مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 22 (4) 2017
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

تأثير درجة الحرارة و الرقم الهيدروجيني في نمو وتبوغ العزلتين المحليتين لفطري المقاومة الحيوية *Metarhizium anisopliae* و *Beauveria bassiana* وفاعليتهما في انتاج الانزيمات المحللة

ايمن وليد خالد[1] ، صفاء زكريا بكر[1] ، هادي مهدي عبود[2]

[1] كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2] وزارة العلوم والتكنلوجيا ، بغداد ، العراق

E-mail:baker-safaa@yahoo.com E-mail:aymen_a19@yahoo.com

الملخص

اجريت دراسة مختبرية باستخدام عزلتين محليتين لفطري المقاومة الحيوية *M. anisopliae* و *B.bassiana* المعزولتين من تربة بساتين الحمضيات المصابة بذبابة فاكهة المتوسط *Ceratitis capitata* في بغداد لمعرفة تأثير اربع درجات حرارة مختلفة شملت 15 و 20 و 25 و 30°م و واربعة مستويات للرقم الهيدروجيني (pH) شملت5 و6 و 7 و8 في نمو وتجرثم العزلتين في وسط زرعي سائل فضلا عن دراسة فاعليتها في انتاج الانزيمات المحللة للبروتين والكايتين .

اظهرت نتائج الدراسة ان اعلى نمو للفطر *M. anisopliae* كان عند درجة حرارة 20 °م اذ بلغ وزن الكتلة الحيوية 1.19 غم وافضل تجرثم للفطر عند درجة حرارة 25 °م اذ بلغ10.3 ×10^4 بوغ /غرام ،بينما كان اعلى نمو وتجرثم للفطر *B.bassiana* عند درجة 20 °م اذ بلغت 1.11 غم و 2.7×10^4 بوغ /غرام على التوالي, وبينت النتائج ان اعلى وزن للكتلة الحيوية للفطرين الحيويين *M. anisopliae* و *B.bassiana* كان عند الرقم الهيدروجيني pH7 بلغ 5.92 و3.38 غرام على التوالي, وافضل تجرثم لهما عند الرقم الهيدروجيني pH5 اذ بلغت 3.9 ×10^4 و 3.8 ×10^4 بوغ /غرام كتلة حية على التوالي , و تفوقت عزلة الفطر *B. bassiana* في انتاج انزيمي الكايتنز والبروتيز بدلالة معدل قطر هالة التحلل الذي بلغ 15.76 و11.37 سم على التوالي مقارنة بعزلة الفطر *M.anisopliae* التي بلغ فيها قطر هالة التحلل 14.17 و 4.36 سم على التوالي.

الكلمات المفتاحية: تأثير، درجة الحرارة ، الرقم الهيدروجيني ، نمو ، تبوغ ، فطريات.

المقدمة

تعد المكافحة الإحيائية باستعمال المسببات الممرضة للحشرات احد الاتجاهات الحديثة و البديلة والصديقة للبيئة لإدارة الآفات الحشرية التي حظيت باهتمام الباحثين في العقود الأخيرة وحلاً علمياً وامينا لمكافحة العديد من الآفات الحشرية خاصةً بعد إدراك الإخطار الناجمة عن استخدام المبيدات الكيميائية, (1).لقد اشار العديد من الباحثين الى اهمية وفاعلية المسببات الممرضة للحشرات من فطريات وبكتريا وفايروسات وغيرها والتي تميزت بكونها متخصصة وامينه على الاحياء غير المستهدفة وتوافقيتها مع تقنيات انتاج المحصول خاصة المبيدات الكيمياوية والاسمدة الكيمياوية مما حقق نتائج مرضية في مكافحة العديد من الآفات الحشرية وخفضت معدل المعاملة لهذه المبيدات وقللت مخاطر التلوث البيئي واخرت ظهور المقاومة من قبل الحشرات ضد فعل المبيد الكيمياوية (2).

تؤدي الفطريات الممرضة للحشرات دورا رئيسيا في مكافحة الآفات الحشرية ضمن برامج الإدارة المتكاملة للآفات والتي تتميز بانخفاض كلفتها, وكفاءتها العالية وتخصصها وعدم استهدافها للإعداء الحيوية فضلا عن عدم تلويثها للنظام البيئي (3) وقد اشار العديد من الباحثين الى اهمية المكافحة الحيوية باستخدام الفطريات الممرضة للحشرات في مكافحة الاطوار الحشرية الكاملة وغير الكاملة من يرقات وحوريات فضلا عن الاطوار الساكنة من بيض وعذارى ساكنة (4،6،5) وجد ان عاملي المكافحة الحيوية *B. bassiana* و *M. anisopliae* ذات مدى عائلي واسع من الانواع الحشرية، و تم انتخاب سلالاتها الاكثر قابلية امراضية على الافة المستهدفة (7).

أشار (8) الى ان فاعلية المسببات الممرض للحشرات قد تنخفض إلى حد كبير تحت الظروف الحقلية نتيجة تأثرها بالعوامل البيئية مثل درجة الحرارة والرطوبة وأشعة الشمس والأمطار والاس الهيدروجيني, وان ,درجات الحرارة المثلى لنمو الفطريات تتراوح ما بين 16–30 درجة مئوية (9)، وذكر (10) ان عملية انتخاب السلالات الفطرية الممرضة التي لا تتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة والمنخفضة يعد من اهم الاعتبارات المهمة في انتاج مستحضرات تجارية تتصف بالثبات تحت مختلف الظروف, ووجد ان السلالات الفطرية المعزولة من مناطق تتصف بارتفاع درجات الحرارة فيها تكون متحملة وادائها افضل عند ارتفاع درجات الحرارة بينما السلالات المعزولة من مناطق باردة تكون متحملة وادائها افضل عند انخفاض درجات الحرارة ولذلك فان انتخاب سلالات فطرية محلية متأقلمة للظروف البيئية المحلية هو الافضل في انتاج مستحضرات تجارية من هذه الفطريات تتلاءم وظروف المنطقة المعزولة منها(11)، ووجد ان فطر المكافحة الاحيائية *M.anisopliae* يكون سائدا في التربة ذات الرقم الهيدروجيني (pH) أقل من (5.5 –6.0) وكان أعلى نسبة نمو للفطر عند الرقم الهيدروجيني 5.5 بينما اقل نمو للفطر عند الرقم الهيدروجيني 8.0 (12). ذكر الباحثون ان العمليات الزراعية مثل الحراثة تؤثر في فاعلية الفطريات الممرضة للحشرات بشكل كبير اذ

تصبح الكونيدات على سطح التربة معرضة للأشعة فوق البنفسجية لضوء الشمس ولدرجات الحرارة العالية مما يؤدي الى عدم انباتها واحداث الاصابة في الاطوار الحشرية المختلفة (13،14).

مواد وطرائق العمل

من خلال طرق العزل للفطريات الممرضة للحشرات من ترب بساتين الحمضيات المصابة بذبابة فاكهة المتوسط *Ceratitis capitata* في محافظة بغداد تم تشخيص ثلاثة عزلات لكل فطر من فطري المقاومة الاحيائية M. anisopliae و *B.bassiana* وبعد تقيم الفعالية الاحيائية للعزلات على يرقات ذبابة فاكهة المتوسط فقد تم انتخاب العزلات الاكثر فاعلية والتي حققت اعلى نسب قتل لليرقات هما:

1-العزلة M1 للفطر *M. anisopliae*

2-العزلة B1 للفطر *B. bassiana*

وتم اجراء دراسة فسلجية مختبرية للعزلتين M1 و B1 شملت ما يلي:

الاس الهيدروجيني الامثل لنمو وتجرثم العزلتين

استخدم الوسط الزرعي السائل PS مستخلص السكروز البطاطا لاختبار تأثير اربعة مستويات من pH هي 5, 6, 7, 8 على التوالي، اذ تم تحضير الوسط وذلك بأخذ 200 غرام من البطاطا بعد غسلها وتقطيعها الى قطع صغيرة تم وضعها في اناء معدني ثم اضيف اليها لتر ماء وغليت لمدة 30 دقيقة ثم اضيف 10 غم من السكر وبعدها رشحت بوساطة قطعة شاش نظيفة (تم تحضير 2 لتر من الوسط), ثم وزع الوسط في دوارق زجاجية حجم 500 مل بواقع 250 مل وسط لكل دورق واغلقت الدوارق بسدادات قطنية وعقمت في المؤصدة بدرجة حرارة 121°م و تحت ضغط 15 باوند \ انج2 ولمدة 30دقيقة ,ثم وزع الوسط السائل على دوارق سعه 250 مل (بواقع مل 100 مل/ دورق) وبثلاثة مكررات لكل مستوى وضبط الاس الهيدروجيني على (5, 6, 7, 8) باستعمال HCL و NAOH, اغلقت الدوارق بأحكام وبعد ذلك عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م و تحت ضغط 15 باوند \ انج2 لمدة 30 دقيقة(15) لقحت الدوارق بلقاح كل عزلة فطر بإخذ قطعة قطرها 0,5 سم من مزارع عمرها 7 ايام بعد ذلك حُضنت جميع الاطباق على درجة حرارة 25° م لمدة 15 يوم مع الرج اليومي للوسط, وبعدها تم فصل الكتل الحية للمزارع على ورق ترشيح وتركت لمدة ثلاثة ايام على درجة حرارة المختبر ومن ثم تم حساب الوزن الجاف للمزرعة الفطرية ثم بعد ذلك تم حساب معدل عدد الابواغ بإذابة المزرعة الفطرية الجافه في 100 مل ماء مقطر ومعقم وخلطه بجهاز الخلط الكهربائي لمده 5 دقائق تم زراعته 1مل على الوسط الزرعي PDA وحساب حيوية الابواغ معبرا عنه بعدد الوحدات المكونة للمستعمرة.(CFU).

درجة الحرارة المثلى للنمو واالتجرثم

استخدمت نفس طريقة تحضير الوسط الزراعي السائل المستخدم في اعلاه لتحضير الوسط الزرعي مع ضبط الاس الهيدوجيني على النمو الامثل والتجرثم لاختبار تأثير درجات الحرارة20,15 و 30,25°م. تم التلقيح بنفس الطريقة السابقة ، حضنت لمده اسبوع على درجات الحرارة المختبرية وبعد مرور اسبوع تم الفصل على ورق ترشيح وتركت لمد 3 ايام على درجه حرارة المختبر , ثم حسب الوزن الجاف للمزرعة الفطرية والتجرثم وحيوية الابواغ لكل معاملة(12).

قابلية الفطريات المعزولة على انتاج الانزيمات المحللة للبروتين والكايتين

1.تحضير الكايتين

استخدمت طريقة (16) لتحضير المحلول الغروي للكايتين والتي تتلخص بإذابة 10 غرام من المسحوق الكايتين الناعم (انتاج شركه سكما) في 120 مل من الحامض الفسفوريك (98%) على درجة حرارة الغرفة لمده ساعتين ويضاف 600 مل من الماء وببطء شديد مع التحريك المستمر الى ان يصبح على شكل كتله غروية و ثم يضرب بخلاط لإذابة الاجزاء غير الذائبة ويترك الى اليوم الثاني وتتم عملية غسل الكايتين الى ان يصبح pH المحلول 3 ويحفظ الى حين الاستعمال في الثلاجة على درجة حرارة 4 مئوية .ولحساب تركيز الكايتن في 1 مل من المحلول يأخذ 1 مل ويوضع في طبق بيتري جاف معروف الوزن ويوضع في فرن على درجة حرارة 5 ± 70 لمده 24 ساعة وتوزن الاطباق وهو جافة وبعدها تحسب المادة الجافة في 1مل وفق المعادلة التالية :

$$\text{وزن المادة الجافة/1 مل} = \frac{\text{وزن الطبق مع الكايتين الجاف} - \text{وزن الطبق فارغ}}{\text{1 مل محلول الغروي الكايتن}}$$

2. تحضير وسط الكايتين

تم تحضير وسط الكايتين الغذائي بإضافة 2 غرام الكايتين بدل من 2 غرام كلوكوز و 2 غرام من $NaNO_3$و 1 غرامKH_2PO_4 و 0.5 غرام $MgSo_4$ و 0.5غرام kcl و 15 غرام اكار الى لتر ماء (De-vries, 1952) عقم الوسط بوساطة جهاز الاوتوكليف على درجة حرارة 121°م وضغط 1 جو لتكون جاهزة لزراعة الفطر , لقحت الاطباق بأقراص قطر 5 سم من المزرعة الفطرية عمر سبعة ايام وزرعت في وسط الطبق قطر 9 سم وللفطرين *M. anisopliae* و *B. bassiana* وحضنت لمدة اسبوع على درجة حرارة 27±2°م ويتم بعد نمو قياس الهالة المتكونة بفعل نشاط الانزيم الكايتينز بطريقة (17).

3. تحضير وسط البروتين

يحضر وسط البروتين بإضافة 10 غرام كليكوز و 2غرام البيتون (كمصدر N وحيد) و 1 غرام KH_2PO_4 و 5.0 غرام Mgo_4 و5.0غرام kcl و 15 غرام اكار ماء بنفس طريقه (18) بأبدال NaNO3 كمصدر وحيد للنتروجين مثل البيبتون 2 غرام للتر وبعد التعقيم بدرجه حراره 121^0 واحد جو لمده 15 دقيقه وجهز الوسط في اطباق بتري زجاجية قطر 5سم. ولقح مركز كل طبق بلقاح الفطريات المختبرية بوضع قرص من المزارع الفطريات قطره 0.5 سم على PDA في مركز كل طبق وبثلاث مكررات لكل من الفطريات المحلية والتجارية *M. Anisopliae* و *B. Bassiana* وحضنت لمدة اسبوع

على درجة حرارة 27±2° م وبعد نمو تم قياس هالة التحلل المتكونة حول المستعمرة الفطرية المتكونة نتيجة نشاط الانزيم البروتينيز بطريقة (17).

التحليل الإحصائي

نفذت التجارب جميعاً وفقاً للتصميم كامل العشوائية Complete Random Design وتمت مقارنة المتوسطات حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 % (19).

النتائج والمناقشة

1- دراسة فسلجية للعزلات المحلية الفعالة وتحديد:

أ- درجة الحرارة الامثل لنمو وتجرثم عزلة الفطر *M.anisopliae*

اظهرت نتائج تأثير أربع درجات حرارية (15, 20 , 25, 30) ° م في نمو (وزن الكتلة الحية) و تجرثم الفطر بوغ /غرام كتله حية (جدول 1) ان درجة الحرارة 20 م° كانت الامثل في نمو الفطر اذ بلغ معدل الوزن الجاف 1.19 غرام مقارنة مع درجات الحرارة15 و25 و 30 °م التي بلغ عندها الوزن الجاف للفطر 0.71 , 0.68 و 0.67 غرام على التوالي, في حين كانت درجة الحرارة 25°م الامثل لتبوغ الفطر اذ بلغ اعلى معدل للأبواغ 10.3 × 10^4 بوغ/غرام مقارنة مع 10^4×5.5, 10^4×7.9 و 1,6 × 10^4 بوغ/غرام لدرجات الحرارة 20,15 و 30°م على التوالي .

يلاحظ من خلال النتائج ان الدرجة الحرارية المثلى لأعلى معدل وزن جاف للفطر *M.anisopliae* كانت عند 20 °م في حين انخفض هذا المعدل في الدرجات الحرارية 15 , 25 و30 °م وهذا ربما يعود الى كون النظام الحيوي من الفعاليات الايضية والأنظمة الانزيمية لهذه العزلة تكون بأقصى فعاليتها في درجة 20°م وان أي ارتفاع او انخفاض عن هذه الدرجة يؤدي الى خلل في النظام الحيوي لهذه العزلة مما يؤثر سلبا في نموها وبالتالي يتأثر سلبا معدل وزن الكتلة الحيوية ، وبينت نتائج الدراسة كذلك ان تبويغ عزلة هذا الفطر كان أقصاه في درجة حرارة 25 °م وليس ضمن حدود الدرجة المثلى للنمو الحضري (20°م) وقد يعزى ذلك الى ان تحفيز تكوين الابواغ يحدث في الدرجات الحرارية الأعلى من درجة الحراة التي يتطلبها النمو الحضري اذ يشرع الفطر بتكوين الابواغ كسلوك فسلجي لتأثره بدرجات الحرارة المرتفعة لتكوين الابواغ وهي التراكيب المقاومة للظروف البيئية المتطرفة، ولكن في درجات الحرارة الأعلى (30 °م) فان النظام الحيوي لعزلة الفطر يتأثر سلبا خاصة النظام الانزيمي الذي يتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة وبالتالي تنخفض قدرة العزلة على التبويغ وهذا يتزامن مع تأثير تلك الدرجة الحرارية في معدل وزن الكتلة الحيوية للفطر, و تتفق هذه النتائج مع (20) الذي وجد ان انتاج الابواغ الامثل للفطر *M. anisoplia* يقع ما بين 20-25 °م, اما ما يتعلق بتأثير درجات الحرارة في نمو الفطر (الوزن الجاف للفطر) فقد وجد (21) ان الكتلة الحية للفطر لـ*M.anisopliae* قد نمت بمدى حراري واسع ما بين 11 -32°م, واشار كل من (22) و(23) الى ان معدل النمو الامثل للفطر *M. anisoplia* عند 25م° و 30 م° على التوالي ، وتوصل(12) الى أعلى نسبة نمو للفطر *M. anisoplia* عند درجة الحرارة 25 °م اذ بلغ اكبر قطر للمستعمرة(25 ملم) واقل قطر للمستعمرة (6.54 ملم) عند درجة حرارة 30 °م.

جدول(1) تأثير درجة الحرارة في نمو وتجرثم الفطر *M.anisopliae* على الوسط الزرعي السائل ps

درجة الحرارة (°م)	معدل وزن الكتلة الحية الجافة للفطر (غم)	معدل عدد الابواغ الحية في الكتلة الحية ×10^4 (بوغ /غرام)
15	b0.71	ab5.5
20	a1.19	ab7.9
25	b0.68	a10.3
30	b0.76	b1.6

* الأرقام التي امامها الحروف المتشابهة ال في العمود الواحد لا توجد بينها فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %.

ب- عزلة الفطر *B.bassiana*

اظهرت النتائج في جدول(2) ان درجة الحرارة 20 م° كانت الامثل اذ بلغ اعلى معدل وزن جاف للفطر بلغ1.11 غرام مقارنه مع درجات الحرارة15 و25و 30 °م التي بلغ عندها الوزن الجاف للفطر 0.86 ,0.85 و0.84 غرام على التوالي , في حين كانت درجة الحرارة 20°م الامثل لتبوغ الفطر اذ بلغ اعلى معدل للأبواغ 2.7×10^4 بوغ/غرام مقارنة مع 1.8× 10^4, 1.6×10^4 و 0.87 ×10^4 بوغ/غرام لدرجات الحرارة 20,15 و 30°م على التوالي .

بينت نتائج الدراسة اعلى نمو وتبويغ لعزلة الفطر *B. bassiana* كان عند درجة حرارة 20°م وان أي ارتفاع او انخفاض عن هذه الدرجة يؤدي الى خلل في النظام الحيوي لهذه العزلة مما يؤثر سلبا في نموها وقدرتها على التبويغ ، وان نتائج الدراسة الحالية تتفق مع (24) الذي وجد ان افضل درجة حرارة لإنتاج الابواغ للفطر *B.bassiana* كانت 20°م, وتتفق مع (25) الذي وجد افضل وزن للكتلة الحية للفطر *B.bassiana* عنده درجة حرارة 20_ 25°م ولا يتفق مع (26) الذي وجد ان افضل معدل نمو للفطر و معدل انتاج الابواغ كان على درجه حراره 30 م° بينما كان التبوغ والنمو الخضري منخفضا لجميع سلالات الفطر *B.bassiana* عند 15° م.

جدول (2) تأثير درجة الحرارة في نمو وتجرثم الفطر *B.bassiana* على الوسط الزرعي السائل ps

درجة الحرارة (°م)	معدل وزن الكتلة الحية الجافة للفطر(غم)	معدل عدد الابواغ الحية في الكتلة الحية ×10^4 (بوغ /غرام)
15	a0.86	b1.8
20	a1.11	a2.7
25	a0.85	b 1.6
30	a0.84	c0.87

* الأرقام التي امامها الحروف المتشابهة ال في العمود الواحد لا توجد بينها فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %.

2- تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل للنمو والتجرثم

أ- عزلة الفطر *Metarhizium anisopliae*

اظهرت نتائج تأثير اربع مستويات من الاس الهيدروجيني(5 , 6 , 7 و8) في نمو (معدل وزن الكتلة الحية) وتجرثم الفطر *M.anisopliae* (جدول3) ان الاس الهيدروجيني الامثل (pH7) اذ بلغ اعلى معدل وزن للكتلة الحية 5,92 غرام مقارنة مع 5.51 و 5.53 غم عند الاس الهيدروجيني 5 و6 على التوالي والتي لم تختلف معنويا فيما بينها ,في حين كان اقل وزن للكتلة الحية للفطر عند الاس الهيدروجيني8 الذي بلغ 4.34غم, وبينت النتائج ان الاس الهيدروجيني 5 كان الامثل لتبوغ الفطر اذ بلغ اعلى معدل للأبواغ 3.9×10^4 بوغ /غرام مقارنة مع 1.3×10^4 و 1.1×10^4و 1.5×10^4 بوغ /غرام عند الاس الهيدروجيني 6 و7 و 8 على التوالي.

ان هذه النتائج تتفق مع (22) الذي وجد ان الاس الهيدروجيني pH7 الامثل لنمو *M.anisopliae* ولا تتفق مع (12) الذي وجد ان افضل اس هيدروجيني لنمو الكتلة الحية للفطر *M.anisopliae* كان5.5 , وجد ان النمو للفطر *M.anisopliae.* للكتلة الحية الأمثل في درجة الحموضة 5–8 (27) ، و يتفق مع (28) الذي سجل نمو محدد في الكتلة الحية للفطر*M.anisopliae.* عند الاس الهيدروجيني 8 , ووجد (29) ان درجة الحموضة المثلى اللازمة لنمو والتبوغ *M.anisopliae* ذات مدى واسع من درجات الحموضة .

جدول(3) تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) في نمو وتجرثم الفطر *M.anisopliae* على الوسط الزرعي PS

الرقم الهيدروجيني (pH)	معدل وزن الكتلة الحية الجافة للفطر (غم)	معدل عدد الابواغ الحية في الكتلة الحية $\times10^4$ (بوغ /غرام)
5	b5.51	a3.9
6	b5.53	b1.3
7	a5.92	b1.1
8	b4.34	b1.5

* الأرقام التي امامها الحروف المتشابهة في العمود الواحد لا توجد بينها فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %.

ب- عزلة الفطر *Beauveri bassiana*

اظهرت نتائج الدراسة في جدول(4) ان الاس الهيدروجيني الامثل لنمو الفطر ***B.bassiana*** كان pH7 اذ بلغ اعلى وزن للمادة الحية 3.38 غم مقارنة مع 3.16 و 2.79 غم عند الرقم الهيدوجيني 6 و 8 على التوالي التي لا تختلف معنويا فيما بينها , في حين كان اقل وزن للكتلة الحية عند الاس الهيدروجيني 5 الذي بلغ 2.24 غم, واوضحت النتائج ان الاس الهيدروجيني 5 كان الامثل لتبوغ الفطر الذي بلغ 3.8×10^4بوغ /غرام كتلة حية مقارنة مع 2×10^4 و 1.7×10^4 و 1.1×10^4 بوغ /غرام عند الرقم الهيدروجيني 6 و7 و 8 على التوالي.

ان هذه النتائج تتفق مع (27) الذي وجد ان النمو الأمثل للفطر *B.bassiana* عند الاس الهيدروجيني 5–8 ويتفق مع (30) الذين وجدوا ان الاس الهيدروجيني ما بين 6 – 8 هو الاكثر ملائمة لتبوغ الفطر *B.bassiana*, ويتفق مع (31) و (32) الذي وجدوا ان التبوغ الامثل كان عند PH6 , و يتفق مع (33), الذي وجد ان الاس الهيدروجيني 5.2 كان الأمثل لتبوغ الفطر *B.bassiana*.

يلاحظ من خلال النتائج ان قيمة الرقم الهيدروجيني الامثل للنمو الخضري بلغ 7 لكلا عزلتي الفطرين *M.anisopliae* و *B.bassiana* وذلك ربما يعزى الى ملائمة الفعاليات الايضية خاصة الانظمة الانزيمية لكلا العزلتين عند هذه القيمة , وتتأثر هذه الفعاليات الايضية عند ارتفاع أو انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط عن القيمة 7 في حين يلاحظ من خلال النتائج ان تبويغ كلا العزلتين كانت اقصاها عند الرقم الهيدروجيني 5 وذلك قد يعزى الى ان التركيب الوراثي للعزلتين وما ينعكس منه على الفعاليات الحيوية المسؤولة عن تكوين الابواغ تكون اكثر فاعلية وانتاجا للأبواغ عند هذه القيمة.

ان الرقم الهيدروجيني يؤدي دورا مهما في نمو الكائنات الحية المجهرية ومنها الفطريات حيث وجد ان معظم الفطريات تنمو بمدى من الرقم الهيدروجيني يتراوح بين 3–9 في حين ان الرقم الهيدروجيني الأمثل ينحصر بين pH6-pH5 (34) ، و يؤثر الرقم الهيدروجيني كثيراً في عملية نفاذية الأيونات عبر الغشاء الخلوي للكائنات الحية ومنها الفطريات اذ اشار العديد من الباحثين الى ان افضل حالة لنفاذية الأيونات الموجبة والسالبة عبر الغشاء البلازمي للفطريات يحدث عند الرقم الهيدروجيني الواقع بين 5.5-6, اما اذا زاد الرقم الهيدروجيني عن هذا المستوى فتحدث زيادة في نفاذية الأيونات الموجبة على حساب كمية الأيونات السالبة والعكس صحيح مما يخلق حالة من عدم التوازن في كميات الأيونات النافذة عبر الغشاء الخلوي وبالتالي ضعف نمو الفطر كما ان الرقم الهيدروجيني يؤثر في جاهزية العناصر المعدنية التي يحتاجها الفطر اذ ان الفطريات تستغل العناصر المعدنية بصورتها الأيونية وهذه الصورة تتوفر عندما يكون الرقم الهيدروجيني دون 7 , اما اذا كان الرقم الهيدروجيني اكبر من ذلك فتشكل العناصر المعدنية معقدات مع مركبات اخرى وبالتالي لا تكون جاهزة للفطر كعناصر المغنيسيوم والخارصين والفوسفات (35).

جدول (4) تأثير الرقم الهيدروجيني(pH) في نمو وتجرثم الفطر *B. bassiana* على الوسط الزرعي PS

الرقم الهيدروجيني (pH)	معدل وزن الكتلة الحية الجافة للفطر (غم)	معدل عدد الابواغ الحية في الكتلة الحية $\times10^4$ (بوغ /غرام)
5	b 2.24	a 3.8
6	a3.16	.0 b2
7	a3.38	b1.7
8	ab2.79	b1.1

* الأرقام التي امامها الحروف المتشابهة في العمود الواحد لا توجد بينها فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %.

3. قابلية العزلات على انتاج الانزيمات المحللة للبروتين والكايتين

اظهرت نتائج فعالية عزلات الفطرين *M.anisopliae* و *B. bassiana* في انتاج انزيمي الكايتنز والبروتيز (جدول5) , عن تفوق عزلة الفطر *B. bassiana* اذ سجلت اعلى معدل لانتاج انزيم الكايتنز والبروتيز بدلالة معدل قطر هالة التحلل الذي بلغ 15.76

و11.37 سم على التوالي مقارنة بقابلية الفطر *M.anisopliae* الذي سجل فاعلية اقل في انتاج هذه الانزيمات اذ بلغ قطر هالة التحلل 14.17 و 4.36 سم على التوالي .

ان هذه النتائج تتفق مع (36،37،38) الذين وجدوا ان العزلات المختلفة تتباين في القابلية على في انتاج انزيمي الكايتينز والبروتيز وان فعالية هذه العزلات ترتبط بفعالية هذه الانزيمات, وان انزيم الكايتينيز يعمل بتآزر مع انزيم البروتينز.

تعد أنزيمات chitinase و protease من عوامل ضراوة الفطرين *M.anisopliae* و *B. bassiana* في الاختراق واحداث الإصابة اذ تستطيع الفطريات من مهاجمة الحشرات من خلال افرازها لهذين الانزيمين فيعمل انزيم chitinase على تمثيل الكايتين الموجود في جدار الحشرات باطوارها المختلفة وكذلك يعمل انزيمprotease على تمثيل البروتينات الموجودة في جدار جسم الحشرات وبالتالي تتمكن هذه الفطريات من اختراق الجدار الذي يمثل او عامل لحماية جسم الحشرة، اذ بينت نتائج الدراسة الحالية ان عزلة الفطر *B. bassiana* كانت اعلى انتاجا لهذين الانزيمين وذلك ربما يعزى الى اختلاف في التركيب الوراثي باختلاف العزلات المدروسة كونها عزلات معزولة من البيئة المحلية وعليه فان عزلة الفطر *B. bassiana* تعد اكثر كفاءة في قدرتها التطفلية مقارنة بعزلة الفطر *M.anisopliae* بسبب كفاءة النظام الانزيمي المحلل لعزلة الفطر *B. bassiana* .

جدول(5) قابلية عزلات الفطرين *M.anisopliae* و *B. bassiana* على انتاج الانزيمات المحللة للبروتين والكايتين على درجه حرارة 27±2

العزلات	معدل قطر هالة التحلل (سم)	
	الكايتينز	البروتينز
M.anisopliae	b 14.17	b 4.36
B. bassiana	a15.76	a11.37

* الأرقام التي امامها الحروف المتشابهة الصغيرة في العمود الواحد لا توجد بينها فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5 %.

المصادر

1- Shah, P.A., and Goettel, M.S. (1999). Directory of microbial control products and Services, 2 nd edn . Division on microbial Control. Society, for invertebrate Pathology. Division on microbial Control, Gainesville, USA .P.81

2- Serebrov, V.V.; **Khodyrev, V.P.; Ge rber, O.N., and Tsvetkova, V.P. (2005**). Perspectives of combined use of entomopathogenic fungi and chemical insecticides Against Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) Mikologiya I Fitopatologiya, 39(3): 89- 98.

3- Lacey, L. A.; Frutos, R.; Kaya, H. K. and Vail, P. (2001). Insect pathogens as .biological Control agents: Do they have future? Biol. Contr., 21(3): 230-248.

4-Ujian, A.A. and S. Shahzad. (2007). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* Var. *Acridum* strains on Pink Hibiscus Mealy bug *Maconellicoccus hirsutus* affecting cotton crop. Pakistan J. Bot., 39 (3): 967-973.

5- Anand, R.; Prasad, B.and Tiwary, B.N. (2008). Relative susceptibility of *Spodoptera litura* Pupae to selected entomopathogenic fungi. Biocontrol, 54(1): 85-92.

6-Anand, R. and Tiwary B.N. (2009). Pathogenicity of entomopathogenic fungi to eggs and Larvae of *Spodoptera litura*, the common cutworm. Biocontrol Sci. Technol., 19(9): 919- 929.

7-GabartyA.; Salem H.M.; Fouda M.A.; Abas A. A. and Ibrahim A.A. (2014). Pathogenicity Induced by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Agrotis ipsilon* (Hufn.). Journal of Radiation Research and Applied Sciences ,7: 95-100.

8-Ment, D; Gindin, G.; Glazer, I; Perl, S; Elad, D. and Samish, M. (2010). The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs .J.Fungal Biol., 114: 49–56.

9- Ferron P, Fargues J, and Riba G. (1991). Fungi as microbial insecticides against pests,.. In DK Arora, L Ajello, KG Mukerji (eds) 2: 665-705.

10-Inglis GD, Goettel, M.S. and, Butt TM, Strasser H (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp 23–55.

11- Fernandes, E.K.; Rangel, D.E.; Moraes, A.M.; Bittencourt, V.R. and Roberts, D.W. (2008). Cold activity of *Beauveria and Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria.* Journal of Invertebrate Pathology 98: 69-78.

12- Sachin, K.; R.L. Parate, S.S. Mane and V.V. Deshmukh. (2012). Influent of nutrition and different physical parameters on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Science, Environment and Technology,1. (5): 479 – 484.

13- Jaronski, S. (2007). Soil ecology of the entomopathogenic ascomycetes: a critical Examination of what we (think) we know. In: S. Ekesi & N.K. Maniania (Eds.) *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management. Research Signpost* 37/661(2):91-144.

14- Meyling, N. and Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biological Control 43: 145-155.

15- Huxham, I.M. and Lackie, A.M. (1988). Behavior invitro of separated fractions of heamocytes of the locust *Schisticerca gregaria* .Cell Tissue Res. 251 : 677 – 684 .

16- Godoy, G., Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G., (1982) Parasitism of Heterodera glycines

and Meloidogyne arenaria by fungi from cysts of H. glycines. Nematropica.. 12:111 - 119.

17- Sadik, S.k.; AL- Taweel, D. and hyeab, N.S. (2011). New Computer Program for Estimating Leaf Area of Several Vegetable Crops. American - Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. 5 (2): p304-309.

18- De -Vries, G.A. (1952). Contribution to knowledge of the *genus Cladosporium* Link ex. Fr. Vitgeverij & Drukkerij. Hollandia Press Baarn.

19-الراوي، خاشع وعبد العزيز خلف الله، (1980) تصميم وتحليل التجارب الزراعية 3 دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل. ص488.

20- Maniania, N.K., (1993). Effectiveness of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. for the control of the stem borer Chilo partellus in maize in Kenya. Crop. Prot. 12: 601-604.

21- Ouedraogo, A.; Fargues, J.; Goettel, M.S. and Lomer, C.J. (1997). Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and M. *flavoviride*, j. Mycopathologia. 137: 37-43.

22- Soundarapandian., P and Chandra, R. (2007). Mass Production of Endomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the Laboratory. Research Journal of Microbiology. 2: 690-695.

23- John, E. H. and Naresh, M. (1999). Water and Temperature relations of Growth of the *Entomogenous Fungi Beauveria* bassiana, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*, Journal of Invertebrate Pathology, 74: 261–266.

24- Houping Liu, Margaret Skinner, Michael Brownbridge, Bruce L Parker. (2003). Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, Lygus lineolaris (Hemiptera: Miridae), Journal of Invertebrate Pathology,82 : 139–147.

25- Leland, j. E. (2005) Characteristies of*Beauveria bassiana* Isolates from *Lygus lineolaris* Populations of Mississippi. J. Agric. Urdan Entomol.2:57-71.

26-العمري،سلام عباس وكامل سلمان جبر و حمزه كاظم الزبيدي ومصطفى البوحسيني.(2011). تأثير درجات الحرارة على نمو وتبرعم الفطر (Bals.vuill.) *Beauveri bassiana*, مجلة الزراعة العراقية. 16 (6) 115-121.

27- Hallsworth J. E. and Magan N. (1996). Culture Age, Temperature, and pH affect the Polyol and Trehalose Contents of Fungal Propagules. J. Appl. Environ. Microbiol. vol. 62: 2435-2442.

28- Raymond J. St Leger, Judd O. Nelson, Steven E. Screen.(1999). The entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity, J. Microbiology, October 145: 2691- 2699.

29- Knudsen, G.R,; Eschen, D.J.; Dandurand, L.M. and Wang, Z.G. (1991). Method to Enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. Applied Environ. Microbiol, 57: 2864-2867.

30- Karthikeyan A, Shanthi V, Nagasathya A. (2008). Effect of different media and pH on the growth of *Beauveria bassiana* and its parasitism on leaf eating caterpillars. Res. J. Agric. Biol. Sci. 4:117–119.

31- Subramanian, C. and Punamalai, G..**(2013).** Optimization process for blastospore production of *Beauveria bassiana* isolates in poly ethylene glycol (peg) supplemented medium. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 2(11): 114-122.

32- Teng. C. (2015). Studies on the Biology of *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. With Reference to Microbial Control of Insect Pests, Acta Botanica Sinica, 10 (3): 8-9.

33- Tuan Anh Pham; Jeong Jun Kim; Seon Gon Kim and Keun Kimcorresponding author.(2009). Production of Blastospore of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a Submerged Batch Culture, Journal List Mycobiologyv. (3) 218–224.

34- Isabel, M.; Roncero, G.; Antonio, D.; Carmen, R. M.; Dolores, H.G.M.; Garcia Maceira, F.I. Emesa, M., Angles, C.; Rocio, S.Z.; Conch .H.; (2000). Role of cell wall degrading enzymes in pathogenicity of Fusarium oxysporium. Rev. Iberoam Micol.,17 ; 547-553 **.**

35- Kavanagh, K., (2005). Fungi: Biology and Application John Wiley and Sonsltd, the Atrium, Southern Gate, chichester, westsussex PO4,. England..

36.Subhash C. Gupta; Timothy D. Leathers; Galal N. El-Sayed and Carlo M. Ignoffo. (1991). Production of degradative enzymes by *Metarhizium anisopliae* during growth on defined media and insect cuticle, J. Experimental Mycology.15: 310–315.

37- Sun, Chul Kang; Sanggyu Park and Dong Gyu Lee. (1999). Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae*, Journal of Invertebrate Pathology.73: 276–281.

38- Weiguo Fang; Bo Leng; Yuehua Xiao; Kai Jin; Jincheng Ma; Yanhua Fan; Jing Feng; Xingyong Yang; Yongjun Zhang and Yan Pei. (2005). Cloning of *Beauveria* bassiana Chitinase Gene Bbchit1 and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence Appl. Environ. Microbiol. 7(1):363-370.

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)
مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 2017 (4) 22

Effect of temperature and pH on growth and sporulation of both Local isolates of biological control fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*

Ayman W. Khaled[1] , Safaa Z.Baker[1] , Hadi M.i Abboud[2]

[1] *College of Agriculture , Tikrit University , Tikrit , Iraq*
[2] *Ministry of Science and Technology , Baghdad, Iraq*

Abstract

A laboratory study was conducted by using two local isolates of biological control fungi *M. anisopliae* and *B.bassiana* that isolated from the soil of citrus orchards that infested with Mediterranean fruit fly *Capitata ceratiris* in Baghdad to know the effect of four different temperatures included 15, 20, 25 and 30 ° C and four levels of the pH, including 5, 6, 7 and 8 on the growth and sporulation of two local isolates on liquid medium. Results showed that the highest growth of the fungus *M. anisopliae* was at 20° C, average dry weight was1.19 gm and best sporulation of the fungus at 25°C ,it was 10.3×10^4 spore/g, while was higher growth and sporulation for *B. bassiana* at 20 °C , they were 1.11 gm and 2.7×10^4 spore / g, respectively, the results showed that the highest dry weight for *M. anisopliae* and *B.bassiana* was at /pH 7,they were 5.9 and 3.38 gm respectively, and the best sporulation for them when the pH5 ,they were 3.9×10^4 and 3.8×10^4 spore /g respectively, the isolated fungus *B. bassiana* surpass in the production of both chitinase and proteinase enzymes depending on decomposition aureole diameter, they were 15.76 and 11.37 cm, respectively, compared to *M.anisopliae* which amounted 14.17 and 4.36 cm respectively.

key words: Effect, temperature, pH, Growth, sporulation, fungi.