كلية الزراعة

التحسين الوراثى لفطر الترايكودرما لإنتاج إنزيمات التكسير الحيوى

مقدمة من

إسراء أحمد محمود

كجزء من متطلبات الحصول علي

درجة الماجستير في العلوم الزراعية

(وراثة)

قسم الوراثة

كلية الزراعة

جامعة الفيوم

٢٠٢٣

التحسين الوراثى لفطر الترايكودرما لإنتاج إنزيمات التكسير الحيوى

مقدمة من

إسراء أحمد محمود

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)
كلية الزراعة – جامعة الفيوم (٢٠١٨)
للحصول علي درجة
الماجستير في العلوم الزراعية
(وراثة)

وقد تمت مناقشة الرسالة والموافقة عليها

اللجنة

١- ا.د/ عبد اللطيف هشام عبد اللطيف
أستاذ الوراثة - قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة بني سويف (رئيس اللجنة)
التوقيع.....

٢- ا.د/ أحمد عبد الفتاح محمد يس
أستاذ الوراثة - قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الفيوم
التوقيع.....

٣- د./ ندى فتحي حميدة
أستاذ الوراثة المساعد - قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الفيوم
التوقيع.....

٤- ا.د/ جمال محمدين حسان
أستاذ الوراثة - ورئيس قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الفيوم
التوقيع.....

التحسين الوراثى لفطر الترايكودرما لإنتاج إنزيمات التكسير الحيوى

مقدمة من

إسراء أحمد محمود

للحصول علي درجة

الماجستير في العلوم الزراعية

(وراثة)

لجنة الاشراف العلمي:

١- ا.د/ جمال محمدين حسان

أستاذ الوراثة - ورئيس قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الفيوم

التوقيع.....

٢- د/ ندى فتحي حميدة

أستاذ الوراثة المساعد- قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الفيوم

التوقيع.....

٣- د/ أيات احمد عمر

مدرس الوراثة - قسم الوراثة - كلية الزراعة - جامعة الفيوم

التوقيع.....

الملخص العربي

تعتبر مشكلة تراكم المركبات العضوية وخاصة المواد السليولوزية النباتية والتي تتراكم سنويا دون استخدام من أهم المشكلات البيئية في الوقت الحاضروهنا تظهر أهمية استخدام الكائنات الحية الدقيقة وخاصة الفطريات في التحلل الحيوي لهذه المركبات بواسطه انزيمات السليولازالتي تفرزها الفطريات خاص جنس الترايكوديرما مع محاولة ايجاد وسيلة للتحسين الوراثي للعزلات الفطرية لزيادة كفائتها ومعدل انتاجها من انزيمات التكسير الحيوي وذلك من خلال استحداث طفرات مختلفة من فطر الترايكوديرما تتميز بالكفاءة العالية في انتاج انزيمات التكسيرالحيوي واستخدامها في التخلص الحيوي للمواد السليلوزيه مما يساهم في الحد من المشكلات البيئية. تهدف الدراسة الي: عزل سلالات محلية مختلفة من أجناس فطر الترايكوديرما وتقدير كفائتها في افراز انزيمات السليولاز. استحداث طفرات مختلفة من هذه العزلات لرفع كفائتها الانتاجية من انزيمات السليولاز. تعريف وراثي كامل لهذه العزلات الفطرية علي المستوي الجزئيي. تحديد وعزل بعض الجينات المسئولة عن انتاج انزيمات التكسير الحيوي.

ويمكن تلخيص أهم النتائج لهذه الدراسة في النقاط التالية :-

١. عزل سلالت مختلفة من فطر الترايكوديرما والتقدير الوصفي لانتاجها من انزيم السليولاز.

تم عزل عدد أربعة وعشرون عزلة من فطر الترايكودرما من منطقة جذور نباتات الفول ورسيم والقمح المنزرعة بمناطق مختلفة بمحافظة الفيوم. وعلى أساس الخصائص المورفولوجية والجزيئية تم تعريف العزلات الاربعة وعشرون علي أنها اثني عشر عزلات تتبع النوع هارزيانيم وعزلتين ليكسي وعزلتين لونجبريجيتم وثمانية عزلات تتبع النوع ايريوفيردي . أظهرت نتائج الاختبارات الوصفية قدرة جميع العزلات علي انتاج انزيم السليولاز وذلك من خلال استخدام بيئة بها مادة كاربوكسي ميثيل سيليولوز ووجود صبغة االكونجو الحمراء . أظهرت جميع عزلات الترايكوديرما نتيجة ايجابية لاختبار تحول اللون الاحمر الي الاصفر في حالة اختبار السيليولاز وكانت العزلات الاربعة التالية (FUGT18 و FUGT16 و FUGT6 و FUGT3) اعلي العزلات انتاجا للانزيمات .

٢- تأثير التضاد بين عزلات الترايكوديرما والفطريات الممرضة .

تم تقييم عزلات الترايكوديرما الاربعة وعشرون معمليا من حيث قدرتها على مقاومة فطريات الرايزوكتونيا سولاني و الفيوزاريوم سولاني والماكروفومينا فاسيولينا وأظهرت جميع عزلات الترايكوديرما قدرة تثبيطية عالية لنموالفطريات الممرضة. أظهرت العزلة FUGT١٦ أعلى قدرة تثبيطية حيث كانت نسبة تثبيط نمو الفطر الممرض

رايزوكتونيا سولاني (٦٧.٦٪) مقارنة بنسبة الكنترول ومن ناحية أخرى أظهرت العزلة ترايكوديرما ايريوفيردي (FUGT13) أقل نسبة تثبيط (٥٢.٩٪). وكانت أعلي قدرة تثبيطة لنموفطر الفيوزاريوم سولاني ناتج من العزلة FUGT2 حيث اعطت نسبة تثبيط (65.6%) في حين كانت القدرة التثبيطية للعزلة FUGT24 (35%). ومن حيث القدرة التثبيطة لنمو فطر الماكروفومينا فاسيولينا اظهرت العزلة FUGT6 نسبة تثبيط قدر.(63.9%) واعطت العزلة FUGT22 أقل نسبة تثبيط بلغت (44.40%). ومن خلال تلك النتائج يمكن القول بان العزلات الاربعة FUGT3.FUGT18 FUGT6 and FUGT16, اكفأ العزلات من حيث كفائتها التثبيطة للثلاث فطريات الممرضة.

٣-التقدير الكمي لإنتاج السليولاز من عزلات الترايكوديرما المنتخبة.

وفقًا لنتائج التجارب السابقة (القدرة التثبيطية والتقديرالوصفي لانتاج أنزيمات السليولاز) تم تقدير كمي لانتاج الانزيمات من العزلات الاربعةوالعشرون. تشير النتائج إلى أن عزلات الترايكوديرما(FUGT3, FUGT6, FUGT16, FUGT18)أظهرت أعلى إنتاج والسليولازحيث كان النشاط الانزيمي لالسليولاز 0.32, 0.34, 0.36 and 0.42. U/ml

٤. استخدام تفاعل ال PCR لتضاعف جين ١٨SrDNA المعزول من عزلات الترايكوديرما.

تم إستخدام تفاعل PCR المتخصص لتضاعف جين 18SrDNA مستخدما الDNA المعزول من العزلات الترايكوديرما الاربعة كقالب في تفاعل PCR واستخدام ناتج التفاعل في الحصول علي حزمة علي جيل الاجاروز تعادل ٦٠٠ زوج من القواعد لكل العزلات . تم عمل تحديد لتتابع القواعد Sequence للجين المعزول من كل عزلة واستخدام المعلوماتية الحيوية في تعريف العزلات علي المستوي الجزئي .تم اجراء مقارنة للتابع النيوكليوتيدي لكل عزلة مع التتابعات المتاحة علي بنك الجينات حيث بينت نتائج التحليل أن عزلات الترايكوديرما FUGT3, FUGT6,FUGT16 and FUGT18 تاكيد تعريفها علي أنها *T. harzianum*, *T.lixii*, *T. longbrachiumm*, and *T. aureoviride* و تم تسجيلها في بنك الجينات العالمي تحت ارقام علي التوالي OL953189, OL953190, OL953191, OL953192

٥. تأثير التضاد بين طفرات الترايكوديرما والفطر الممرض *R. solani* .

تم قياس قطر المستعمرة للفطر الممرض *R. solani* والذي تمت زراعته بالاشتراك مع النوع البري *Trichoderma* spp ، وتم حساب تثبيط النمو حيث أظهر التحليل الإحصائي للنتائج التي تم الحصول عليها فرقا معنويا بين التأثير المثبط للنوع البري وطفراته على *R. solani*. كانت جميع الطفرات المستحثة من النوع البري *Trichoderma* أفضل بكثير من النوع البري عند اختبارها ضد *R. solani* ، أظهرت السلالة المطفرة T16 التي تم تطفيرها بواسطة EMS أعلى نسبة تضاد ضد *R. solani* (82.2)٪.

٦. التقديرالكمي لإنتاج السليلوز من طفرات الترايكوديرما

وجد أن جميع التقديرات المحسوبة لنشاط انزيم السيليولاز الناتج من السلالات الطافرة متباين وأعلى من القيم الناتجه من السلالة الأبوية. ومع ذلك ، فإن العزلات التي تم انتقاؤها بعد المعاملة بـ 250) EMS مجم / مل) وأزيد الصوديوم لمدة ١٥ دقيقة والأشعة فوق البنفسجية لمدة ٣٠ دقيقة أظهرت ارتفاع إنتاج السليوليز ١ و ١ و ٠.٩٢ وحدة دولية / مل مقارنة بنوعها البري ٠.٠٨ و ٠.٠٥ و ٠.٣ وحدة دولية / مل على التوالي.

٧. تحديد الوراثي لسلالات ال *Trichoderma* البرية والطفرات الناتجة منها باستخدام تكرار التسلسل البسيط (ISSR)

تم اختيار أفضل الطفرات الناتجة من الأشعة فوق البنفسجية والمواد الكيميائية وأجري لها تحليل ISSR للحمض النووي للكشف عن التنوع الوراثي لهذه الطفرات مع النوع البري باستخدام ٦ بادئات. كان مستوى تعدد الأشكال مختلفًا مع كل باديء بين الطرز الجينية وعدد الحزم الناتجه لجميع الطرز الوراثية التي تم فحصها مع كل بادئة. كشفت جميع البادئات عن درجة متفاوتة من تعدد الأشكال بين الطرز الجينية ، في النطاق ٥٧.٨ - ٧٩.٣٪. أوضح النمط الذي حققته البادئات أن جميع الأنماط الجينية الطافرة تزهرأنماطًا مختلفة تمامًا لتضخيم الحمض النووي مقارنة بالسلالة الأصلية. ويمكن أن تعزي هذه الاختلافات في التركيب الجيني إلى تفسير زيادة كفاءة نشاط الإنزيم للطفرات مقارنة بالسلالات البرية.

٨. عزل جين ال cbh1 من السلالا البرية والطفرات لفطر الترايكوديرما

تم استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل للكشف عن جينات السليوليز (cbh1) في جينوم نوعين من *Trichoderma* البرية (FUGT6 و FUGT18) و ٦ طفرات. أسفرت البادئات المستخدمة لتضخيم جين cbh1 عن نطاق واحد (٢٠٠ زوج من القواعد) في جميع العزلات المختبرة. تم تأكيد حجم هذه الحزم من خلال مقارنة التتابعات الناتجة مع التتابعات المسجلة في قاعدة بيانات NCBI وتم التأكد من انها تتبع جينات اليسليولاز المعزولة من فطر الترايكوديرما .