الكشف عن انتاج اندول حامض الخليك IAA والجبرليك GA_3 في راشح عزلات محلية من بعض الفطريات المحفزة لنمو النبات

أزهر حميد فرج [1] صباح لطيف علوان [2]

استاذ مساعد استاذ

[1]قسم المحاصيل الحقلية/ كلية الزراعة – جامعة واسط.

[2] قسم وقاية النبات / كلية الزراعة – جامعة الكوفة.

البريد الالكتروني:aaltaie@uowasit.edu.iq

المستخلص:

نفذت الدراسة في مختبرات كلية الزراعة – جامعة الكوفة لتقييم قدرة الفطريات المحفزة لنمو النبات على انتاج الهرمونات النباتية في رواشحها وفي ظروف الحضن المتحرك Shaking incubator والساكن Static incubator ، والتي اثبتت كفاءة عالية في تحفيز نمو النباتات الملقحة بها على انتاج الهرمونات النباتية الاندول استك اسد (IAA) وحامض الجبرلين (GA_3) . هدفت الدراسة الى التحري مختبريا عن قدرة عزلات محلية من الفطريات المحفزة للنمو وهي : **A-7** (*Aspergillus fumigatus*) و **A-D-1** (*A. niger*) فضلاً عن العزلة **T-113** من الفطر (*Trichoderma hamatum*) ، لتقدير كمية ونوعية الهرمونات المنتجة وبالتالي اعتمادها كمصدر لانتاج الهرمونين والذي بدوره يمكن ان يبحث امكانية استخدام رواشح تلك الفطريات الحاوية على الهرمونين بشكل مباشر على النبات واختبار تاثيراته في دراسات لاحقة.

اظهرت نتائج الدراسة أن الفطريات الثلاث الفعالة في تحفيز وتشجيع النمو A-D-1 و A-7 و T-113 انتجت الهرمونين IAA و GA_3 المحفزين لنمو النبات ، حدد الهرمون IAA من خلال محتوى راشح العزلات الفطرية المضاف إليه 1000 مايكروغرام.لتر$^{-1}$ Tryptophan كبادئ لتصنيع الهرمون في ظروف الحضن المتحرك 120 Shaking دورة دقيقة$^{-1}$ والساكن ، وفي فترات الحضن الممتدة لـ 5 و10 و15 يوماً على التوالي في درجة حرارة 28± 2مْ. تميز الفطر A-D-1 بأعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون حيث بلغ 153.3 ملغم.لتر$^{-1}$ تلاه الفطر A-7 بمتوسط بلغ 137.8 ملغم.لتر$^{-1}$ ، في حين سجلت العزلة الفطرية T-113 أقل متوسط بلغ 90 ملغم.لتر$^{-1}$ في ظروف الحضن المتحرك . وفيما يخص ظروف الحضن الساكن فقد ظهرت العزلة الفطرية A-7 بأعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون بلغ مقداره 1211 ملغم.لتر$^{-1}$ تلتها العزلة الفطرية A-D-1 بمتوسط بلغ 221 ملغم.لتر$^{-1}$ ، أما العزلة الفطرية T-13 فقد ظهرت بأقل متوسط بلغ 118 ملغم.لتر$^{-1}$. أما إنتاج الهرمون GA_3 ، فقد حدد من خلال محتوى راشح الفطريات في ظروف الحضن المتحرك 150 Shaking دورة / دقيقة والساكن ، وخلال فترات الحضن الممتدة لمدة 7 و14 و21 يوماً على التوالي عند درجة حرارة 28± 2مْ ، ظهر الفطر A-7 باعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون حيث بلغ

2.018 ملغم.لتر$^{-1}$ تلاه الفطر A-D-1 بمتوسط بلغ 0.742 ملغم.لتر$^{-1}$ ، أما العزلة الفطرية T-113 فقد ظهرت باقل متوسط بلغ 0.698 ملغم.لتر$^{-1}$ بعد مرور 21 يوماً في ظروف الحضن المتحرك . أما في ظروف الحضن الساكن فقد ظهر الفطر A-7 بأعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون حيث بلغ 2.433 ملغم.لتر$^{-1}$ تلاه الفطر A-D-1 بمتوسط بلغ 0.477 ملغم.لتر$^{-1}$، أما العزلة الفطرية T-113 فقد ظهرت بأقل متوسط بلغ 0.443 ملغم.لتر$^{-1}$.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus. Fumigatus* ، *Aspergillus. niger* ، *Trichoderma* spp ، IAA ، GA_3

*** البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول**

Detection of Indole Acetic Acid and Gibberelic acid in culture filtrate of some local plant growth promoting fungi

Azher Hameed Altaie[1] **Sabah Lateef Alwan[2]**

Assistant Professor **Professor**

[1] Department of Field Crops /College of Agriculture / University of Wasit.

[2] Department of plant protection / College of Agriculture / University of Kufa.

Email address: aaltaie@uowasit.edu.iq

Abstract:

The study aimed at investigated the ability of local isolates of plant growth promoting fungi: A-7 (*Aspergillus fumigatus*) , AD-1 (*A. niger*) and T-113 isolates of *Trichoderma hamatum*, to production of plant hormones, indole acetic acid (IAA) and Gabriellene (GA_3) .The study was conducted in the laboratories of the Faculty of Agriculture - University of Kufa to evaluated ability of these fungi to produce plant hormones in their filtrate in shaking and static incubation..

It was found that three fungal A-D-1, A-7 and T-113 produced IAA and GA_3 hormones in both shaking (120 r.min^{-1}) and static incubation for 5, 10 and 15 days respectively at 28 $\pm$2 C. the fungus A-D-1 has a highest average for filtrate content of IAA 153.3 mg .L^{-1}, followed by A-7 with 137.8 mg .L^{-1}, while isolation T-113- has lowest average 90 mg .L^{-1} in shaking incubation conditions. In static incubation condition, fungus A-7 has highest average of filtrate content of IAA hormone 1211 mg.L^{-1}, followed by A-D-1 221 mg .L^{-1}, while the isolate T-113- has lowest average with 118 mg.L^{-1}.

Production of GA_3 hormone identify through fungal filtrate content in both shaking 120 r.min^{-1} and static incubation for 7, 14 and 21 days respectively at 28 $\pm$2 C. the fungus A-7 has a highest average of filtrate content of GA_3 hormone with 2.018 mg .L^{-1}, followed by A-D-1 with an average 0.742 mg .L^{-1}, while isolate T-113 has lowest average 0.698 mg.L^{-1} after 21 days in shaking incubation conditions. In static incubation condition, isolate A-7 has highest average of filtrate content of GA_3 hormone 2.433 mg L^{-1}, followed by isolate A-D-1 0.477 mg /l, while the isolate T-113 has lowest average 0.443 mg .L^{-1}.

Keywords: *Aspergillus. Fumigatus* ، *Aspergillus. niger* ،*Trichoderma* spp ، IAA ، GA_3

المقدمة:

تعد هرمونات النمو النباتية Plant Growth Hormones من المواد العضوية التي تنتج طبيعياً في النباتات الراقية حيث تسيطر على النمو والفعاليات الفسلجية وهي قادرة على التأثير في الاتصال بين الخلايا بكميات قليلة جداً (14) . إن هناك خمسة أنواع رئيسة من الهرمونات المنظمة لنمو النبات وهي : الأوكسينات Auxins و الجبريلينات Gibberellins و السايتوكاينينات Cytokinin و الاثيلين Ethylene و الحامض Abscisic acid . وقد ذكر (17) أن أهم أوكسينات النبات وهو الاندول حامض الخليك (IAA) أكتشف لأول مرة في راشح الفطر *Rhizopus suinus* حتى قبل أن يتعرف عليه في النباتات . في حين يعد حامض الجبرليك Gibberelic acid (GA_3) من أهم الجبريلينات الذي يعمل كهرمون طبيعي لنمو النبات ، و اكتشف في مستخلص الفطر *Gibberella fujikuroi* الذي تسبب استطالة غير طبيعية للمسافات بين العقد في نبات الأرز المصاب بهذا الفطر ، كما أنه واسع الاستخدام في الزراعة والمشاتل وزراعة الانسجة (18) .

إنّ IAA و GA_3 من المواد الايضية الثانوية التي تعد من المنتجات الحيوية المهمة التي تنتج تجارياً من الفطريات للصناعة الزراعية والبستنية ، وتساهم مختلف الجبريلينات في الكثير من عمليات النمو والتطور في النبات مثل انبات البذور واستطالة الساق والتزهير وتطور الثمار ، في حين ان اندول حامض الخليك يعد اهم انواع الأوكسينات كونه يسرع من نمو الجذور وزيادة حجمها (16). إن كلفة انتاج GA_3 حددت من استخدامه كمنظم نمو للنبات ، ماعدا النباتات عالية القيمة، وإن تقليل كلفة انتاجه يمكن ان يقود إلى استخدامه بشكل أوسع ولاصناف عدة من المحاصيل (13).

وجد (4) ان هناك محفزاً لنمو الجذور في راشح الوسط الغذائي للفطر *Aspergillus terreus* ، كما ذكر Işıl(12) ان كلاً من IAA و GA_3 هي نتائج ايض ثانوية للفطريات ، تفرز بواسطة الأحياء الدقيقة قريبا من نهاية طور النمو أو خلال طور الثبات Stationary phase ، إذ تبيّن من الدراسة ان انتاج كل من IAA و GA_3 من قبل الفطر *Aspergillus niger* في الوسط الغذائي Czapek-Dox broth كان في اليوم 6 و 12 على التوالي ، في حين كانت أفضل درجة حرارة لانتاج الهرمونين هي 25 و 30 مْ على التوالي ، كما ظهر أن الحضن المتحرك قد زاد من كمية انتاج كلا الهرمونين ، في حين أن النمو قد ازداد في الحضن الساكن فيما يخص الهرمون IAA . (10) ان ارتفاع تركيز الهرمون GA_3 في راشح الفطر *Aspergillus niger* كان بعد 15 يوماً عند درجة حرارة 28 مْ قد يعود إلى تحلل المايسيليوم في الطور الأخير من النمو. واشار Gravel وجماعته (9) أن الفطر *Trichoderma atraviride* أنتج مستويات عالية من IAA في وجود (200 مايكوغرام . لتر$^{-1}$) من Tryptophan.

ونظراً لأهمية هذا الموضوع ، فقد هدفت الدراسة إلى التحري مختبريا عن قدرة عزلات محلية من الفطريات المحفزة للنمو لانتاج الهرمونات النباتية اندول حامض الخليك وحامض الجبرليك بهدف تقدير كمية ونوعية

الهرمونات المنتجة وبالتالي اعتمادها كمصدر لانتاج الهرمونين والذي بدوره يمكن ان يبحث امكانية استخدام رواشح تلك الفطريات الحاوية على الهرمونين بشكل مباشر على النبات واختبار تاثيراته في دراسات لاحقة.

المواد وطرائق العمل:

نفذت الدراسة في مختبرات كلية الزراعة جامعة الكوفة ، استخدمت في هذه الدراسة ثلاث عزلات من الفطريات المحفزة لنمو النبات وهي : **A-7** (*Aspergillus. fumigatus*) و **A-D-1** (*A. niger*) فضلاً عن العزلة **T-113** (*Trichoderma hamatum*)، تم الحصول عليها من مجمل المجتمع الاحيائي للمخلفات النباتية المتحللة (لمحاصيل الحنطة والشلب وكوالح الذرة الصفراء وسعف النخيل ومخلفات جذور عرق السوس بعد الاستخلاص)، حيث اثبتت كفاءة عالية في في تحفيز نمو النباتات الملقحة بها في دراسة سابقة (3) . ومن اجل التحري مختبريا عن قدرة تلك العزلات الفطرية على انتاج الهرمونات النباتية اندول حامض الخليك وحامض الجبرليك ، اجري الآتي:

1 . اندول حامض الخليك Indol Acetic Acid (IAA)

أخذ قرص بقطر 5 ملم من الفطريات المحفزة للنمو والمزروعة في الوسط الغذائي P.D.A بعمر 5 أيام وزرع في قناني زجاجية سعة 250 مل حاوية على 100 مل من الوسط الغذائي المعقم Czapek-Dox broth مضاف اليه $1000\ \mu g\ mL^{-1}$ من tryptophan ، حضنت القناني في درجة حرارة 28±2 م لمدة 5 ايام في حاضنة هزازة (shaking incubator) 120 دورة .دقيقة $^{-1}$.

أخذ 5 مل من راشح الفطريات باستعمال محقنة طبية معقمة ورشح على ورق ترشيح (Whatman filter paper No.40) ثم باستخدام مرشح دقيق (ملي بور قياس 20) ووضع في انبوبة اختبار ثم في جهاز الطرد المركزي على سرعة 8000 دورة. دقيقة $^{-1}$ لمدة 10 دقائق. أخذ 1 مل من الراشح ومزج مع 2 مل من كاشف Salkowski المتكون من ($1\ ml - 0.5\ M\ feCL_3 + 50\ ml - 35\%\ HCLO_4$) وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 25 دقيقة (8). نفذت التجربة بثلاثة مكررات لكل فطر اما معاملة المقارنة فاحتوت على الوسط الغذائي مضاف له Tryptophan فقط . كررت العملية نفسها بعد مرور 10 و 15 يوماً على التوالي.

حدد انتاج الاوكسين باستخدام جهاز المطياف الضوئيUV Spectrophotometer عند 530 نانومتر (6). ولأجل معرفة تأثير الحضن المتحرك في انتاج الاوكسين ، نفذت التجربة اعلاه بدون حركة الوسط الغذائي وكانت التجربتان متوازيتان وفي نفس الوقت والظروف.

2. حامض الجبرليك (GA_3)

حضرت الفطريات المحفزة للنمو وزرعت في قناني زجاجية سعة 250 مل حاوية على 100 مل من الوسط المعقم Czapek-Dox broth بمتوسط قرص واحد بقطر 5 ملم من مستعمرات نامية على الوسط الوسط الغذائي P.D.A بعمر 5 أيام لكل قنينة ، و حضنت القناني في درجة حرارة 28±2 م° لمدة 7 ايام في ظروف

ظلام في حاضنة هزازة 150 دورة . دقيقة $^{-1}$. رشح بعدها الوسط الغذائي باستخدام ورق ترشيح (Whatman filter paper No.40) ثم باستخدام مرشِح دقيق (ملي بور قياس 20) ، أخذ 5 مل من الراشح ووضع في قمع فصل سعة 100 مل واكمل الحجم الى 10 مل باضافة الماء المقطرالمعقم ثم ضبط pH للمحلول الى 2.5 باستخدام حامض 1N HCl . أضيف اليه 20 مل من Ethylacetate ورج القمع جيدا لمدة دقيقة واحدة للسماح بفصل الطبقات ومن ثم نقلت الطبقة المائية السفلى للفصل مرة اخرى . كررت عملية الاستخلاص باستخدام 20 مل اخرى من Ethylacetate وتم التخلص من الطبقة المائية وجمعت طبقات Ethylacetate في قمع الفصل الاول . اعيد استخلاص حامض الجبرليك من طبقة Ethylacetate باستخدام 20 و 15 و 10 مل من محلول الفوسفات المنظم phosphate buffer (pH:7.4) (المكون من اذابة 47.7 غم من $Na_2HP0_4.12H_2O$ و 4.53 غم من KH_2P0_4 وفي 250 مل ماء وخفف في 2.5 لترماء مقطر معقم) وبشكل متتال حيث رج المحلول لمدة دقيقة واحدة وجمعت الكميات المستخلصة في دورق سعة 50 مل . واكمل محتوى الدورق الى 50 مل باضافة محلول الفوسفات المنظم.

بعدها اخذ 20 مل المحلول المستخلص ونقل الى دورقين سعة 100 مل وأضيف لكل منهما 10 مل من الكحول المطلق. أُكمل حجم احد الدوارق الى 100 مل باضافة حامض HCL (35%) وتم قياس الامتصاصية للنماذج بعد 80 دقيقة عند درجة حرارة 20$\pm$1مْ مباشرة باستخدام UV Spectrophotometer عند 254 نانومتر . أما الدورق الثاني فقد أضيف اليه 35 مل من حامض HCL المخفف (5%) واكمل الحجم بالماء ، بعدها مباشرة تم قياس الامتصاصية باستخدامUV Spectrophotometer عند 254 نانومتر (11).

تم اجراء التجربة بثلاثة مكررات لكل فطر . واعيدت العملية نفسها بعد مرور 14 ، 21 يوماً.

قيس حامض الجبرليك باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer UV عند 254 نانومتر(7) برسم منحنيات لانتاج العزلات الفطرية للاوكسين وقورنت مع المنحنى القياسي لحامض الجبرليك . ولاجل معرفة تأثير الحضن المتحرك في انتاج الحامض ، نفذت التجربة اعلاه بدون حركة الوسط الغذائي وكانت التجربتان متوازيتان وفي نفس الوقت والظروف .

حللت نتائج الدراسة باستخدم التجربة العاملية وبتصميم تام التعشية CRD واستخدم اختبار أقل فرق معنوي LSD عند مستوى اختبار (P>0.01) لمقارنة النتائج (2). واستعمل البرنامج الاحصائي Genstat والبرنامج Microsoft Excel في تحليل البيانات ورسم الاشكال البيانية.

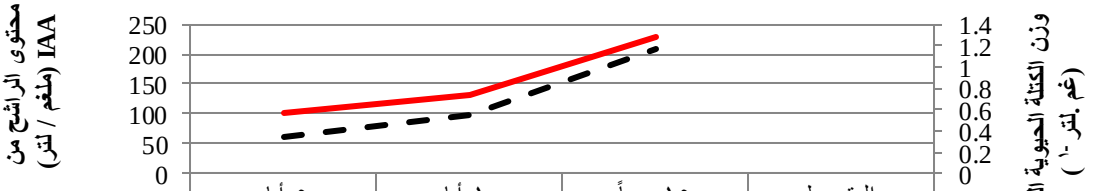
النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج الدراسة ان الفطريات المحفزة للنمو انتجت الهرمون IAA والذي حدد من خلال محتوى راشح الفطريات المضاف اليه 1000 ملم . لتر$^{-1}$ Tryptophan كبادئ لتصنيع الهرمون في الظروف المختبرية. اظهر التحليل الأحصائي وجود اختلافات احصائية معنوية في محتوى الراشح من الهرمون IAA للفطريات

الثلاث في ظروف الحضن المتحرك Shaking incubation 120 دورة. دقيقة $^{-1}$ وفي فترات الحضن الممتدة لـ (5 و 10 و15 يوماً) على التوالي في درجة حرارة 28± 2 مْ (الشكل- 1). اذ تبيّن النتائج ان الفطر A-D-1 تميّز بأعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون IAA اذ بلغ 153.3 ملغم .100 مل $^{-1}$ تلاه الفطر A-7 بمتوسط بلغ 137.8 ملغم .100 مل $^{-1}$ ، أما الفطر T-113 فقد ظهر بأقل متوسط بلغ 90 ملغم. 100مل $^{-1}$ بعد مرور 15 يوماً في ظروف الحضن المتحرك . أما انتاج الهرمون خلال فترات الحضن المتحرك من 5 -15 يوماً ، فقد أوضحت النتائج وجود اختلافات احصائية معنوية بين فترات الحضن المتحرك وانتاج الهرمون IAA (الشكل- 1) حيث كان أعلى متوسط لانتاج الهرمون بعد 15 يوماً اذ بلغ 165 ملغم.100 مل $^{-1}$ ، في حين كان متوسط انتاج الهرمون 96.1 و 120 ملغم.100 مل $^{-1}$ في اليوم 5 و 10 على التوالي .

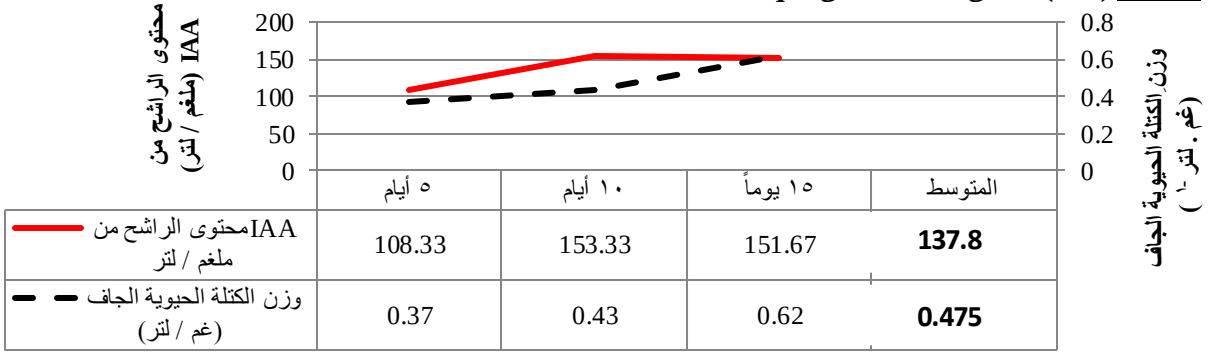
كما يتضح أيضاً وجود تأثير معنوي للتداخل بين الفطريات الثلاث وبين فترات الحضن المختلفة في وزن الكتلة الحيوية وكذلك في محتوى الراشح من الهرمون IAA في ظروف الحضن المتحرك 120 دورة . دقيقة $^{-1}$ ، اذ تفوقت معاملة التداخل باستعمال الفطر A-7 بعد 5 أيام من الحضن اذ بلغت0.37 غم.لتر $^{-1}$ و 108.3 ملغم/لترعلى التوالي والفطر A-D-1 بعد 10 و 15 يوماً من الحضن في أعلى متوسط لوزن الكتلة الحيوية بلغ 0.54 و 1.16 غم.لتر $^{-1}$ على التوالي ، في حين تفوقت معاملة التداخل باستعمال الفطر A-7 بعد 5 و10 أيام من الحضن والفطر A-D-1 بعد 10 أيام من الحضن في أعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون IAA بلغ 108.3 و 153.3 و 130 ملغم.لتر $^{-1}$ على التوالي على بقية التداخلات مقارنة مع بقية المعاملات .

الفطر - *Aspergillus niger*(A-D-1)



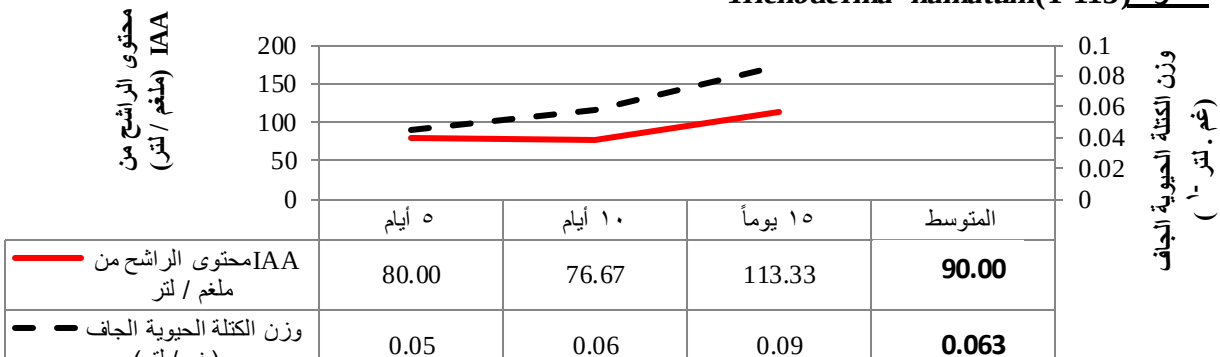
	٥ أيام	١٠ أيام	١٥ يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من IAA ملغم / لتر	100.00	130.00	230.00	**0.678**
وزن الكتلة الحيوية الجاف (غم / لتر)	0.33	0.54	1.16	**153.33**

الفطر - *Aspergillus. fumigatus*(A-7)



	٥ أيام	١٠ أيام	١٥ يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من IAA ملغم / لتر	108.33	153.33	151.67	**137.8**
وزن الكتلة الحيوية الجاف (غم / لتر)	0.37	0.43	0.62	**0.475**

الفطر - *Trichoderma hamatum*(T-113)



	٥ أيام	١٠ أيام	١٥ يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من IAA ملغم / لتر	80.00	76.67	113.33	**90.00**
وزن الكتلة الحيوية الجاف (غم / لتر)	0.05	0.06	0.09	**0.063**

الحضن المتحرك	وزن الكتلة الحيوية الجاف(غم . لتر $^{-1}$)	محتوى الراشح من IAA ملغم . لتر $^{-1}$
L.S.D 1% بين العزلات	**0.060**	**38.02**
L.S.D 1% بين فترات الحضن	**0.060**	**38.02**
L.S.D 1% للتداخل بين العزلات وفترات الحضن	**0.104**	**65.86**

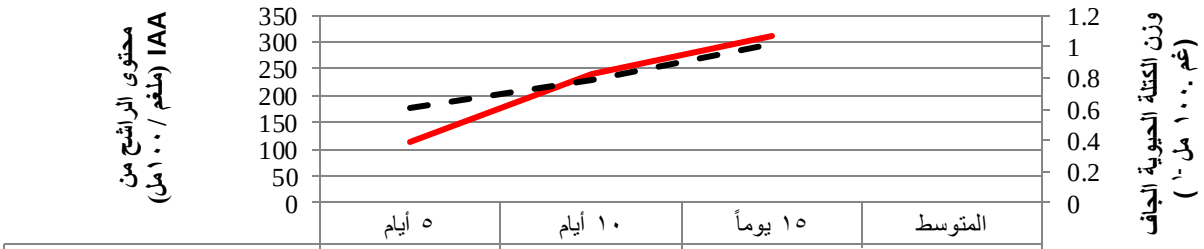
الشكل 1: انتاج الهرمون اندول حامض الخليك IAA من العزلات الفطرية الثلاث خلال فترات مختلفة في الحضن المتحرك 120 دورة. دقيقة $^{-1}$ في درجة حرارة 28±2 م°

أما انتاج الفطريات الثلاث للهرمون IAA في ظروف الحضن الساكن Static وفي فترات الحضن الممتدة لـ 5 و 10 و15 يوماً على التوالي في درجة حرارة 28± 2 مْ ، فقد أوضحت النتائج وجود اختلافات احصائية معنوية في محتوى الراشح من الهرمون IAA للفطريات الثلاث في ظروف الحضن الساكن وفي فترات الحضن الممتدة لـ 5 و 10 و15 يوماً على التوالي في درجة حرارة 28± 2 مْ (الشكل- 2) . حيث يتبيّن ان الفطر A- 7 تميّز بأعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون IAA اذ بلغ 1211 ملغم. 100 مل $^{-1}$ تلاه الفطر A-

D-1 متوسط بلغ 221 ملغم. 100 مل $^{-1}$ ، أما الفطر T-113 فقد تميّز بأقل كمية في متوسط بلغ 118 ملغم. 100 مل $^{-1}$ بعد 15 يوماً في ظروف الحضن الساكن . أما انتاج الهرمون خلال فترات الحضن من 5 -15 يوماً فقد أوضحت النتائج وجود اختلافات احصائية معنوية بين فترات الحضن الساكن وانتاج الهرمون IAA (الشكل- 2)، حيث كان أعلى متوسط لانتاج الهرمون في اليوم 15 بلغ 700 ملغم.100 مل $^{-1}$، في حين كان متوسط انتاج الهرمون 290 و 560 ملغم .100 مل $^{-1}$ في اليوم 7 و 10 أيام على التوالي .

كما ظهر أيضاً وجود تأثير معنوي للتداخل بين الفطريات الثلاث وبين فترات الحضن المختلفة في وزن الكتلة الحيوية وكذلك في محتوى الراشح من الهرمون IAA في ظروف الحضن الساكن ، اذ تفوقت معاملة التداخل باستعمال الفطر A-D-1 بعد 5 و 10 و 15 يوماً من الحضن في أعلى متوسط لوزن الكتلة الحيوية اذ بلغ 0.61 و 0.79 و 1.01 غم. لتر $^{-1}$ على التوالي ، في حين تفوقت معاملة التداخل باستعمال الفطر A-7 بعد 5 و10 و 15 يوماً من الحضن في أعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون IAA ب 673.3 و 1236.6 و 1633.3 ملغم. لتر $^{-1}$ على بقية التداخلات مقارنة مع بقية المعاملات .

الفطر - *Aspergillus niger*(A-D-1)

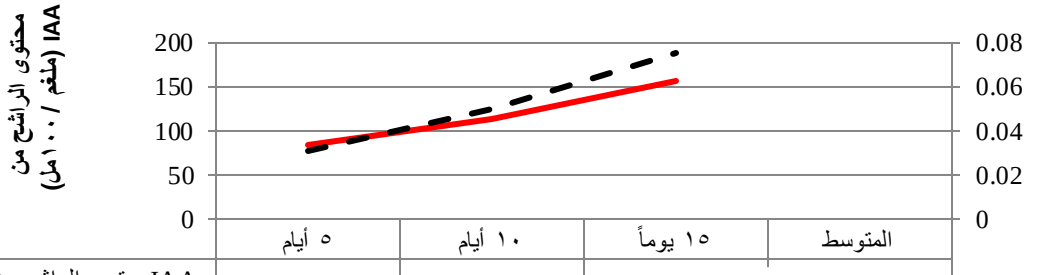


	٥ أيام	١٠ أيام	١٥ يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من IAA ملغم / لتر	113.33	240.00	310.00	**221.00**
وزن الكتلة الحيوية الجاف (غم / لتر)	0.61	0.79	1.01	**0.805**

الفطر - *Aspergillus fumigatus*(A-7)

	٥ أيام	١٠ أيام	١٥ يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من IAA ملغم / لتر	673.33	1326.67	1633.33	**1211.00**
وزن الكتلة الحيوية الجاف (غم / لتر)	0.30	0.48	0.70	**0.493**

الفطر - *Trichoderma hamatum*(T-113)



الحضن الساكن	وزن الكتلة الحيوية الجاف(غم / لتر)	محتوى الراشح من IAA ملغم / لتر
L.S.D 1% بين العزلات	0.036	165.5
L.S.D 1% بين فترات الحضن	0.036	165.5
L.S.D 1% للتداخل بين العزلات وفترات الحضن	0.063	286.7

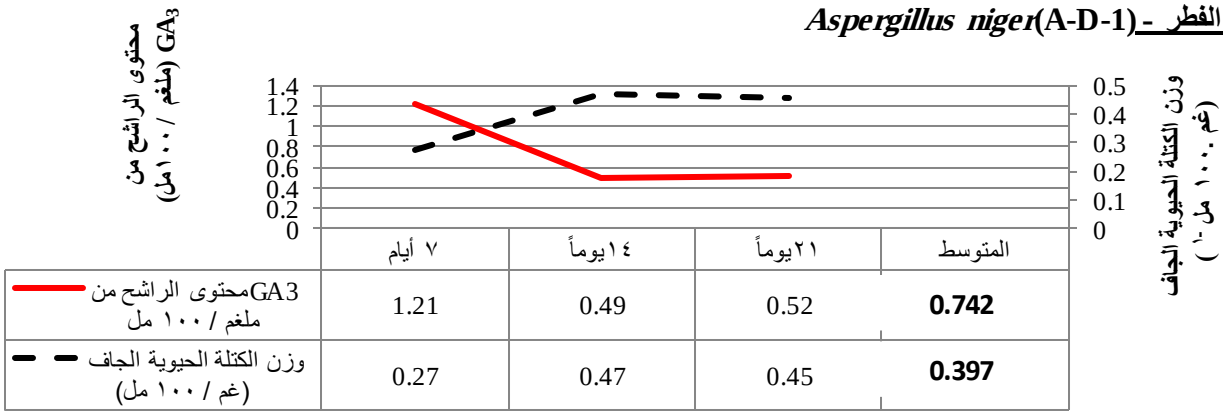
الشكل 2 : انتاج الهرمون اندول حامض الخليك IAA من الفطريات الثلاث خلال فترات مختلفة في الحضن الساكن في درجة حرارة 28±2 م°

ولابد من الأشارة هنا الى ان أعلى متوسط لانتاج الهرمون في ظروف الحضن المتحرك (الشكل -1) كان في اليوم 15 فيما يخص الفطرين A-D-1 و T-113 اذ بلغ 230 و 113.3 ملغم .100 مل$^{-1}$ على التوالي ، في حين كان أعلى متوسط لانتاج الهرمون فيما يخص الفطر A-7 في اليوم 10 حيث بلغ 153.3 ملغم .100 مل$^{-1}$. واستمرت النتائج نفسها في ظروف الحضن الساكن (الشكل - 2) ، اذ بلغ أعلى متوسط لانتاج الهرمون بعد 15 يوماً 310 و 156.6 ملغم .100 مل$^{-1}$ فيما يخص كل من الفطرين A-D-1 و T-113 على التوالي في حين كان أعلى متوسط انتاج للهرمون فيما يخص الفطر A-7 عند 10 أيام اذ بلغ 1326.6 ملغم .100 مل$^{-1}$.

أظهرت نتائج الدراسة ان جميع الفطريات الثلاث المحفزة للنمو انتجت الهرمون GA_3 المحفز لنمو النبات الذي حدد من خلال محتوى راشح الفطريات في الظروف المختبرية . واظهر التحليل الأحصائي وجود اختلافات احصائية معنوية في محتوى الراشح من الهرمون GA_3 للفطريات الثلاث في ظروف الحضن المتحرك Shaking incubation 120 دورة .دقيقة$^{-1}$ وفي فترات الحضن الممتدة لمدة 7 و 14 و21 يوماً على التوالي في درجة حرارة 28± 2 مْ (الشكل - 3) . حيث تبيّن ان الفطر A-7 قد تميّز بأعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون GA_3 حيث بلغ 2.018 ملغم .100 مل$^{-1}$ تلاه الفطر A-D-1 بمتوسط بلغ 0.742 ملغم .100 مل$^{-1}$، أما الفطر T-113 فقد تميّز بأقل كمية في متوسط بلغ 0.698 ملغم.100 مل$^{-1}$

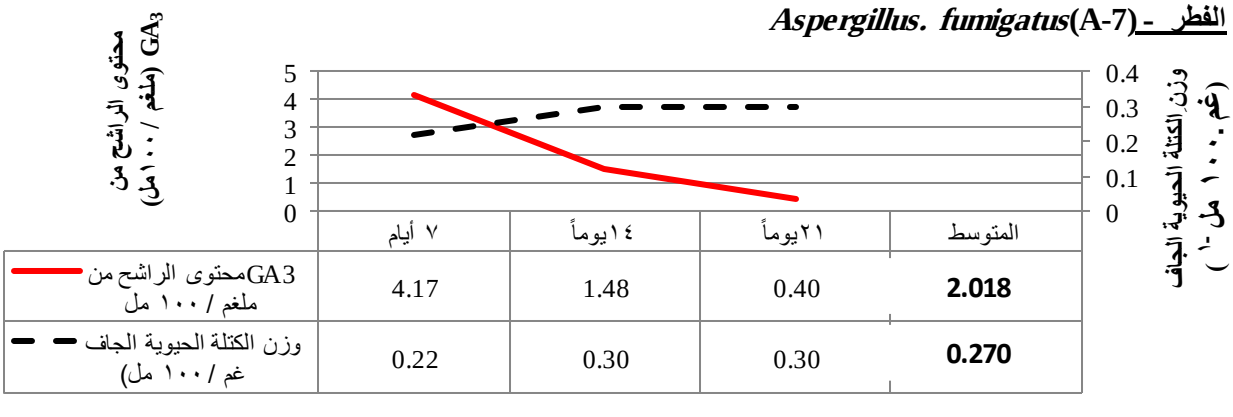
بعد مرور 21 يوماً في ظروف الحضن المتحرك . كما أوضحت النتائج وجود اختلافات احصائية معنوية بين فترات الحضن المتحرك وانتاج الهرمون GA_3 (الشكل – 3) اذ كان أعلى متوسط لانتاج الهرمون في اليوم 7 بلغ 2.250 ملغم .100 مل$^{-1}$، في حين بلغ 0.773 و 0.430 ملغم .100 مل$^{-1}$ في اليوم 14 و21 على التوالي . كما ظهر أيضاً وجود تأثير معنوي للتداخل بين العزلات الفطرية الثلاث الفعالة وبين فترات الحضن المختلفة في وزن الكتلة الحيوية وكذلك في محتوى الراشح من الهرمون GA_3 في ظروف الحضن المتحرك ، اذ تفوقت معاملة التداخل باستعمال الفطر A–D–1 بعد 7 و 14 و 21 يوماً من الحضن في أعلى متوسط لوزن الكتلة الحيوية ، في حين تفوقت معاملة التداخل باستعمال الفطر A–7 بعد 7 و14 يوماً من الحضن ثم الفطر A–D–1 بعد 21 يوماً من الحضن في أعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون GA_3 على بقية التداخلات مقارنة مع بقية المعاملات.

الفطر - *Aspergillus niger*(A-D-1)

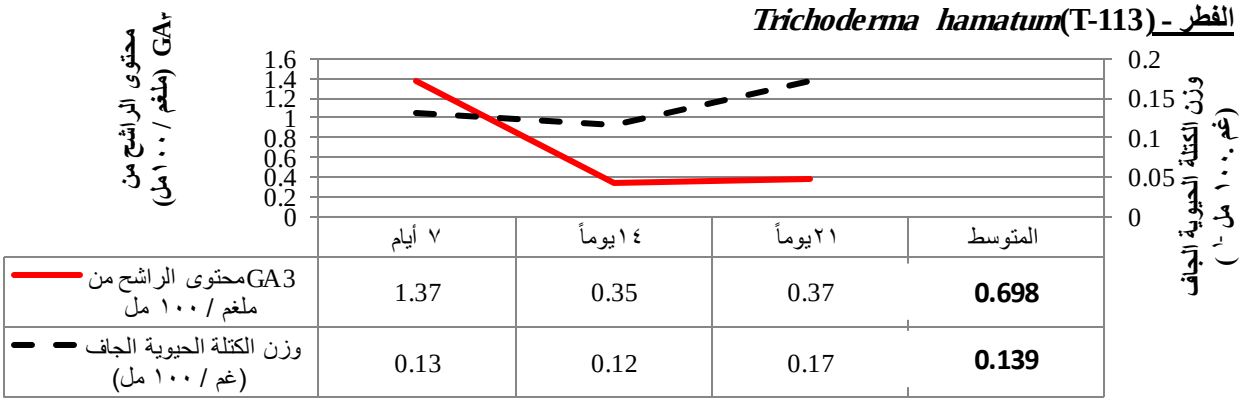


	٧ أيام	١٤يوماً	٢١يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من GA3 ملغم / ١٠٠ مل	1.21	0.49	0.52	**0.742**
وزن الكتلة الحيوية الجاف (غم / ١٠٠ مل)	0.27	0.47	0.45	**0.397**

الفطر - *Aspergillus. fumigatus*(A-7)



	٧ أيام	١٤يوماً	٢١يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من GA3 ملغم / ١٠٠ مل	4.17	1.48	0.40	**2.018**
وزن الكتلة الحيوية الجاف غم / ١٠٠ مل)	0.22	0.30	0.30	**0.270**



الحضن المتحرك	وزن الكتلة الحيوية الجاف(غم / 100 مل)	محتوى الراشح من GA_3 ملغم / 100 مل
L.S.D 1% بين العزلات	0.031	0.377
L.S.D 1% بين فترات الحضن	0.031	0.377
L.S.D 1% للتداخل بين العزلات وفترات الحضن	0.054	0.653

الشكل 3 : انتاج هرمون الجبرليك GA_3 من الفطريات الثلاث خلال فترات مختلفة في الحضن المتحرك 120 دورة / دقيقة في درجة حرارة 28±2 م°

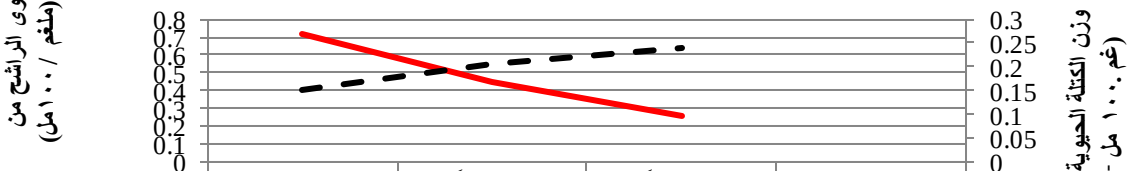
أما انتاج الفطريات الثلاث للهرمون GA_3 في ظروف الحضن الساكن Static وفي فترات الحضن الممتدة لـ 7 و 14 و21 يوماً على التوالي على درجة حرارة 28± 2 مْ ، فقد أظهرت النتائج وجود اختلافات احصائية معنوية في محتوى الراشح من الهرمون GA_3 للفطريات الثلاث في ظروف الحضن الساكن وفي فترات الحضن الممتدة لـ 7 و 14 و21 يوماً على التوالي في درجة حرارة 28± 2 مْ (الشكل – 4) . حيث يتبيّن أن الفطر A–7 تميّز بأعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون GA_3 اذ بلغ 2.433 ملغم / 100 مل تلاه الفطر A–D–1 بمتوسط بلغ 0.477 ملغم.100 مل$^{-1}$، أما الفطر T–113 فقد ظهر بأقل متوسط بلغ 0.443 ملغم.100 مل$^{-1}$ في ظروف الحضن الساكن. أما انتاج الهرمون خلال فترات الحضن الساكن فقد أوضحت النتائج وجود اختلافات احصائية معنوية بين فترات الحضن الساكن وانتاج الهرمون GA_3 (الشكل–4) اذ بلغ أعلى متوسط لانتاج الهرمون في اليوم 14 بـ 1.567 ملغم /100 مل ، في حين بلغ 1.496 و 0.291 ملغم.100 مل$^{-1}$ في اليوم 7 و21 على التوالي.

كما ظهر أيضاً وجود تأثير معنوي للتداخل بين الفطريات الثلاث وبين فترات الحضن المختلفة في وزن الكتلة الحيوية وكذلك في محتوى الراشح من الهرمون GA_3 في ظروف الحضن الساكن ، اذ تفوقت معاملة التداخل باستعمال الفطر A–7 بعد 7 أيام من الحضن ثم الفطر A–D–1 بعد 14 و 21 يوماً من الحضن في أعلى متوسط لوزن الكتلة الحيوية ، في حين تفوقت معاملة التداخل باستعمال الفطر A–7 بعد 7 و14 يوماً

من الحضن ثم الفطر T-113 بعد 21 يوماً من الحضن في أعلى متوسط لمحتوى الراشح من الهرمون GA_3 على بقية التداخلات مقارنة مع بقية المعاملات .

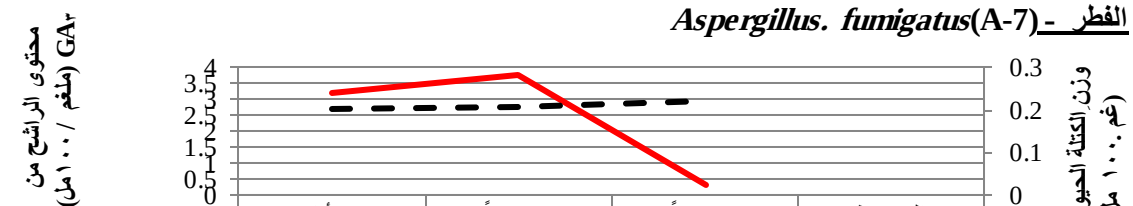
ولابد من الأشارة هنا الى أن أعلى متوسط لانتاج الهرمون في ظروف الحضن المتحرك (الشكل -3) كان في اليوم 7 فيما يخص الفطريات A-7 و T-113 و A-D-1 اذ بلغ 4.17 و 1.37 و 1.21 ملغم / 100 مل على التوالي . في حين كان أعلى متوسط لانتاج الهرمون في ظروف الحضن الساكن (الشكل- 4) بعد 7 أيام فيما يخص الفطرين A-D-1 و T-113 اذ بلغ 0.72 و 0.57 ملغم.100 مل$^{-1}$على التوالي ، في حين كان أعلى متوسط لانتاج للهرمون بالنسبة للفطر A-7 في اليوم 14 اذ بلغ 3.80 ملغم .100 مل$^{-1}$.

الفطر - *Aspergillus niger*(A-D-1)



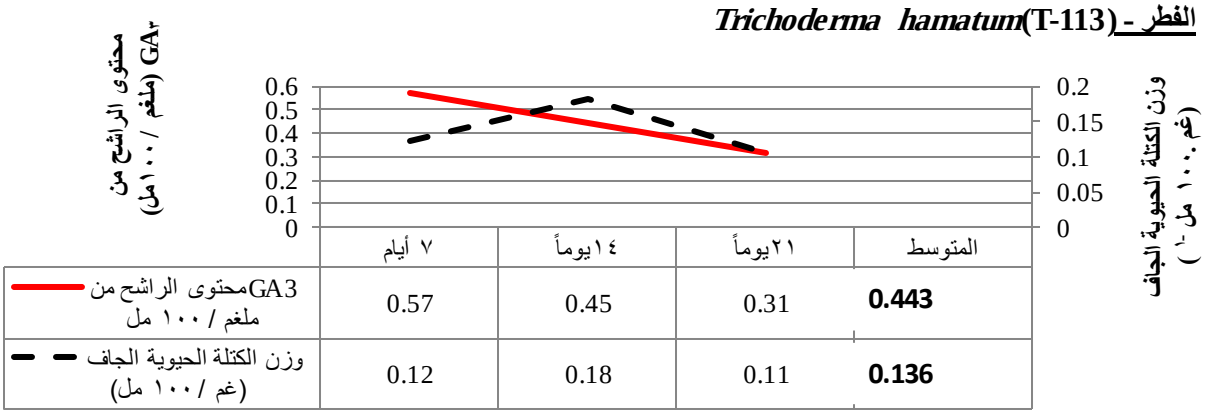
	٧ أيام	١٤يوماً	٢١يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من GA3 ملغم / ١٠٠ مل	0.72	0.45	0.26	**0.477**
وزن الكتلة الحيوية الجاف (غم / ١٠٠ مل)	0.15	0.21	0.24	**0.200**

الفطر - *Aspergillus. fumigatus*(A-7)



	٧ أيام	١٤يوماً	٢١يوماً	المتوسط
محتوى الراشح من GA3 ملغم / ١٠٠ مل	3.20	3.80	0.30	**2.433**
وزن الكتلة الحيوية الجاف (غم / ١٠٠ مل)	0.20	0.21	0.22	**0.209**

الفطر - *Trichoderma hamatum*(T-113)



الحضن الساكن	وزن الكتلة الحيوية الجاف(غم / 100 مل)	محتوى الراشح من GA_3 ملغم / 100 مل
L.S.D 1% بين العزلات	0.014	0.243
L.S.D 1% بين فترات الحضن	0.014	0.243
L.S.D 1% للتداخل بين العزلات وفترات الحضن	0.025	0.421

الشكل 4 : انتاج هرمون الجبرليك GA_3 من الفطريات الثلاث خلال فترات مختلفة في الحضن الساكن في درجة حرارة 28±2 م°

يتضح من نتائج الدراسة ان كلا الهرمونين IAA و GA_3 الذين يعدان من نواتج الأيض الثانوية للفطريات ، تفرز بالقرب من نهاية طور النمو أو خلال طور الثبات stationary phase (الشكل – 1 و2) و(الشكل – 3 و4) ، لذلك يتوقع ان يكون وقت انتاج مثل هذه الهرمونات طويلاً . ويتبيّن أيضاً ان انتاج كلا الهرمونين قد زاد في ظروف الحضن الساكن ولكن النمو كان كبيرا في الحضن الساكن في حالة الهرمون IAA (الشكل – 3 و4) أما في حالة الهرمون GA_3 كان النمو كبيرا في ظروف الحضن المتحرك أكثر من الساكن ، وهذا يتفق مع النتائج التي ذكرها (12) اذ ذكر ان النمو كان الأعلى في ظروف الحضن الساكن للهرمون IAA المفرز من قبل الفطر *Aspergillus niger* لكنه لايتفق مع نتائجهم التي تشير الى ان انتاج الهرمون كان الأعلى في ظروف الحضن المتحرك لكلا الهرمونين IAA و GA_3 على التوالي.

كذلك تتفق نتائج الدراسة مع نتائج مماثلة حول انتاج الهرمون IAA من قبل الفطر *Aspergillus niger* اذ درس لمدة من 5-16 يوماً وكان أعلى انتاج للهرمون في الوسط الغذائي السائل Czapek Dox broth المضاف اليه 0.1 % tryptophan في اليوم السادس من الحضن (5). كما ذكر (10) ان ارتفاع تركيز الهرمونين IAA و GA_3 في الراشح الفطري بعد 15 يوماً من الحضن ربما بسبب تحلل المايسيليوم في الطور الأخير من النمو وهذا يقود الى ان رشح الهرمونين من الفراغ يزيد تركيزهما في الراشح . كما وجد ان انتاج الهرمون كان في اقصاه عند 28 مْ .

إن اسباب تباين العزلات الفطرية في مقدرتها على انتاج كلا الهرمونين IAA و GA_3 يعود الى التباين الوراثي لهذه العزلات بما ينعكس على تباين بعض خصائصها البايلوجية (1) . وقد ذكر (10) أن الهرمون GA_3 يمكن ان يشبه فعل الأنزيمات المحللة التي تحفز عملية تحلل المواد المخزونة ، وقد ذكر أيضاً انه من المهم دراسة انتاج الهرمونات النباتية وتحليل علاقتها الداخلية بين النباتات والأحياء الدقيقة الذي يمكن ان يساعد في توضيح التأثير المفيد للفطريات تجاه النبات العائل.

لقد عرفت الفطريات المحفزة لنمو النبات Plant growth promoting fungi (PGPF) بانتاجها مواد مفيدة من مركبات الأيض الثانوي ، اذ إن الفطريات التي لها القدرة على تحفيز وتشجيع نمو النبات يكون جزءاً من قدرتها ناتجاً عن انتاجها للهرمونات النباتية مثل الأندول حامض الخليك (IAA) والسايتوكاينين و المواد المحفزة الأخرى لنمو النبات والتي منها ما يحسن قدرة العائل على امتصاص العناصر الغذائية مثل الفسفور والنتروجين . كما إن تلك الفطريات (PGPF) تشترك مع جذور النبات وتفرز أيضاً العديد من مركبات الأيض الثانوية مثل حامض الجبرليك (GA_3) في المجموع الجذري ، وذكر العديد من الباحثين أن افراز حامض الجبرليك كان من تلك الفطريات و بيّن هؤلاء الباحثين اهمية حامض الجبرليك المنتج من قبل الفطريات ودوره في نمو وتطور النبات ولاسيما في ظروف نقص العناصر الغذائية (15) .

Refrences:

1. **Abood, H. M.; Abood, M. R. and Saeed, F. H. (2008)** Detection of Gibbrellins and Auxins like compound and the phytohormone and ethylene in culture filtrate of three isolates of *Trichoderma harzianum*. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*,39 (2)12-18.
2. **Al-Rawei, k. M. and Khalaf Allah, A.M. (1980)** Design and Analysis of agriculture experiments. Ministry of higher education and scientific research. House of book press university of Baghdad. 488 pp
3. **Altaie, A. H. (2014)** Effect of *Aspergillus* spp and *Trichoderma hamatum* on growth of Cucumber *Cucumis sativus* planting in compost soilless culture. PhD thesis. College of Agriculture. University of kufa.
4. **Atsumi, S.; Tomohisa I.; Miyako K.; Sumiyo T.; Ryou I.; Michimasa T.;Shozo F. and Yasuo K.(2004)** 4-Hydroxykigelin and 6-Demethylkigelin, Root growth promoters, produced by *Aspergillus terreus.* Z. Naturforsch. 59c, 218-222.
5. **Bilkay, I.S.; S. Karakoc and Aksoz,N. (2010)** Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. Turk. J. Biol., 34: 313-318.
6. **Brick, J.M.; Bostock, R.M. and Silverstone, S.E. (1991)** Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 535-538.

7. **Bruckner, B. and Blechschmidt D. (1991)** The gibberellin fermentation. Crit Rev Biotechnol 11: 163-192.
8. **Gordon, S.A. and Weber ,R. P. (1951)** Colorimetric estimation of Indole Acetic Acid. Plant Physiol. 26: 192-195.
9. **Gravel, V.; Antoun, H. and Tweddell, J.(2007)** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of Indole Acetic Acid (IAA). **Soil Biology** & **Biochemistry**, 39: 1968-1977.
10. **Hasan, H.A. (2002)** Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium intraction. *Acta Microbiol. Immunol. Hung*., 49: 105-118.
11. **Holbrook, A.; Edge, W. and Bailey,F.(1961)** Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. **Advanced Chemistry Set**, 28: 159-67.
12. **Işıl, S.; Şafak, B. K. and A. Nilüfer (2010)** Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. *Turkish Journal of Biology*, 34: 313-318.
13. **Linnemannstons, P.; Schulte,J. ; Prado, M.; Proctor,R. H.; Avalos ,J. and Tudzynski ,B. (2002)**. The polyketide synthase gene *pks4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. *Fungal Genet Biology*, 37, 134-148.
14. **Ma, Z.; Ge, L. and ASY. Lee (2008)** Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Analytica **Chimica Acta***, 610: 274-281.
15. **Muhammad, H.; Khan ,S. A.; Iqbal, L.; Ahmad , B. and I. J. (2010)** Isolation of a gibberellins producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and growth promotion of crown daisy (*Chrysanthemum coronarium*). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 (1):202-207.
16. **Nakamura, A.; Umemura , I.and K. Gomi (2006)** Production and characterization of auxin-insensitive rice by over expression of a mutagenized rice IAA protein . Plant J 46: 297-306.
17. **Rodrigues, C.; Vandenberghe L. P.; Teodoro , J.; Oss ,J. F.; Pandey, A. and Soccol ,C. R.(2009)** A new alternative to produce gibbrellic acid by solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol*. v.52 n. special: pp.181-188
18. **Shukla, R.; Chand, S. and Srivastava ,A. K.(2005)** Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 492-497.