مجلة جامعة كركوك للعلوم الزراعية ... المجلد (10) العدد (1) 2019
Journal of kirkuk University for Agricultural Sciences ...Vol (10) No. (1) 2019

الإكثار الكمي لعزلتـــي الفطريـــن المحليتين *Beauveria bassiana* و*Metarhizium anisopliae* وتحسين كفاءتهما الحيوية باستخدام الاشعة فوق البنفسجية

صفاء زكريا بكر[1] عبد الله عبد الكريم حسن[1] رغد سعد دحام[1]

- [1] جامعة تكريت ـ كلية ألزراعة

- تاريخ تسلم البحث 2017/10/29 وقبوله 2018/2/19

الخلاصة

أجري الإكثار الكمي لعزلتـــي الفطريـــن المحليتين *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* وتحسين كفاءتهما الحيوية باستخدام الأشعة فوق البنفسجية، إذ اظهرت النتائج إن زيادة وقت التشعيع يؤثر سلباً في نمو الفطريات المدروسة حيث إن الكونيدات غير المعاملة بالإشعاع أظهرت نمواً واضحاً وكبيراً مقارنة بالكونيدات المعاملة بالإشعاع و بلغت أعداد الكونيدات غير المعاملة بالإشعاع 159.01 × 10^2 كونيدة/مل للفطر *B.bassiana* و 11.58 × 10^2 كونيدة/مل للفطر *M.anisopliae* ثم تناقصت معنوياً أعداد المستعمرات النامية عند مدد التشعيع 15-105 دقيقة، أما الكونيدات المعرضة للإشعاع عند الدقيقة 120 فلم تسجل أي نمو لتكوين المستعمرات عدت السلالات الناجية طافرات لتغايرها المورفولوجي والفسلجي والأنزيمي فقد أظهرت النتائج إن أعلى فعالية للبروتيز سجلت في جميع سلالات الفطر *B.bassiana* الطافرة (عدا السلالات B15-2 و B30-1 وB60-3 و B75-3 و B90-2) وأظهرت السلالة B105-1 أعلى ارتفاع للفعالية الأنزيمية بلغت 34.9 وحدة/مل مقارنة بالسيطرة التي بلغت 14.86 وحدة / مل، فضلا عن تسجيل جميع السلالات الطافرة للفطر *M.anisopliae* ارتفاعاً في فعالية البروتيز و بلغت أعلى فعالية لها 7.16 و 7.05 وحدة/ مل للسلالتين M30-2 وM45-2 على التوالي مقارنة بالسلالة البرية التي بلغت 4.6 وحدة/مل، أما بالنسبة لأنزيم الكايتينيز فقد أظهرت النتائج ارتفاعاً واضحاً لفعالية هذا الأنزيم في جميع السلالات الطافرة للفطر *B.bassiana* وكانت أعلى فعالية للسلالة B105-1 إذ بلغت 0.34 وحدة/مل مقارنة بالسلالة الأبوية التي بلغت 0.09 وحدة/مل، كما وسجلت أعلى فعالية للأنزيم نفسه لجميع السلالات الطافرة للفطر *M.anisopliae* وسجل اقصى نشاط لأنزيم الكايتينيز للسلالة الطافرة M75-2 إذ بلغت 0.7 وحدة/مل مقارنة بالسلالة الأبوية التي بلغت 0.11 وحدة/مل أظهرت نتائج تقييم حيوية سلالات الفطرين البرية والطافرة عند النمو في أوساط مختلفة وبدرجات خزن بلغت 30 و 40 و50 وقد أظهرت النتائج تفوق معنوي لنمو السلالات الطافرة B105-1 مقارنة بجميع السلالات الطافرة الأخرى و بلغت اعداد المستعمرات 232 و 100 و 54 ×10^5 مستعمرة/غم بعد 30 يوم من الخزن في أوساط السبوس ونخالة الحنطة والذرة، على التوالي، وأظهرت السلالة نفسها أعلى نمو بلغ 208.6×10^5 مستعمرة/غم عند الخزن بدرجة 50°م في وسط السبوس بعد 60 يوم من الخزن .وسجلت السلالة الطافرة M15-2 للفطر *M.anisopliea* أعلى نمو بتفوق معنوي عند الخزن لمدة 30 يوم بدرجة 30 و40°م في وسط الدخن إذ بلغ 883 و443×10^6مستعمرة/غم وسط وبعد 60 يوم من الخزن سجلت السلالة الطافرة نفسها أعلى نمو بدرجة 30°م في وسط الحنطة إذ بلغ 356×10^6مستعمرة/غم وسط .

الكلمات المفتاحية: الإكثار الكمي، *Metarhizium anisopliae*، الطفرة الوراثية، الاشعة فوق البنفسجية

Quantitative propagation of local isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and improvement their bio-efficacy by Ultra-Violet Irradiation

Abdullah A. Hassan[1] Safa Z. Baker[1] Ragad S. Daham[1]

- [1] **Tikrit University - College of Agriculture**

- Date of research received 29/10/2017 and accepted 19/2/2018

Abstract

Quantitative propagation of two local fungal isolates; *Beauveria bassiana*، *Metarhizium anisopliae*، improvement their bio-efficacy by ultra-violet irradiation was carried out in this study.The results showed the increase in the irradiation time affected negatively on the studied fungi growth. The un-irradiated conidia showed a high growth rate compared to irradiated conidia. The number of un-irradiated *B.bassiana* and *M.anisopliae* conidia was 159.01×10^2 /ml and 11.58×10^2/ml, respectively, then the colonies growth significantly decreased at irradiation time 15-105 min, while there is no growth in irradiated conidia at 120 min. The results showed, the highest percentage of mortality began at the first irradiation time in both fungi, resulting in 98.1 and 95.9% after 15 min. then the percentage of mortality was 100% at 120 min. The survival fungal strains are regarded as mutants owing to their variation in morphology, physiology and enzymology, the results showed the highest protease activity recorded in all *B.bassiana* mutants (except in B15-2,B30-1,B60-3,B75-3 and B90-2) .The mutant B105-1 showed highest protease activity which was 34.9 unit/ml compared to 14.86 unit/ml in control, in addition, all *M.anisopliae* mutants record high protease activity compared to wild strain, the highest protease was 7.16 and 7.05 unit/ml in mutants M30-2 and M45-2, respectively, compared to 4.6 unit/ml in wild strain. The result also showed increase in chitinase activity in all mutants. The highest activities were 0.34 and 0.7 unit/ml in mutants B105-1 and M75-2 compared to 0.09 and 0.11 unit/ml in wild *B.bassiana* and *M.anisopliae*, respectively.In compatibility study of insecticides Difuse and Matrixin (at recommended concentration) with wild and mutant strains, the results showed superior of all *B.bassiana* mutants growth in present of Difuse (except B15-2،B30-1 and B60-1) compared to wild strain. The highest growth was in mutants B105-3, B60-3 and B60-2 resulting in 84,85 and 84 mm, respectively, the results showed the effect of Matrixin Plus, was more than Difuse, however, the growth of all *B.bassiana* mutants was higher than wild strain which result lower growth (41.5 mm) while the highest growth was 59.5 and 60 mm in B90-2 and B105-3 ، respectively، while the *M.anisopliea* mutants, M15-2, M30-1, M30-3, M45-2, M45-3, M75-2, M75-3 and M90-3 showed highest growth reached to 85 mm in the present of Difnse without significant differences compared to control while both mutants M30-1 and M45-2 showed highest growth resulting in 85 and 84.16 mm in the present of Matrixin plus without significant differences compared to control.The results of evaluation of vitality of wild and mutants of *B.bassiana* and *M.anisopliea* when to grow in various media in store temperatures 30 °C,40 °C and 50°C showed the significant superior of B105-1 mutant growth compared to all other mutants،in which the number of colonies were 232,100 and 54×105 colony/gm, when stored at 30 days in rice hulls،wheat bran and Maize, respectively. The same mutant showed higher growth 208.6×105 colony/gm when stored at 50°C in rice hulls after 60 days. The mutant M15-2 of *M.anisopliea* recorded highest growth when stored for 30 days at 30 °C and 40°C in millet resulting in 833 and 443×106 colony/gm، the same mutant recorded highest growth 356×106 colony/gm، after stored for 60 days at 30°C

Key words: Quantitative propagation, *Metarhizium anisopliae*, mutation.

المقدمة

لقد أدى الاستعمال المفرط والعشوائي للمبيدات الكيميائية التقليدية غير المتخصصة والشديدة السمية في مكافحة الآفات الحشرية إلى تطور المقاومة من قبلها ضد طيف واسع من المبيدات الكيميائية، فضلا عن ظهور العديد من المشاكل الصحية والبيئية وتأثيراتها الجانبية السلبية في الأحياء غير المستهدفة من متطفلات ومفترسات ونحل، اضافة إلى مخاطر متبقياتها على صحة الإنسان والحيوان، ولهذا فقد اتجه العالم في الآونة الاخيرة إلى إيجاد طرق حديثة وآمنة بديلة عن المبيدات الكيمياوية أكثر فاعلية وتوافقا مع البيئة أو ما يسمى اليوم بالطرق البديلة الصديقة للبيئة والتي تدخل ضمن برامج الإدارة المتكاملة (Bhoosreddy، 2014 ، شاكر،2015). تعد الفطريات الممرضة للحشرات من أكثر مسببات أمراض الحشرات انتشاراً وتواجدا في البيئة فقد سجل أكثر من 700 نوع منها كمسببات ممرضة للحشرات ومفصليات الأرجل، فضلا عن كفاءتها التخصصية العالية وأمانها على الأعداء الحيوية والبيئة و قدرتها على التأقلم وتكوين الأبواغ المقاومة للظروف البيئية غير الملائمة، وإن الإنتاج الكمي الواسع Mass production للفطريات الممرضة هو شرط أساسي لأي تطبيق حقلي واسع لها ولهذا فقد اتجه الباحثون في الوقت الحاضر إلى إيجاد طرق للإنتاج الكمي الواسع لهذه الفطريات وذلك باستعمال مواد صلبة أو سائلة متوفرة محليا وواطئة الكلفة مثل بقايا حبوب المحاصيل المكسورة وقشورها كالحنطة والرز والذرة الصفراء ومولاس قصب السكر وغيرها (Driver وآخرون،2000، Jagadeesh وآخرون،2008،Latifian وآخرون2013). هناك العديد من الطرائق التي تحسن من كفاءة الفطريات الممرضة للحشرات في إنتاج المواد الحيوية المهمة وتعد طريقة التطفير باستخدام المواد الكيميائية والاشعة فوق البنفسجية إحدى هذه الطرق التي تمتاز بكفاءتها وسهولة إجرائها اذ تعد الأشعة فوق البنفسجيةUV من العوامل المطفرة السريعة لل DNA ،إذ اثبتت العديد من الدراسات تحسين سلالات الفطريات باستخدام الأشعة فوق البنفسجية وذلك عن طريق إنتاج طافرات عالية النشاط الأنزيمي (Kuhad وآخرون، 1994، Hanh-vu وآخرون، 2009، Ho وHo، 2015) . كما ويعد النشاط الأنزيمي من العوامل المهمة لنجاح إمراضية كل من الفطرين *B.bassiana* و *M.anisopliae*(Jian واخرون، 2010). يعد الفطر *M.anisopliae* من الفطريات المهمة التي تصيب الحشرات إذ ينتشر في مختلف انحاء العالم (Scholte وآخرون، 2003) ، وينمو بشكل طبيعي في التربة ويصيب ما يقارب 200نوع من الحشرات مثل الجراد و الأرضة، ويسبب مرض المسكاردين الأخضرGreen Muscardine (Skrobek وآخرون، 2008)، أما الفطر *B.bassiana* يعد من أهم عوامل المكافحة الأحيائية الممرضة للحشرات الذي يستوطن بشكل طبيعي في التربة، يصيب مجموعة واسعة من الحشرات التي تقضي جزء من دورة حياتها في التربة مسببة مرض المسكاردين الأبيض White muscardine (الفضلي،2016).

نظراً لأهمية هذه المسببات الممرضة للحشرات، ولأهمية اكثارها الكمي خاصة لتلك المعزولة من الترب العراقية فقد جاءت هذه الدراسة لتحقيق الأهداف الآتية:

1- تحسين سلالات الفطرين المحليين *B.bassiana* و*M.anisopliae* باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV.
2- إيجاد أفضل الأوساط الزراعية من منتجات ومخلفات زراعية محلية واطئة الكلفة للإنتاج الكمي لعزلتي الفطرين.
3- دراسة حيوية الفطريات النامية على تلك الأوساط بدرجات حرارة ومدد زمنية مختلفة.

المواد وطرائق البحث

تحضير عالق كونيدات الفطرين *Beauveria basiana* و *Metarhizium anisopliae* :

تم الحصول على عزلات الفطرين *B.basiana* و *M.anisopliae* من وزارة العلوم والتكنلوجيا في بغداد وتم تنقيتها وحفظها بواسطة طريقة الأوساط المائلة (Slants) تحوي على الوسط الزرعي PDA بعدها تم زراعت مستعمرات من الفطرين في أطباق تحوي وسط PDA وحضنت على درجة حرارة 25±2° م. تم انتخاب مستعمرات نشطة عمرها أسبوع واحد من الفطرين أعلاه كلاً على حدة وأضيف اليها 50 مل ماء مقطر معقم بواقع 10 مل لكل مرة مع استخدام فرشاة لحصاد الكونيدات أضيفت إلى بيكر سعة 100مل وبعدها تم حساب عدد الكونيدات بواسطة شريحة العد تحت المجهر، بعد تحضير محلول الكونيدات الخزين (Stock) تم تحضير التراكيز المطلوبة والتي هي (10^5و 10^6 و10^7 كونيدة / مل)

تحسين السلالات الفطرية بواسطة الأشعة فوق البنفسجية UV :

تم اختيار مستعمرتين نشطتين للفطرين *B.basiana* و *M.anisopliae* عمرها أسبوع واحد حضرتا بتركيز 10^3 كونيدة/مل حسب الفقرة المذكورة تم اضافة 1 مل لكل طبق بتري بواقع 5 مكررات لكل فترة زمنية وعرضت إلى مصدر الأشعة فوق البنفسجية UV مصدرها مصابيح الكوارتز 30 واط (240-280 nm ، 254 peak nm) على بعد 10سم عن مصدر الإشعاع وللفترات (0،15،30،45،60،75،90،105،120) دقيقة في غرفة مظلمة تبدأ بالزمن صفر وكل 15 دقيقة تسحب الأطباق وتسجل عليه المعاملة ويغلف بورق الالمنيوم لتبقى في الظلام لتجنب الإصلاح الضوئي للطفرة بعد إكمال كل الأطباق يصب فوقها الوسط PDA وتحرك بشكل 8 حتى توزع الكونيدات بشكل منتظم وحضنت على درجة حرارة 25±2°م لمدة 24 ساعة بعدها تم حساب عدد الكونيدات لكل طبق ثم نقلت المستعمرة الناتجة عن الكونيدة المفردة من كل طبق إلى وسط جديد للحصول على مستعمرة نقية، وبعد نمو المستعمرة تم إجراء الاختبارات التالية لتحديد فعالياتها (Hassan، 2011).

تقدير فعالية أنزيم البروتيز والكايتينيز :

إنتاج أنزيم البروتيز : زرعت السلالات الناتجة من معاملات الأشعة للفطرين قيد الدراسة قبل وبعد التشعيع بواقع مكررين لكل سلالة وذلك بأخذ 1سم^2 بواسطة الملقط من الطبق إلى الدورق الحاوي على وسط إنتاج أنزيم البروتيز (وتم تحضيره بإذابة المواد التالية: (5g Glucose، 5g Casein،10g $MgSO_4$، 10g K_2HPO_4) في 1000 مل ماء مقطر باستخدام جهاز Magnetic Stirrer لكي يتجانس الخليط ثم وزع على دوارق سعة 250 مل بواقع 100 مل لكل دورق ثم غلفت فوهة الدورق بسدادة قطنية وغلفت الفوهة بورق الألمنيوم ثم عقمت في جهاز المؤصدة على درجة حرارة 121°م وضغط 1.5كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدة التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم أضيف لها المضاد الحيوي AMPICLOX بواقع 250 ملغم/دورق. مع مراعات أن تطفو القطعة فوق سطح الوسط وحضنت على درجة حرارة 25±2°م بعد إكتمال النمو للفطرين ولجميع السلالات، تم ترشيح محتوى الدوارق من خلال ورق ترشيح Whattman N0.1 وجمع الراشح الأنزيمي للفطر ووضع في الثلاجة لحين الاستخدام.

تقدير فعاليته : وضع 1 مل من الراشح في أنبوبة اختبار وأضيف له 9 مل من محلول الكازائين وحضن لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 37°م وبعد التحضين أضيف 2 مل من محلول ال TCA لإيقاف التفاعل، بعد إيقاف التفاعل تم وضع أنابيب الاختبار في جهاز الطرد المركزي Centrifuge 6000 دورة/دقيقة Universal/ Japan لمدة 3 دقائق ثم أخذت القراءات على جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي 280 نانوميتر وعرفت الفعالية الأنزيمية عند تغير الامتصاصية بـ 0.001 لكل دقيقة (Cooper، 1977) .

إنتاج أنزيم الكايتينيز : زرعت السلالات الناتجة من معاملات الأشعة للفطرين قيد الدراسة قبل وبعد التشعيع بواقع مكررين لكل سلالة وذلك بأخذ 1 سم^2 بواسطة الملقط من الطبق إلى الدورق الحاوي على وسط إنتاج أنزيم الكايتينيز(وتم تحضيره بإتباع طريقة Tweddell وآخرون (1994)، وذلك بإذابة المواد التالية : (1g $(NH_4)_2SO_4$ ، 1g K_2HPO_4، 5g NaCl، 5g Colloidal Chitin، 0.01g $FeSO_4$،0.5g $MgSO_4$ 0.5gKCL (في 1000 مل ماء مقطر باستخدام جهاز Magnetic Stirrer حتى يتجانس الخليط ، ثم وزع على اربعة دوارق سعة 250 مل بواقع 100 مل لكل دورق ثم غلفت فوهة الدورق بسدادة قطنية وغلفت الفوهة بورق الألمنيوم ثم عقم الوسط في جهاز المؤصدة على درجة حرارة 121°م وضغط 1.5كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدة التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم أضيف لها المضاد الحيوي AMPICLOX بواقع 25 ملغم/ دورق. مع مراعات أن تطفو القطعة فوق سطح الوسط وحضنت على درجة حرارة 25±2°م بعد إكتمال النمو للفطرين ولجميع السلالات تم ترشيح الدوارق من خلال ورق ترشيح Whattman N0.1 وجمع الراشح الأنزيمي للفطر ووضع في الثلاجة لحين الاستخدام .

تقدير فعاليته: لتقدير هذا الأنزيم اتبعت طريقة (Tweddell وآخرون 1994) حيث أضيف 1مل من محلول الكايتين إلى 1 مل من المستخلص الأنزيمي لكل معاملة وحضن المزيج في حمام مائي على درجة حرارة 37°م لمدة ساعتين ونبذت بالطرد المركزي 2000 دورة /الدقيقة لمدة دقيقتين فقط للتخلص من الشوائب ثم أخذ 1 مل من الراشح بعد الطرد المركزي وأضيف إليه 1مل من الDNS وترك المزيج داخل حمام مائي 100°م لمدة 5 دقائق بعدها بردت الأنابيب بوضعها في حمام مائي بدرجة 15°م وقيست الامتصاصية على طول موجي 540 نانوميتر ولاستخراج فعالية الأنزيم وحدة/مل تم اعتماد المنحنى القياسي لسكر N-acetyl glucoseamine عرفت الوحدة الأنزيمية للكايتينيز بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من سكر الاسيتايل كلكوز أمين خلال دقيقة واحدة.

الإكثار الكمي للفطريات على أوساط محلية صلبة :

بعد اختيار السلالات الأكثر توافقية مع أحد المبيدات الكيميائية والأعلى انتاجاً لأنزيمي الكايتينيز والبروتيز أجريت تجربة الإكثار الكمي، لغرض الإكثار الواسع استخدمت ثمانية أوساط زرعية هي حبوب الرز، قشور الرز (السبوس) ، حبوب الذرة الصفراء، كوالح الذرة، حبوب الحنطة، نخالة الحنطة، بذور الدخن، البتموس إنتاج شركة Klasmann-Delimann GmbH الألمانية، وكما حضرت أعلاه، بعد الترطيب والتعبئة والتعقيم تم تبريد الأوساط ثم لقحت بأقراص قطرها 1سم ، بواقع 3 اقراص لكل قنينة من مزارع عمرها أسبوع واحد من الفطريات والطافرات وحضنت على درجة حرارة 25±2°م لحين اكتمال النمو مع الرج اليومي للقناني بعدها حسب معدل عدد الأبواغ في 1غم من الوسط النامي عليه الفطر وذلك بعمل عالق كونيدي إذ أضيف 1غم في 9 مل ماء مقطر معقم وتم تخفيفه إلى التركيز المطلوب ثم أخذ 1 مل من التركيز وصب في اطباق بتري قطر9 سم وأضيف له وسط الPDA الحاوي على المضاد الحيوي AMPICLOX وحرك على شكل رقم 8 لتجانس الخليط ثم حضن على درجة حرارة 25±2°م لمدة 24 ساعة ثم حسب عدد المستعمرات لكل طبق. عدد الكونيدات / غم وسط= عدد المستعمرات النامية × مقلوب التخفيف

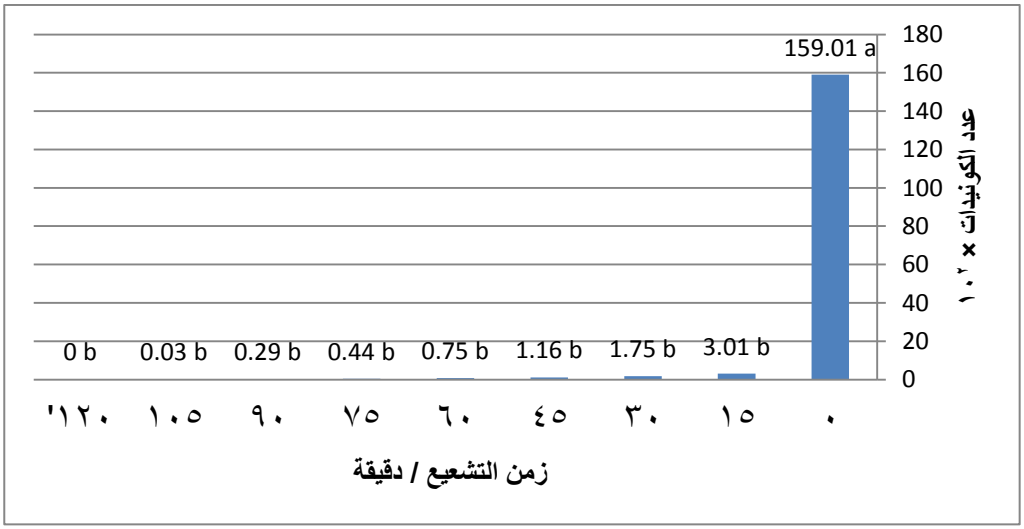
خزن المبيدات الأحيائية النامية على أوساط غذائية صلبة :

بعد زراعة ونمو الفطريات على الأوساط الغذائية الصلبة وحساب معدل عدد الكونيدات قبل الخزن تم وضع القناني في حاضنات على ثلاث درجات حرارة 30 و 40 و50 °م وبنفس الطريقة السابقة تم حساب عدد المستعمرات النامية بعد مدة خزن شهر و شهرين .

النتائج والمناقشة

تأثير زمن الإشعاع فوق البنفسجي (دقيقة) في أعداد كونيدات الفطر *Beauveria bassiana* :

يبين الشكل (1) تأثير زمن الاشعاع (دقيقة) في أعداد كونيدات الفطر *B.bassiana* إذ أظهرت النتائج إن زيادة وقت التشعيع يؤثر سلبا على نمو الفطريات المدروسة اذ ان الكونيدات غير المعاملة بالإشعاع أظهرت نمواً واضحاً وكبيراً مقارنة بالكونيدات المعاملة بالأشعاع حيث بلغت أعداد الكونيدات غير المعاملة بالإشعاع 159.01 × 10^2 ثم تناقصت معنوياً أعداد المستعمرات النامية عند مدد التشعيع 15-105 دقيقة. أما الكونيدات المعرضة للإشعاع عند الدقيقة 120 فلم تشهد أي نمواً لتكوين المستعمرات.

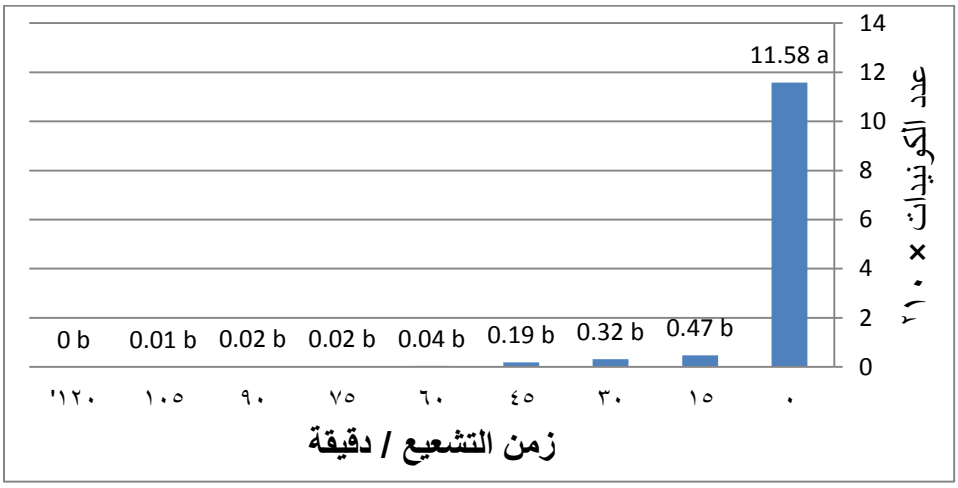


شكل (1) تأثير زمن الإشعاع (دقيقة) في أعداد كونيدات الفطر *Beauveria bassiana*

*تشير الحروف الأبجدية المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية وتشير الحروف الأبجدية المختلفة إلى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05.

تأثير زمن الاشعاع (دقيقة) في أعداد كونيدات الفطر *Metarhizium anisopliae* :

يبين الشكل (2) تأثير زمن الاشعاع (دقيقة) في أعداد كونيدات الفطر *Metarhizium anisopliae* إذ سجلت النتائج إن زيادة وقت التشعيع يؤثر سلباً على نمو الفطريات المدروسة إذ إن الكونيدات غير المعاملة بالإشعاع أظهرت نمو كبير مقارنة بالكونيدات المعاملة بالإشعاع حيث بلغت أعداد الكونيدات غير المعاملة بالإشعاع 11.58 × 10^2 بدأت بعدها بالتناقص وبشكل معنوي أعداد المستعمرات النامية عند مدد الإشعاع 15-105 دقيقة أما الكونيدات المعرضة للإشعاع عند الدقيقة 120 فلم تشهد أي نمو لتكوين مستعمرات.



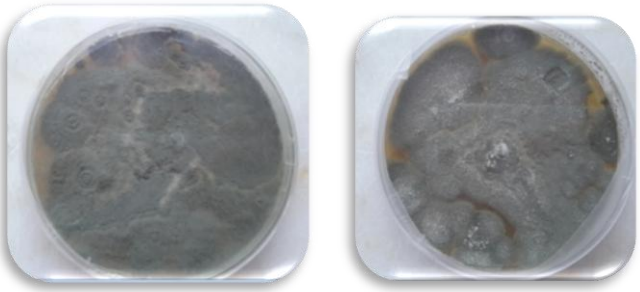
شكل (2) تأثير زمن الإشعاع (دقيقة) في أعداد كونيدات الفطر *Metarhizium anisopliae*

*تشير الحروف الابجدية المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية وتشير الحروف الأبجدية المختلفة إلى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05.

تعزى أسباب انخفاض اعداد المستعمرات بوجود الإشعاع فوق البنفسجي إلى الآثار الضارة التي يولدها التشعيع في المادة الحية التي تتأين بوجود الإشعاع مما يسبب قتل الكائن الحي المعرض للإشعاع. أما سبب وجود الأعداد القليلة من التغيرات الناجمة Survival بوجود الإشعاع فهذا سببه وجود طافرات من هذه الفطريات التي تستطيع العيش ولكن بتغايرات وراثية إذ غالبا ما يؤدي الإشعاع فوق البنفسجي إلى استحثاث ثنائيات نيوكليوتيدية مثل ثنائي الثايمين T-T Dimer أو ثنائي الادنين A-A Dimer وهذا التغاير اساس لتكوين الطفرات الوراثية (Moore و Frazer، 2002) . كما وتشير النتائج إلى أن نسب القتل تزداد بزيادة مدة التشعيع وهذا ربما يعزى إلى طول فترة التعرض إذ كلما زادت مدة التشعيع كلما أرتفع التأثير الضار والذي بدوره يؤدي إلى زيادة نسب القتل (Hassan 2011) . كما تتفق هذه التغيرات مع الشكل الخارجي لنمو السلالات الطافرة فقد تغير المظهر الخارجي للفطر *B.bassiana* على هيئة خيوط رفيعة . ويبين الشكل (3 و 5) التغيرات المظهرية للمستعمرات الناتجة من التشعيع مقارنة بالسلالة البرية غير الطافرة شكل (4 و6). إن حدوث تغايرات مظهرية بفعل الإشعاع فوق البنفسجي يعد من الادلة المهمة لحدوث الطفرات (Brown و Holden 1998).

الشكل (3) السلالة الطافرة للفطر *B.assiana*

الشكل (4) مستعمرة برية للفطر *B.bassiana*



الشكل (5) السلالة الطافرة للفطر *M.anisopliae*

الشكل (6) مستعمرة برية للفطر *M.anisopliae*

تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *Beauveria bassiana* في فعالية أنزيم البروتيز (وحدة/مل) :

يبين الشكل (7) تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالة الطافرة للفطر *B.bassiana* في فعالية أنزيم البروتيز. حيث بينت النتائج هذا الشكل ارتفاع الفعالية الأنزيمية لجميع السلالات الطافرة مقارنة بالسيطرة التي بلغت 14.86 وحدة/مل عدا السلالات B15-2 و B30-1 وB60-3 و B75-3 و B90-2 التي شكلت انخفاض كبير في الفعالية الأنزيمية إذ بلغت 14.433 و13.5 و11.9 و 2.46 و0.95 وحدة/مل على التوالي وشكلت السلالة B105-1 أعلى ارتفاع للفعالية الأنزيمية إذ بلغت 34.9 وحدة/مل ويعزى ذلك إلى تغاير في الجين الخاص بهذا الأنزيم بواسطة الأشعة (Wilson وTalbot 2009).

تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر*Metarhizium anisopliae* في فعالية أنزيم البروتيز وحدة /مل :

يظهر الشكل (8) تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر*M.anisopliae* في فعالية أنزيم البروتيز . حيث سجل الشكل أرتفاع الفعالية الأنزيمية لجميع السلالات الطافرة للفطر إذ بلغ اعلى ارتفاع لها 7.16 و 7.05 وحدة/مل للسلالتين M30-2 و M45-2 على التوالي مقارنة بالسلالة البرية التي بلغت 4.6 بينما شكلت السلالات M15-2و M105-1 انخفاض بالفعالية الأنزيمية مقارنة بالسلالة البرية بلغت 4.39 و4.1 على التوالي .

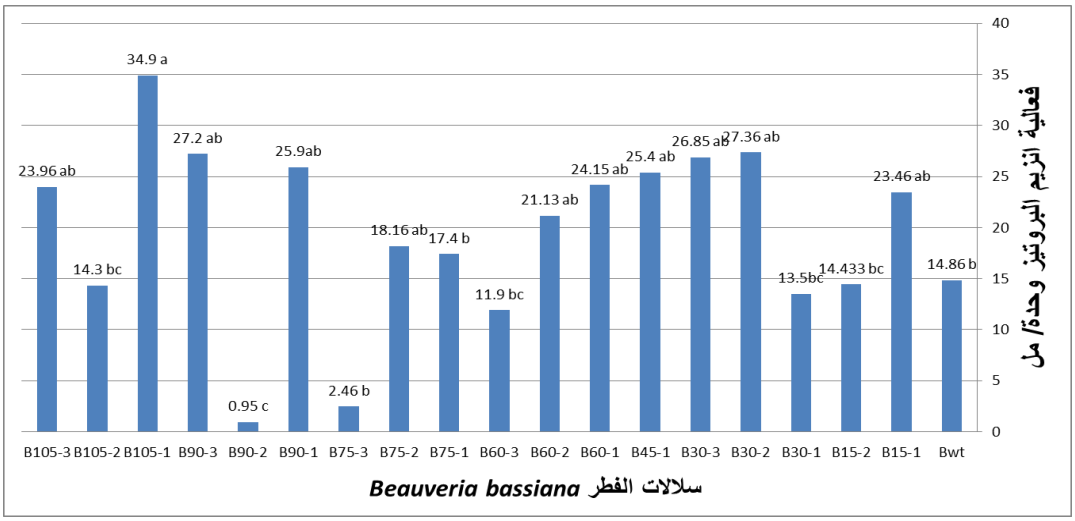
تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *Beauveria bassiana* في فعالية أنزيم الكايتينيز :

يبين الشكل (9) تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *B. bassiana* في فعالية أنزيم الكايتينيز. إذ يبين الشكل أرتفاع واضح لجميع السلالات الطافرة مقارنة بالسلالة الابوية بالفعالية الأنزيمية والتي بلغت 0.09 وسجل الشكل

أعلى ارتفاع كان للسلالة B105-1 بقيمة بلغت 0.34 أما السلالات التي سجلت اقل قيم للنشاط الأنزيمي فكانت السلالات B15-2و B30-3 والتي كانت بقيم 0.7 و 0.8 على التوالي .

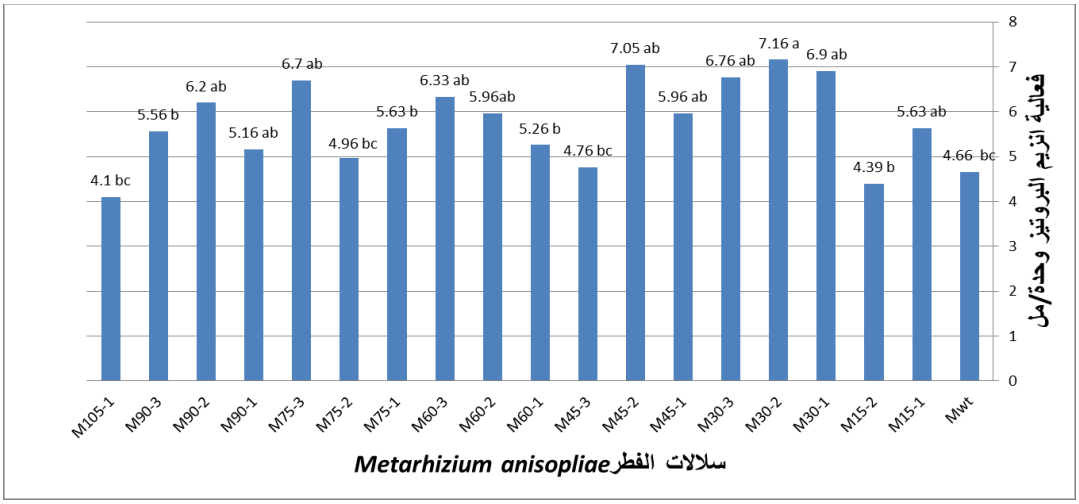
تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *Metarhizium anisopliae* في فعالية أنزيم الكايتينيز وحدة /مل :

يبين الشكل (10) تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *M.anisopliae* في فعالية أنزيم الكايتينيز. إذ سجل الشكل أرتفاع الفعالية الأنزيمية لجميع السلالات الطافرة مقارنة بالسلالة الأبوية التي بلغت 0.11 وحدة/مل وكانت أعلى أرتفاع لها للسلالة الطافرة M75-2 إذ بلغت 0.7 وحدة/مل. أشارت النتائج إلى أن هناك تباين في فعالية أنزيمي البروتيز والكايتينيز باختلاف نوع السلالة الطافرة إذ يعد أنزيمي البروتيز والكايتينيز ناتجة من تشفير جينات خاصة بكل أنزيم ونظراً لكون التطفير باستخدام الأشعة فوق البنفسجية يولد طفرات عشوائية ناتجة من تغاير عشوائي في الـ DNA وقد تكون هذه الطفرات موجبة التأثير أي تزيد من إنتاجية الأنزيمات او سلبية التأثير مما يؤدي الى إنتاج أنزيمات واطئة الفعالية وهذا هو السبب (Moore و 2002Frazer،)الذي يفسر إن بعض السلالات الطافرة في هذه الدراسة ذات نشاط أنزيمي عالي وأخرى ذات نشاط أنزيمي واطئ . إن كل من أنزيمي البروتيز والكايتينيز تعد من العوامل المهمة في الكائن الحي (عامل السيطرة الأحيائي) إذ تؤدي إلى تحلل البروتينات والكايتين الموجودة ضمن جسم الحشرة خاصة في جسم الحشرة الخارجي وبتحلل هذه المكونات يؤدي إلى خلل وضرر في جدار جسم الحشرة مما يؤدي إلى إضعافها ومن ثم موتها (Hassan 2011). تختلف العزلات في إنتاج أنزيمي الكايتينز والبروتيز وإن فعالية هذه العزلات ترتبط بفعالية هذه الأنزيمات وكما ذكر Subhash وآخرون (1991) ، وإن هذه النتائج توافق ما حصل عليه Sun وآخرون (1999) وMustafa و Kaur (2009) بأن العزلات المختلفة تتباين في القابلية على إنتاج أنزيم الكايتنيز والبروتيز.



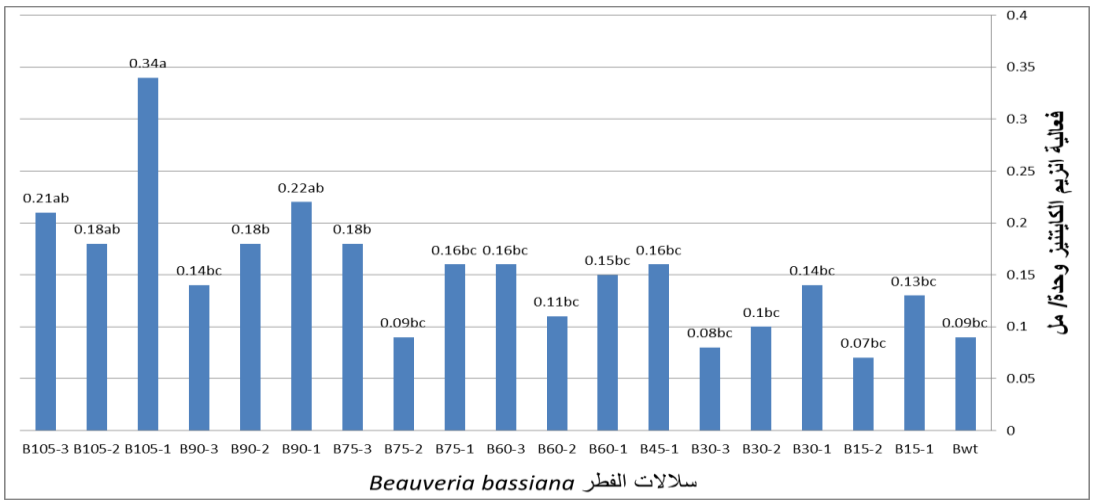
شكل (7) تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *Beauveria bassiana* في فعالية أنزيم البروتيز (وحدة/ مل)

***تشير الحروف الابجدية المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية وتشير الحروف الأبجدية المختلفة إلى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05.**



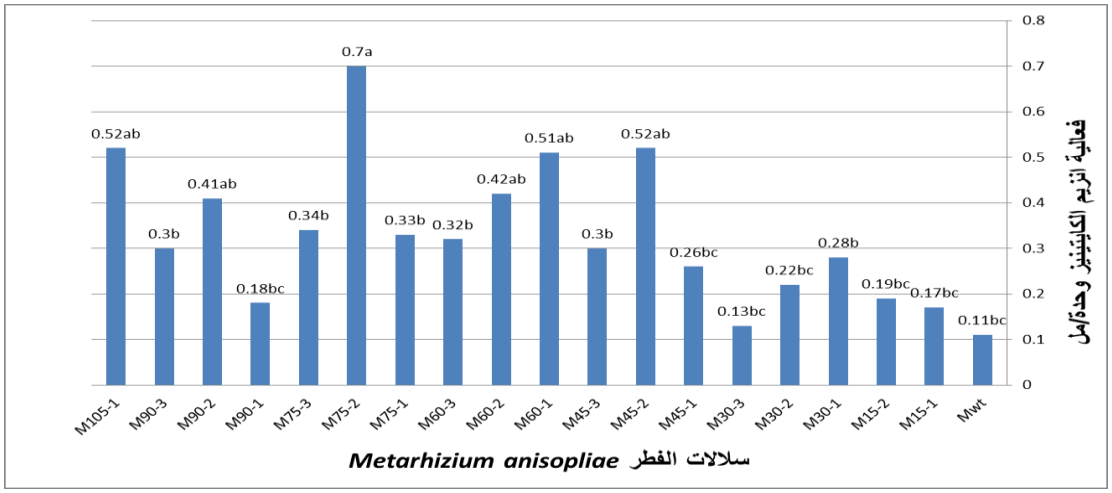
شكل (8) تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *Metarhizium anisopliae* في فعالية أنزيم البروتيز (وحدة/ مل)

***تشير الحروف الابجدية المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية وتشير الحروف الأبجدية المختلفة إلى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05.**



شكل (9) تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *Beauveria bassiana* في فعالية أنزيم الكايتينيز (وحدة/ مل)

***تشير الحروف الابجدية المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية وتشير الحروف الأبجدية المختلفة إلى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05.**



شكل (10) تقييم كفاءة السلالة البرية والسلالات الطافرة للفطر *Metarhizium anisopliae* في فعالية أنزيم الكايتينيز (وحدة/ مل)

***تشير الحروف الابجدية المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية وتشير الحروف الأبجدية المختلفة إلى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05.**

تقييم حيوية سلالة الفطر *B. basiana* المحلية وطافراتها النامية في بعض الأوساط الغذائية لمدة خزن 30 يوم بدرجات حرارة 30 و40 و 50 مº :

يبين الجدول(1) إن السلالة B105-1 العائدة للفطر *B.bassiana* أبدت أعلى نمو (بتفوق معنوي) في وسط نخالة الحنطة عند الزمن (صفر) أي عند اكتمال نمو الفطر في الوسط إذ بلغت أعداد المستعمرات النامية 317 ×10^5مستعمرة/غم مقارنة ب 214×10^5مستعمرة/غم للسلالة *B.bassiana* البرية غير الطافرة، كما تفوقت السلالة الطافرة B105-1 معنوياً عند نموها في أوساط السبوس والدخن والذرة وبالرغم من تفوق أعداد المستعمرات النامية لهذه السلالة الطافرة في الأوساط الأخرى مقارنة بالسلالة البرية الا أن هذا التفوق لم يكن معنوياً (جدول 1) .

جدول (1) تقييم حيوية سلالة الفطر *Beauveria basiana* المحلية وطافراتها النامية في بعض الأوساط الغذائية لمدة خزن 30 يوم بدرجات حرارة 30 و40 و 50 ºم (عدد المستعمرات × 10^5 / غم)

الوسط	السلالة	الزمن صفر	درجة الحرارة الخزن (ºم)		
		حال اكتمال النمو			
			30	40	50
الرز	Bwt	A217c	B105d	C55cd	C27 e
	B105-1	A216c	B137c	C65c	D33.5d
سبوس	Bwt	A153d	A131c	B 33.5 ef	C17g
	B105-1	A270b	B232a	C35ef	C 33.5 d
حنطة	Bwt	A190c	B62e	B 44.5 e	C27e
	B105-1	A238bc	B104d	C 84.5 b	D47b
نخالة حنطة	Bwt	A214c	B52e	C22f	D9h
	B105-1	A317a	B170b	C100a	D 41.5 c
بتموس	Bwt	A37f	B14f	C7g	D0i
	B105-1	A58f	B31f	C 12.5 fg	D0i
دخن	Bwt	A110e	B37f	BC22f	C 16.5 g
	B105-1	A178c	B74de	B 49.5 cd	C23f
ذرة	Bwt	A 156 d	B111cd	C54cd	D31de
	B105-1	A215c	B173b	C 78.5 b	D54a
كوالح ذرة	Bwt	A57f	B30f	B22f	C 9.5 h
	B105-1	A66 f	B33f	B 26.5 f	C 13.5 gh

*تشير الأحرف الصغيرة المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية والأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية بين السلالات الفطرية ضمن الأعمدة وتشير الأحرف الكبيرة المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوية والأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن الصفوف حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05 .

عند الخزن بدرجات حرارة 30 و40 و50 ºم فقد أثرت هذه الدرجات في نمو الفطر *B.bassiana* الذي أدى إلى تناقص في أعداد المستعمرات النامية وبلغ أعلى عدد للمستعمرات النامية بدرجة 30ºم للسلالة الطافرة B105-1 بـ 10^5×232مستعمرة/غم بتفوق معنوي مقارنة بنمو السلالة البرية إذ بلغت اعداد المستعمرات 10^5×131مستعمرة/غم . كما ويظهر الجدول نفسه أن نمو السلالة الطافرة B105-1 كان معنوياً في أوساط الرز وحبوب الحنطة ونخالة الحنطة وبذور الدخن والذرة الصفراء في حين لم يكن معنوياً في أوساط البتموإنتاج شركة Klasmann-Delimann GmbH الالمانية وكوالح الذرة الصفراء وعند اختبار حيوية النمو عند الدرجة 40ºم لوحظ تفوق السلالة الطافرة B105-1 عند النمو في وسط نخالة الحنطة إذ بلغت أعداد المستعمرات 10^5×100 مستعمرة/غم مقارنة ب10^5×22 مستعمرة/غم وللسلالة البرية النامية على الوسط نفسه.

تقييم حيوية سلالة الفطر *Metarhizium anisopliae* المحلية وطافراتها النامية في بعض الاوساط الغذائية لمدة خزن 30 يوم بدرجات حرارة 30 و40 و 50 ºم:

يبينت النتائج المدونة في جدول (2) أن السلالة M45-2 الطافرة العائدة للفطر *M.anisopliae* أبدت أعلى نمو بتفوق معنوي في وسط بذور الدخن عند الزمن صفر أي في حال اكتمال النموالفطري في الوسط إذ بلغت أعداد المستعمرات النامية 10^6×950 مستعمرة/غم مقارنة ب10^6×877 مستعمرة/غم للسلالة *M.anisopliae* البرية غير الطافرة. كما تفوقت معنوياً السلالة نفسها في جميع الأوساط الأخرى عدا الوسطين الذرة الصفراء ونخالة الحنطة إذ كانت أعداد المستعمرات في الذرة الصفراء للسلالة الطافرة M45-2 323 ×10^6 مستعمرة/غم مقارنة بسلالة البرية Mwt التي بلغت أعداد المستعمرات فيها 10^6×421 مستعمرة/غم إلا إن التفوق في هذا الوسط لم يكن معنويا ، والوسط نخالة الحنطة التي بلغت فيه أعداد المستعمرات للسلالة الطافرة 10^6×331 مستعمرة/غم وأعداد المستعمرات في السلالة البرية ×10^5 مستعمرة/غم 10^6×703 مستعمرة/غم والذي كان ذو معنوية عالية جدول (6) . عند الخزن بدرجة حرارة 30 و40 و50 ºم فقد أثرت هذه الدرجات في نمو الفطر *M.anisopliea* إذ ادت الى تناقص في أعداد المستعمرات النامية، وبلغ أعلى عدد للمستعمرات النامية بدرجة 30ºم للسلالة الطافرة M45-2 10^6×883 مستعمرة/غم بتفوق غير معنوي مقارنة بالسلالة البرية إذ بلغت أعداد المستعمرات فيها 10^6×812 مستعمرة/غم . كما ويبين الجدول نفسه أن نمو السلالة الطافرة M45-2 كان بعدد مستعمرات أكبر في باقي الأوساط لكن التفوق ايضاً لم يكن معنوياً . وعند اختبار حيوية النمو عند درجة الحرارة 40ºم فقد تفوقت السلالة الطافرة M45-2 عند النمو في وسط بذور الدخن كذلك إذ بلغت أعداد المستعمرات فيها 10^6×443 مستعمرة/غم مقارنة ب10^6×391 مستعمرة/غم للسلالة البرية النامية على الوسط نفسه، اما نمو المستعمرات في درجة الحرارة 50ºم فقد تفوقت فيه السلالة الطافرة M45-2 النامية في وسط البتموس بأعداد مستعمراتها البالغة 10^6×235 مستعمرة/غم مقارنه بالسلالة البرية التي بلغت أعداد مستعمراتها 10^6×211 مستعمرة/غم، في حين كان اقل نمو في هذه الدرجة للسلالة البرية النامية على وسط كوالح الذرة حيث بلغ أعداد المستعمرات فيها 10^6×27 مستعمرة/غم مع تفوق بسيط للسلالة الطافرة M45-2 أذ بلغت اعداد المستعمرات فيها 10^6×38 مستعمرة/غم .

جدول (2) تقييم حيوية سلالة الفطر *Metarhizium anisopliae* المحلية وطافراتها النامية في بعض الأوساط الغذائية لمدة خزن 30 يوم بدرجات حرارة 30 و40 و 50 ºم (عدد المستعمرات × 10^6 / غم)

الوسط	السلالة	الزمن صفر حال اكتمال النمو	درجة حرارة الخزن (ºم)		
			30	40	50
الرز	Mwt	A717c	B404c	C370b	B106c
	M45-2	A848b	B 556.5 b	C294c	D170b
سبوس	Mwt	A 327.2 g	B 209.5 d	C112f	D56e
	M45-2	A 377.5 fg	B309cd	C 135.5 e	D65de
حنطة	Mwt	A480e	B406c	C221d	D72d
	M45-2	A730c	B552b	C340bc	D106c
نخالة حنطة	Mwt	A703c	B331 cd	C101f	D17f
	M45-2	A331g	A366cd	B122e	C31f
بتموس	Mwt	A536d	B428c	C374.5b	D211a
	M45-2	A541d	B437c	C380b	D235a
دخن	Mwt	A877ab	A812a	B391b	C102 c
	M45-2	A950a	B883a	C443 a	D133bc
ذرة	Mwt	A421ef	A395cd	B109f	C78d
	M45-2	A323g	A317cd	B 204.5 d	C103c
كوالح ذرة	Mwt	A321g	B222d	C106f	D27f
	M45-2	A360fg	B231d	C115ef	D38f

*تشير الأحرف الصغيرة المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية والأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية بين السلالات الفطرية ضمن الأعمدة وتشير الأحرف الكبيرة المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوية والأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن الصفوف حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05 .

تقييم حيوية سلالة الفطر *Beauveria basiana* المحلية وطافراتها النامية في بعض الأوساط الغذائية لمدة خزن 60 يوم بدرجات حرارة 30 و40 و 50 ºم :

يبينت النتائج المدونة في جدول (3) ان السلالة الطافرة B105-1 أعطت أعلى نمو بتفوق معنوي في وسط البتموس عند الزمن 60 يوماً وبدرجة حرارة 30 ºم إذ بلغت أعداد المستعمرات 208.6×10^5 مستعمرة/غم مقارنة بالسلالة البرية التي بلغت أعداد مستعمراتها 113×10^5 مستعمرة/غم بينما شهد الوسط نخالة الحنطة والبتموس تناقصاً في نمو المستعمرات إذ وصل إلى صفر في السلالة البرية للوسط البتموس وعند اختبار حيوية النمو عند الدرجة 40ºم لوحظ تفوق الطافرة B105-1 عند النمو في وسط الذرة الصفراء بعدد مستعمرات بلغ 4 ×10^5 مستعمرة/غم مقارنة بسلالة الأبوية 0.66×10^5 مستعمرة/غم وبين الجدول نفسه انخفاض نمو المستعمرات للسلالات الباقية . يبين الجدول عينه انخفاض في نمو المستعمرات الفطرية للسلالة الطافرة والأبوية في جميع الأوساط عند درجة الحرارة 50ºم وذلك لكون درجات الحرارة المرتفعة تؤثر سلباً على نمو الفطريات حيث بلغ أعلى نمو للسلالة الطافرة B105-1 في وسط الذرة كذلك بعدد مستعمرات بلغ 2.33×10^5 مستعمرة/غم مقارنة بسلالة البرية والتي لم تشهد أي نمو أما باقي الأوساط فلم تشهد أي نمو كذلك عدا نمو منخفض في وسط نخالة الحنطة للسلالة الطافرة B105-1 إذ بلغ 1.33×10^5 مستعمرة/غم.

تقييم حيوية سلالة الفطر *Metarhizium anisopliae* المحلية وطافراتها النامية في بعض الاوساط الغذائية لمدة خزن 60 يوم بدرجات حرارة 30 و40 و 50 ºم :

تفوق معنوي للسلالة الطافرة M45-2 النامية في وسط الحنطة عند درجة الحرارة 30ºم بعدد مستعمرات بلغ 356 ×10^6 مستعمرة /غم مقارنة بالسلالة البرية التي بلغت أعداد مستعمراتها 327×10^6 مستعمرة /غم كما وتفوقت معنوياً السلالة الطافرة M45-2 نفسها عند نموها في أوساط كوالح الذرة وبذور الدخن والبتموس ونخالة الحنطة والسبوس عدا الوسطين الرز والذرة إذ كان النمو معنويا للسلالة البرية فقد بلغت في الرز 277×10^6 مستعمرة /غم بينما بلغت أعداد المستعمرات في السلالة الطافرة M45-2 86.66 ×10^6 مستعمرة /غم ووسط الذرة بلغت أعداد المستعمرات في السلالة البرية 55.33 ×10^6 مستعمرة /غم بينما في السلالة الطافرة M45-2 بلغت أعداد المستعمرات فيها 45×10^6 مستعمرة /غم . عند الخزن بدرجة الحرارة 40ºم تفوقت السلالة الطافرة M45-2 النامية في وسط الدخن إذ بلغت أعداد المستعمرات فيها 141.66 ×10^6 مستعمرة/غم مقارنة بالسلالة البرية حيث بلغت أعداد مستعمراتها 112.3 ×10^6 مستعمرة/غم وسجلت السلالة نفسها تفوقا معنويا في باقي الاوساط مقارنة بالسلالة البرية إلا انها لم تسجل فروقاً معنويا عدا وسط الرز الذي سجل معنوية عالية للسلالة الطافرة بلغت 80×10^6 مستعمرة/غم مقارنة بالسلالة البرية التي بلغت أعداد مستعمراتها 1×10^6 مستعمرة/غم ووسط كوالح الذرة لم يسجل أي نمو في كلا السلالتين البرية والطافرة في درجة الحرارة هذه. وعند اختبار حيوية النمو في درجة الخزن 50ºم لوحظ تفوق السلالة الطافرة M45-2 النامية في وسط الذرة بعدد مستعمرات بلغ 23 ×10^6 مستعمرة/غم مقارنة بسلالة البرية التي سجلت نمو للمستعمرات بلغ 18×10^6 مستعمرة/غم تلتها السلالة الطافرة النامية في وسط بذور الدخن والتي بلغت 20 ×10^6 مستعمرة/غم مقارنة بالسلالة البرية النامية على نفس الوسط والتي بلغت عدد مستعمراتها 16.33 ×10^6 مستعمرة/غم ثم تلاه وسط السبوس بعدد مستعمرات بلغ 3.77 ×10^6 مستعمرة/غم والتي تفوقت ايضاً على السلالة البرية التي

بلغت 1.33 ×10^6 مستعمرة/غم وبعدها وسط الرز والتي كانت نمو أعداد المستعمرات للسلالتين متساوياً بلغ 0.33 ×10^6 مستعمرة/غم أما بقية الأوساط (كوالح الذرة و البتموس و نخالة الحنطة و الحنطة) لم تسجل أي نمو في كلا السلالتين لهذه الدرجة .

جدول (3) تقييم حيوية سلالة الفطر *Beauveria basiana* المحلية وطافراتها النامية في بعض الأوساط الغذائية لمدة خزن 60 يوم بدرجات حرارة 30 و40 و 50 ºم (عدد المستعمرات × 10^5 / غم)

الوسط	السلالة	الزمن صفر حال اكتمال النمو	درجة حرارة الخزن (ºم)		
			30	40	50
الرز	Bwt	217c A	24de B	0.33b C	0b C
	B105-1	216c A	57.66c B	3.33ab C	1ab C
سبوس	Bwt	153d A	113b B	2ab C	0b C
	B105-1	270b A	208.6 a B	0.33 b C	0b C
حنطة	Bwt	190c A	10.33de B	0.33b C	0b C
	B105-1	238bc A	20.66 de B	1b C	0b C
نخالة حنطة	Bwt	214c A	2e B	0b C	0b C
	B105-1	317a A	2e B	2ab B	1.33ab B
بتموس	Bwt	37f A	0e B	0b B	0b B
	B105-1	58f A	3.66e B	0b B	0b B
دخن	Bwt	110e A	18de B	0b C	0b C
	B105-1	178c A	25 d B	2.33ab C	1ab C
ذرة	Bwt	156 d A	61.66 c B	0.66b C	0b C
	B105-1	215c A	128.3b B	4a C	2.33a C
كوالح ذرة	Bwt	57f A	31.66d B	0b C	0b C
	B105-1	66 f A	55cd AB	2ab C	0b C

***تشير الأحرف الصغيرة المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية والأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية بين السلالات الفطرية ضمن الأعمدة وتشير الأحرف الكبيرة المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوية والأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن الصفوف حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05 .**

كما أشارت النتائج إلى ان أعلى عدد لمستعمرات السلالات الطافرة والسلالة البرية سجل في الزمن صفر أي عند اكتمال النمو وقد يعزى السبب إلى إن الفطريات نمت في الأوساط الغذائية المختلفة بعد مرورها بزمن التحضين البالغ سبعة ايام وهي مدة الطور اللوغارتمي (الاسي) للنمو الذي يعطي أعلى كتلة حيوية للفطر (Wilson وTalbot 2009) . في حين يلاحظ ان الدرجات الحرارية 30 و 40 و 50 ºم أثرت معنوياً في حيوية هذه السلالات وهذا ربما يعزى إلى تأثير درجات الحرارة في فعاليات الكائن الحي إذ لكل كائن مدى حراري ممكن العيش فيه وعادة تفضل الفطريات المدى الحراري ما بين 20-30ºم كأفضل مدى للنمو الأمثل في حين تعد الدرجتين الحراريتين 40 و50 مؤثرة سلباً في نمو هذه السلالة (تؤثر درجات الحرارة على الفعاليات الأيضية للكائن الحي وخاصة على أنظمة الأنزيم المسؤولة على معظم الفعاليات الحيوية للكائن (Wilson و Talbot،2009) . كما وأشارت النتائج إلى أن السلالة الطافرة أعطت نمواً أعلى من السلالة البرية لجميع الدرجات الحرارية المختبرة وهذا ربما يعود إلى تحسين الصفات الوراثية للسلالة الطافرة بفعل التغاير الوراثي الناتج من التعرض للإشعاع (Moore و Frazer، 2002).

جدول (4) تقييم حيوية سلالة الفطر *Metarhizium anisopliae* المحلية وطافراتها النامية في بعض الأوساط الغذائية لمدة خزن 60 يوم بدرجات حرارة 30 و40 و 50 م° (عدد المستعمرات × 10^6 / غم)

الوسط	السلالة	الزمن صفر حال اكتمال النمو	درجة حرارة الخزن (م°) 30	40	50
الرز	Mwt	717c A	86.66de B	1e C	0.33c C
	M45-2	848b A	277b B	80c C	0.33c D
سبوس	Mwt	327.2 g A	145cd B	20.66de C	1.33cd D
	M45-2	377.5 fg A	147.3cd B	13.66de C	3.77c D
حنطة	Mwt	480e A	327.6ab B	43d C	0d D
	M45-2	730c A	356a B	56.66cd C	0d D
نخالة حنطة	Mwt	703c A	1e B	0.33e B	0d B
	M45-2	331g A	1.66e B	1e B	0d B
بتموس	Mwt	536d A	34.33e B	14.66de C	0d D
	M45-2	541d A	44.66e B	16.33de C	0d D
دخن	Mwt	877ab A	205c B	112.3b C	16.33b D
	M45-2	950a A	265 b B	141.66a C	20ab D
ذرة	Mwt	421ef A	55.33de B	21.66de C	18b C
	M45-2	323g A	45.66e B	35d BC	23a C
كوالح ذرة	Mwt	321g A	115.6d B	0e C	0d C
	M45-2	360fg A	202c B	0e C	0d C

*تشير الأحرف الصغيرة المتشابهة إلى عدم وجود فروق معنوية والأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية بين السلالات الفطرية ضمن الأعمدة وتشير الأحرف الكبيرة المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوية والأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات ضمن الصفوف حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى 0.05 .

أما أسباب نمو السلالة وطافراتها باختلاف الوسط الغذائي فقد يعود إلى أختلاف مكونات الأوساط المختبرة حيث تعد هذه الأوساط من الأوساط الصلبة العضوية الطبيعية والتي تختلف في مكوناتها من الألياف والبروتينات والكاربوهيدرات والدهون والاملاح والفيتامينات وهذا الاختلاف ينعكس على نمط وسرعة نمو الفطر، ومع ذلك فإن الاختلاف الناجم عن نمو السلالات الفطرية باختلاف الوسط الغذائي واختلاف درجة حرارة الخزن يعود اساساً إلى التغاير الوراثي للفطر الناتج بفعل التطفير Hanh-vu وآخرون، (2009) .

المصادر

1. شاكر ، امنة نايف،(2015). تأثير توافقية المسببات الممرضة للحشرات مع بعض المبيدات الحشرية الحديثة في مكافحة عثة الطماطة Tuta absoluta (Myrick) (Lepidoptera:Gelechiidae)رسالة ماجستير، كلية الزراعة ـ جامعة تكريت .
2. الفضلي ، ايمن وليد خالد، (2016) ، تقييم فاعلية بعض الفطريات الممرضة للحشرات المعزولة من تربة بساتين الحمضيات على ذبابة الفاكهة(*Ceratitis capitata (Wiedemann* . (Diptera : Tephretidae) .رسالة ماجستير ،،كلية الزراعة ، جامعة تكريت
3. Bhoosreddy،G.L.(2014) Use of low cost substrates in Mass production of *Metarhizium anisopliae* and evaluation of its insecticidal potential as mycopesticide .International Journal of Advanced Research . 2(8): 62-65.
4. Brown، J.S.and Holden، D.w (1998). Insertion mutagenesis of Pathogenic fungi . Curr Opin Microbiol 1:390-394.

5. Cooper،C.(1977). the tools of Biochemistry. john wily and Sons Inc. USA. (pp.309-354).
6. Driver، F.، Milner، R.J، Trueman، J.W.H. (2000) A taxonomic revision of Metarhizium based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycology Research 104: 134-150.
7. Hanh-Vu،v.،Pham، T.A. and Kim،K.(2009) Fungal Strain Improvement for Cellulase Production Using Repeated and Sequential Mutagenesis Micnbiology، 37(4):267-271.
8. Hassan،A.A.(2011). Improvement of Antagonism and Fungicides Tolerance in Iraqe Trichoderma Harzianum Isolates by Ultra-Violet Irradiation ، Australian Journal of Applied and Busic Science 5(11):909،917،2011.
9. Ho،H.L. and Ho،K.F(2015) ، Fungal Strain Improvement of Aspergillus brasiliensis for Overproduction of Xylanase in Submerged Fermentation through UV Irradiation and Chemicals Mutagenesis J. of Adv. In Biol. Biotech. 3(3) 117-131.
10. Jagadeesh، C.S، Venkatachalapathy، C.M. and Anitha، C.N.(2008). Evaluation of locally available substrate for mass production of entomopathogenic fungi، Metarhizium anisopliae (Metch).Journal of biopesticides،1(2):146-147.
11. Jian Hui Wu; Shaukat Ali and Shun Xiang Ren.(2010). Evaluation of Chitinase from Metarhizium anisopliae as Biopesticide Against Plutella xylostella. Pakistan J. Zool. 42(5): 521-528.
12. Kuhad، R. C.، Kumar، M. and Singh، A. (1994). A hypercellulolytic mutant of Fusarium oxysporum . Lett. Appl. Microbiol. 19:397-400.
13. Latifian،M. ، Rad،B.، Amani،M. and Rahkhodaei،E.(2013) Mass production of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana (Balsamo) by using agricultural products based on liquid- solid diphasic method for date palm pest control. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 5(19)، 2337-2341.
14. Mustafa، U. and Kaur، G. (2009). Extracellular Enzyme Production in Metarhizium anisopliae Isolates. Folia Microbiologica، 54: 499-504.
15. Scholte،E.J.; Knols، B.G.J. ; Samson، R.A. and Takken، W. .(2003) . Entomopathogenic Fungi for mosquito control .J. Insect sci، pp.
16. Skrobek، A، S، Farooq A. and Butt، Tariq M. (2008). Destruxin production by the entomogenous fungus Metarhizium nisopliae in insects and factors influencing their degradation. BioControl.53:361–373.
17. Subhash C. Gupta; Timothy D. Leathers; Galal N. El-Sayed andCarlo M. Ignoffo.(1991). Production of degradative enzymes by Metarhizium anisopliae during growth on defined media and insect cuticle،J. Experimental Mycology.15: 310–315.
18. 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.
19. Tweddell،R.J،،S.H.Jabaji-Hare and P.M. Charest ،(1994). Production of chitinase and β-1،3 glucanase by stachybortys eleyans ، amycoparasite of Rhizoctonia solani Appl Environ . Microbiol .،60:489-495
20. Wilson ، R.A. and Talbot ، N،J(2009). Fungal Physiology-a future perspective microbiology .Iss،3810-3813.
21. Moore،D and Frazer ، L.(2002).Essential fungal Genetics ، Spriger-Veriag New York، Inc.