاصيل الحقلية والفاكهة (3). حضرت مزارع سائلة للعزلات الثلاثة بعد تنميتها لمدة 14 يوما على مستنبت مستخلص البطاطا والسكروز السائل المجهز في دوارق زجاجية سعة 250 مل وبواقع 100 مل/دورق. حضنت على درجة حرارة $25\pm2^{0}$م مع الرج اليدوي كل 12 ساعة. تمت عملية استخلاص والكشف عن المواد الشبيهة بالجبرلينات والاوكسينات باستعمال طريقة حورت عن طرق تم وصفها سابقاً في (1) و(2) و(8) وذلك باضافة 15 مل من راشح مزرعه كل عزلة إلى 100 مل من اللكحول الاثيلي تركيز 8% وحضن لمدة 48 ساعة على درجة 5م ثم رشح المستخلص باستخدام ورق ترشيح (Whatman 2)

$$\text{التركيز (ملغم/ لتر)} = \frac{\text{مساحة العينة المجهولة}}{\text{مساحة النموذج القياسي}} \times \text{النموذج القياسي}$$

للتخلص من الرواسب ثم ركز باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator تحت التفريغ بدرجة حرارة 45م حتى الوصول إلى الحالة المائية، ثم اكمل الحجم بإضافة الماء المقطر المزال من الايونات إلى 60 مل واضيف له 1 مل خلات الرصاص القاعدية تركيز 40% وبضع قطرات من اوكزالات البوتاسيوم تركيز 22% لغرض الحصول على محلول رائق اكمل حجمه إلى 60 مل بالماء المقطر واخضع إلى الطرد المركزي لمدة 12 دقيقة بسرعة 3000 دورة / دقيقة. اخذ 30 مل من المحلول وعدلت دالته الهيدروجينية إلى 2.5 عياري HCl وغسل ثلاث مرات متتالية في اقماع الفصل بإضافة حجوم متساوية من ثنائي اثيل الاثير Diethyl ether مع اهمال الطور المائي المتبقي بعد هذه العملية، ثم بخر طور ثنائي اثيل الاثير الحامضي بواسطة جهاز المبخر الدوار على درجة حرارة 30م إلى حين الجفاف، ثم اعيد اذابة المواد الجافة بإضافة 15 مل من الكحول الاثيلي المطلق حيث تم تركيزه بالمبخر الدوار على درجة حرارة 5م إلى حوالي 5 مل وتم حفظها بالتجميد لحين الاستعمال. للكشف عن محتوى النموذج من المواد الشبيهة بالاوكسينات والجبرلينات استخدم جهاز كرموتوغرافيا السائل ذو الاداء العالي HPLC المجهز من شركة Shimadzu نوع LC-6A المزود بمقياس الطيف بالأطوال الموجبة المتغيرة Spd-6A-UV spectrophotometer حقن النموذج بحجم (20 مايكروليتر) إلى العمود بواسطة محقنة نوع Rheodyne-7120 وعلى درجة حرارة 35م تنظم بالمسيطر الحراري SIL-6A رسمت النتائج والكروموتوغراف والحسابات بواسطة الحاسبة نوع CR-4A واستخدم في التحليل عمود الطور المعكوس نوع C-18 وبابعاد 250X46mm والطور المتحرك mobile phase المكون من الماء والميثانول بنسبة (60:40) حجم إلى حجم. استخدمت المحاليل القياسية لكل من IAA وGA3 المجهزة من شركة Sigma، وتم فصل المحاليل القياسية والتعرف على مساحة النموذج القياسي Peak area وزمن الاحتجاز Retention time وارتفاع الحزم، ثم قيس زمن الاحتجاز ومساحة وارتفاع الحزم الناتجة من حقن العينات، بعد ذلك تمت مقارنة الحزم التي تم الحصول عليها مع حزم المحلول القياسي الناتجة تحت نفس الظروف حيث حسبت تراكيز الهرمونات النباتية في النماذج وفق المعادلة التالية: اما فيما يخص الكشف عن مقدرة العزلات الثلاثة المختبرة (T.28, T.26, T.9) على انتاج هرمون الاثلين بالإضافة إلى عزلة غير محفزة للنمو T.29 تم استخدامها كمعاملة مقارنة فقد استعملت الطريقة الموصوفة سابقاً من قبل (13) والمحورة من قبل (6) للكشف عن غاز الاثلين، حيث جهز 4.5 مل من الوسط الزراعي السائل Czapek's Solution في قناني زجاجية سعة 18 مل ذات غطاء مطاطي محكم. عقمت القناني بجهاز التعقيم البخاري بدرجة 121م وضغط 1 كغم/ سم2 لمدة 20 دقيقة اضيف 2 مل من حامض المثونين تركيز 10 ملي مول المعقم إلى كل قنينة وبعد ذلك لقحت كل قنينة بقرص قطر 5 ملم من مزارع العزلات المدروسة عمر أسبوع على مستنبت البطاطة دكستروز اكر، احكم غلق الغطاء المطاطي للقناني باستخدام شمع البرافين لمنع تسرب الغازات وكررت كل معاملة 3 مرات. حضنت القناني على درجة حرارة 25±2م لمدة 4 ايام وتم فحص الغاز المنتج في القناني باستخدام جهاز كروموتوغرافيا الغاز Gas chromatography المنتج من شركة Shimadzu، نوع 9A اذ سحب 2 مل من الحيز الغازي لكل عزلة بواسطة محقنة بلاستكية، ثم حقن في الجهاز. سجلت النتائج بعد دقيقة واحدة من الحقن واستخدام الاثلين القياسي المنتج من شركة Schuchardt-Merch خلال تشابه احتجاز قمم المنحنيات لغازات العزلات مع قمة منحنى الاثلين القياسي.

**النتائج والمناقشة**

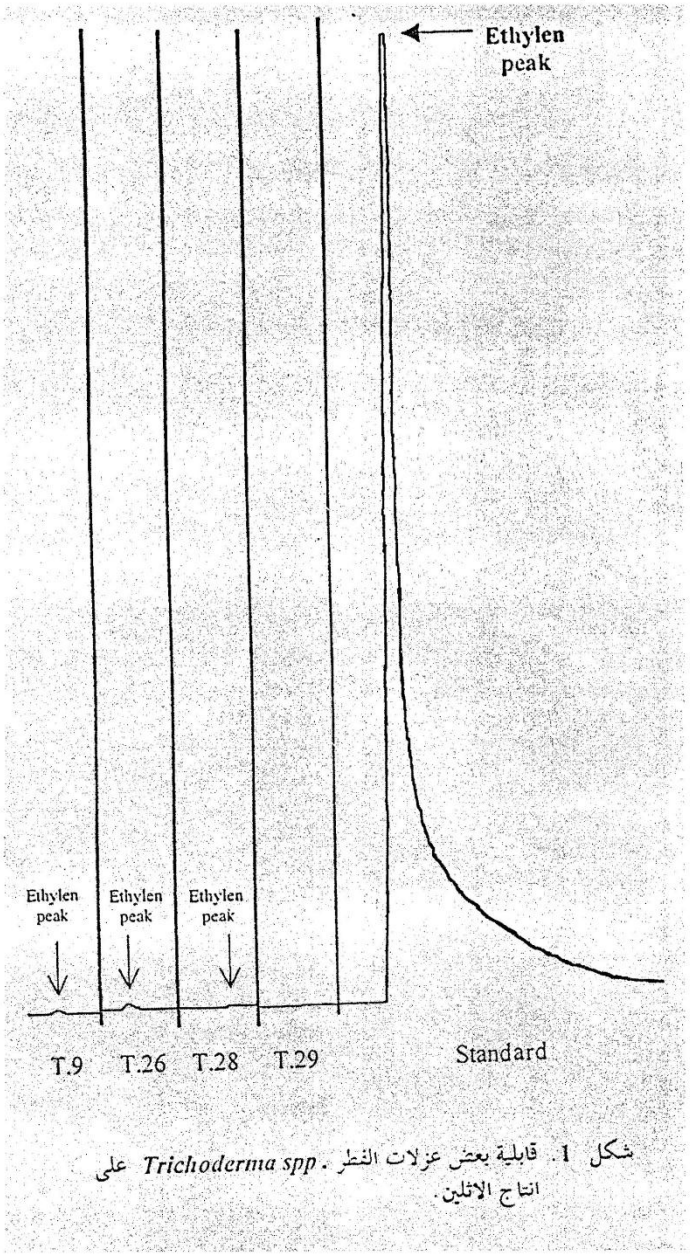
اظهرت نتائج اختبار قابلية العزلات T.28, T.26, T.9 في انتاج المواد الشبيهة بالجبرلينات والمواد الشبيهة بالاوكسينات ان العزلات اظهرت قابلية على انتاج هذه المواد الا انها تباينت معنوياً فيما بينها في قدرتها على انتاج كلا الهرمونيين (جدول 1)، فقد تفوقت العزلة T.9 معنوياً في مقدرتها على انتاج المواد الشبيهة بالجبرلينات مقارنة بالعزلتين T.26 ,T.28 على التوالي. اذ بلغ معدل تركيزه في راشح العزلات الآنفة الذكر (43.59 ,18.24 ,0.59) ملغم/لتر على التوالي. اما بالنسبة للمواد الشبيهة بالاوكسينات فقد سجلت العزلة T.26 تفوقاً معنوياً في مقدرتها على انتاجها مقارنة مع العزلة T.28، اذ بلغ معدل تركيزها في راشح المزرعتين (22.3 ,0.06) ملغم/لتر على التوالي. اما العزلة T.9 فلم تظهر أي مقدرة على انتاج هذه المواد. ان سبب تباين هذه العزلات في مقدرتها على انتاج كلاً من المواد الشبيهة بالجبرلينات بالاوكسينات قد يعود إلى التباين الوراثي لهذه العزلات بما ينعكس على تباين بعض خصائصها البايولوجية (16). ان تسجيل انتاج هذه المواد الشبيهة بكل الجبرلينات والاوكسينات من قبل عزلات الفطر *T. harzianum* يعد تسجيلاً لاول مرة على مستوى البلاد. قد يعزى عدم تشخيص هذه المواد في دراسات سابقة خصصت للكشف عن المواد الايضية للفطر *Trichoderma spp.*، اما إلى عدم مقدرة العزلات المستخدمة على انتاج المواد الشبيهة بكل من الجبرلينات والاوكسينات او إلى الاهتمام بالمواد التي تعمل على تثبيط نمو المسببات المرضية كون هذا الفطر عرف واستعمل كعامل للمكافحة الاحيائية (22,15) ان هذه النتائج ترسم دوراً مهماً للمواد الشبيهة بالجبرلينات والاوكسينات المنتجة من عزلات الفطر *T. harzianum* في زيادة مختلف معايير نمو النباتات الملقحة بتلك العزلات، لاسيما وان دراسات عديدة اكدت فعالية الجبرلين المضاف في زيادة النسبة المئوية لانبات بذور القطن والحنطة(14,11) كما اكدت دراسات اخرى زيادة معدل ارتفاع النبات والوزن الخضري الطري لنباتي الكجرات والباميا المعاملة بحامض الجبرلين بالمقارنة مع النباتات غير المعاملة (4) و(5) كذلك فقد وجد (17) ان معاملة جذور النباتات المنقولة من المشتل بالاوكسينات تعمل على تقليل اثر الصدمة الناتجة من نقل النباتات وزادت من نمو النباتات المعاملة وعلى أي حال فان هذه النتائج تؤكد ما افترضه (23) و(7) و(12) و(16) من وجود عامل ما محفز للنمو ينتج من قبل انواع الفطر *Trichoderma spp.* في منطقة مهد البذور ليؤثر ايجابياً في تحفيز انبات البذور وزيادة نمو النباتات المدروسة.

**جدول 1.تركيز المواد الشبيهة بالجبرلينات والمواد الشبيهة بالاوكسينات في راشح بعض مزارع عزلات الفطر *Trichoderma spp.***

| العزلة | تركيز المواد الشبيهة بالجبرلينات (ملغم/ لتر) | تركيز المواد الشبيهة بالاوكسينات (ملغم/ لتر) |
|---|---|---|
| T.9 | 43.59 | 0.0 |
| T.26 | 18.24 | 22.3 |
| T.28 | 0.59 | 0.06 |
| L.S.D.(0.05) | 3.2 | 0.8 |

اما فيما يخص نتائج فحص الحيز الغازي لبيئة المزارع الفطرية للعزلات T.9, T.26, T.28, T.29 بجهاز المطياف الغازي Gas chromatography فقد تبين وجود غاز الاثلين في بيئة العزلات T.9, T.26, T.28 مما يعكس مقدرتها على انتاج الاثلين بينما لم تظهر العزلة T.29 أي قدرة على الانتاج، وعلى الرغم من كون هذا الاختبار نوعي وليس كمي لكن يمكن ملاحظة تباين منحنى الاثلين المنتج من كل منها اذ يلاحظ من الشكل (1) ان العزلتين T.9, T.26 تفوقت على العزلة T.28 في كمية الاثلين المنتج. ان هذه النتائج تؤكد ان الاثلين المنتج من عزلات الفطر *T. harzianum* يلعب دوراً في زيادة معايير نمو النباتات المعاملة بتلك

العزلات وهذا يتفق من نتائج عدة دراسات اثبتت زيادة انبات البذور المعاملة بالاثلين ونمو نباتاتها (20) و(19) وان هذه النتائج تتفق مع ما وجده (6) من امكانية بعض عزلات الفطر *Trichoderma spp.* على انتاج غاز الاثلين.




شكل 1. قابلية بعض عزلات الفطر *Trichoderma spp.* على انتاج الاثلين.

**المصادر**

1. الاحـــوال، كمال سالم. 1998. التغيرات فـــي المحتوى الهرموني والغذاء الداخلي وعلاقتها بتجذير اقلام بعض اصناف الزيتون. اطروحة دكتوراه. قسم البستنة. كلية الزراعة. جامعة بغداد. ع ص 98.

2. العاني، مؤيد رجب عبود. 1998. دراسة امكانية تمييز جنس النخيل في مرحلة البـــادرات باســـتخدام الهجرة الكهربائيـــة للبروتينـــات والمـــواد الـــشبيهة بالجبرلينات. اطروحة دكتوراه. قسم البـــستنة. كليـــة الزراعة. جامعة بغداد. ع ص 94.

3. حافظ، حميد زايـــر علـــي. 2001. المكافحـــة المتكاملة لمرض التعفن الفحمي على السمسم المتسبب عـــن الفطـــر *Macrophomina phaseolima*. رسالة ماجستير. قسم وقاية النبات. كلية الزراعـــة. جامعة بغداد. ع ص 115.

4. حسين، محمد صلاح، حامد محمد السعيد وسهير السيد الشريني. 1994. اســـتجابة نبـــات الكركديـــه لبعض منظمات النمو. مجلة البستنة. المركز القومي للبحوث الزراعية.جمهورية مصر العربية.21 (2) : 28-33.

5. حميد، فاخر رحيم. 2002. دراسة كفاءة الفطـــر *Trichoderma spp.* في استحثاث المقاومة ضـــد الفطر *Rhizoctonia solani* وتحفيز النمـــو فـــي اربعة اصناف من القطن. رسالة ماجستير. قسم وقاية النبات. كلية الزراعة. جامعة بغداد. ع ص 80.

6. عبود، هادي مهدي، حمود مهدي صالح وفرقـــد عبد الرحيم الراوي. 1991. بعض عوامل المكافحة الاحيائية كعوامل محفزة لنمو النبات. المجلة العراقية للاحياء المجهرية.(1): 178-181.

7. هدوان، حميد علي، سعود رشيد العـــاني، فـــاتن احمد سعيد وخلـــود علـــي حمـــاده. 1999. انتـــاج الجبرلين من الفطريات الخيطية. المـــؤتمر العلمـــي الثامن لجمعية المايكروبيولوجين العراقيين. بغداد 9-10 تشرين الثاني. 80-89.

8. Aboud, H. and F. A. Fattah. 1990. The effect of *Trichoderma* isolates on some plant growth parameters and parasitism of nematode. International Symposium on Biological Control. Antalya . Turkey. p 59 – 65.

9. Auge, R. M., A. J. W. Stodola، R. C. Ebel and X.Duan. 1995. Leaf elongation and water relations of mycorrhizal soghum in response to partial soil drying: Two *Glomus* species at varying phosphorus fertilization. J. Expt. Bot. 46: 297- 307.

10. Bird, I. S. and D. R. Ergle. 1961. Seedling growth differences of several cotton varieties and influences of Gibberllin. Agron. J. 53: 171-172.

11. Bjorkman, T., M. L. Bianchard and E. H. Gray. 1998. Growth enhancement of shrunken -2 (sh-2) sweet corn by *Trichoderma harzianum*: effect of environmental stress J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(1):35-40.

12. Danko, S. J. and M. E. Corden. 1984. Effect of ethanol on accumulation of antifungal compounds and resistance of tomato to *Fusarium oxysporum*. f. sp. Lycopersici. Phytopathology 74: 1472 – 1474.

13. Darr, B. L. and S. N. Saxena. 1971. Effect of the gibberllic acid presoaking seed treatment and different salinity regimes on germination, growth and yield attributes of hybrid maize (Ganga-3). Indian J. Agron. 16: 46-49.

14. Dennis, C. and J. Webster. 1971. Antagonistic of *'Trichoderma spp.* the production of volatile antibiotics. Trans. British Mycol. Soc. 57: 41-48.

15. Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol change inperceptions derived from research on *Trishoderma harzianum* T22.Plant Dis.Rep.84 (4) :377-393.

16. Lersel, M. V. 1998. Auxin affect posttrans plant shoot and root

growth of vinca seedling. HortSci. 33(7):1210-1214.

17. Jackson, A. 0. and C. B. Taylor. 1996. Plant microbe interaction: Life and death at the interface. The Pant Cell. 8: 1651-1668.

18. Ketring, D. L. and P.W.Morgan. 1970. Regulation of dormancy in Virginia-Type peanut seeds. Plant physiol. 45: 268-273.

19. Lazanyi, A. and I. Gabwiea. 1957. Ethylene, In F. B. Abeles (ed.) Plant Biology. Academic press. p. 111.

20. ackenzie, A. J., H. 0. Bonnie.W. S. Terri and T. W. Mark. 2000. Effect of delivery method and population size of *Trichoderma harzianum* on growth response of unrooted chrysanthemum cuttings. Can. J. Microbiol. 46:730-735.

21. Tamimi, K. M. and H. A. Hadwan. 1985. Biological effect of *Neurospora sitophila* and *Trichoderma harzianum* on growth of a range of sesamum wilt causing-fungi in vitro. Indian Phytopath. 38(2): 292-296.

22. Windham, M.,T. V. Elad and R. Baker. 1986. Amechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma spp*. Phytopath. 76: 518-521.