تأثير بيروكسيد الهايدروجين في حيوية الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. وقابليته على النمو القطري في الوسط الزرعي اكار كايتين

The effect of Hydrogen Peroxide on the viability of *Beauveria bassiana* and their ability for radial growth on Chitin Agar

حسين مكطوف ديوان حسين نعيمة كشمر ماجد ابراهيم عبدالله بلاسم احمد عباس
وزارة العلوم والتكنولوجيا
Hussein Magtoff Diwan Husein Neayma Keshmer
Majed Ibrahim Abdela Belasim Ahmed Abas
Ministry of Sciences and Technology

المستخلص

هدفت بعد اربع فترات زمنية 1،2،3،4 أيام من تعرضها لتلك التراكيز عند درجة حرارة 28 ± 1م وقابلية الفطرعلى النمو القطري في الوسط الزرعي كايتين اجار بعد 11 يوم من الحضن عند درجة حرارة 26 ± 1م ، اذ استخدم هذا الفطر في مكافحة العديد من الآفات الحشرية ومن بينها حشرة دوباس النخيل *Ommatissus lybicus* . بينت النتائج تفوق حيوية ابواغ هذه الدراسة الى اختبار تأثير خمسة تراكيز من بيروكسيد الهايدروجين (50،100،200،300،400)ppm في حيوية ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* الفطر *B. bassiana* في معاملة السيطرة التي هي عبارة عن ابواغ الفطر وماء مقطر فقط التي تراوح معدلها بدلالة عدد المستعمرات المتكونة على الوسط الزرعي اكار دكستروز مستخلص البطاطا بين (175-257) مستعمرة/ طبق وكان المعدل 257 مستعمرة/طبق هو الاعلى مابين المعاملات الاخرى فيما كان المعدل 91.7 مستعمرة/طبق عند تركيز 50 ppm هو الافضل P=0.05 مقارنة بمعدل الحيوية في بقية المعاملات التي فيها تعرضت ابواغ الفطر الى تراكيز اعلى من بيروكسيد الهايدروجين، كما فقدت الابواغ حيويتها بعد تعرضها للتركيز 400 ppm من بيروكسيد الهايدروجين . ومن ناحية اخرى اظهرت النتائج تفوق P=0.05 الفطر في معدل نموه القطري 3.46 سم في معاملة السيطرة بعد 4 أيام من الحضن مقارنة بمعدلات النمو القطري في فترات الحضن الاخرى والتي سجل فيها الفطر اقل معدل من النمو القطري 0.43سم بعد يوم واحد من الحضن فيما تفوقت معنويا P=0.05 المعاملات ذات التراكيز 50 ppm 3.47 سم و 100 ppm 3.5 سم في معدل النمو القطري للفطر بعد يوم واحد من تعرض الفطر الى تلك التراكيز من بيروكسيد الهايدروجين مقارنة ببقية المعاملات ذات التراكيز وفترات التعرض المختلفة التي فقد فيها الفطر مقدرته على تحليل الكايتين نتيجة تعرض ابواغ الفطر للتراكيز (300،400) ppm من بيروكسيد الهايدروجين .

الكلمات المفتاحية: بيروكسيد الهيدروجين، النمو القطري، ابواغ الفطر *Beauveria bassiana*

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of five concentrations of hydrogen peroxide (50, 100,200,300,400) ppm on the viability of *Beauveria bassiana* spores after 1,2,3,4 days of exposure at 28 ± 1C° and on the radial growth ability of the fungus on chitin agar medium after 11 days of incubation at 26 ± 1C°.This fungus was also used to control the Date palm dubas *Ommatissus lybicus*. The results showed that the viability of *B. bassiana* spores of control (distill water with fungal spores) of a rate ranged between 157 – 257 colony/ petri dish on potato dextrose agar and the rate 257 colony/petri dish was higher than those of other treatments, while the rate 91.7 colony/petri dish at 50ppm concentration of hydrogen peroxide was the best p= 0.05 in comparison with the viability rate of other treatments in which the spores were exposed to highest concentrations of hydrogen peroxide. It was also seen that spores lost their viability after exposure to 400 ppm of hydrogen peroxide. On the other hand, the results showed that the rate of radial growth 3.46cm in control group after 4 days of incubation in comparison with this in the other group was higher. The fungus showed lowest rate of radial growth 0.43cm after one day of incubation p= 0.05, while the one day exposure of spores to each of 50,100 ppm of hydrogen peroxide showed 3.47,3.5cm respectively which were significantly higher p= 0.05 in comparison with other concentrations, improving which the higher concentration the lower activity of fungal degrade chitin.

Key words: Hydrogen Peroxide, radial growth, *Beauveria bassiana* spores

المقدمة

تؤثر الاشعة فوق البنفسجية سلبا على الكائنات الحية فبالاضافة الى ما تسببه من تاثير مباشر على الكائنات الحية الدقيقة وذلك من خلال تحطيمها لوحداتها التكاثرية كما هو الحال في تحطيم كونيدات فطر المكافحة الاحيائية للآفات الحشرية *Beauveria bassiana* [1] فانها ايضا تؤثر بصورة غير مباشرة في هذه الكائنات اذ ان تكون بيروكسيد الهايدروجين بسبب التعرض المباشر

للاشعة فوق البنفسجية هو احد العوامل الرئيسة التي تؤدي الى قتل معظم الكائنات الحية الدقيقة ومنها عوامل المكافحة الاحيائية سواء في الظروف المختبرية او في ظروف الحقل . يعد الفطر *Beauveria bassiana* احد عوامل المكافحة الاحيائية المهمة التي شاع استعمالها في مكافحة الآفات الحشرية التي تشكل مصدر تهديد زراعي واقتصادي في البلدان العربية والعالمية، ويتميز هذا الفطر بمداه الواسع في التطفل على الحشرات الضارة التي تعود الى الرتب حر شفية الاجنحة وثنائية الاجنحة ومتشابهة الاجنحة. اكد [2] ان بيروكسيد الهايدروجين المتواجد في محلول Jet 5 الذي هوعبارة عن مزيج من 20 % بيروكسيد الهايدروجين مع 5 % من حامض البيراسيتيك يمكن ان يوقف نمو بعض الفطريات المهمة الممرضة للنباتات والبكتريا في ظروف المخ تبر والغرفة الباردة . ان موت نسبة عالية من ابواغ فطريات المكافحة الاحيائية بعد تعرضها لظروف الاكسدة الشديدة تحت الظروف الحقلية غالبا مايؤدي الى فشل انجاز المكافحة الاحيائية للآفات الزراعية. اكدت معظم الدراسات السابقة الى ان اغلب الحالات التي تظهر فيها الكائنات الحية الدقيقة تحملها لبيروكسيد الهايدروجين يعود بالدرجة الاساس الى استجابة تلك الكائنات جينيا لظروف الشد البيئي بالاتجاه الذي يحافظ على بقاء تلك الكائنات حية او يحفزها على التكاثر ومنها تلك المادة المثبطة لنمو معظم الكائنات الحية الدقيقة [3،4،5،6، 7]. شخص[8] الجينات المسؤولة عن استجابة الخميرة *Schizosaccharomyces pombe* لمعظم الظروف البيئية المتطرفة ومنها التعرض لبيروكسيد الهايدروجين وهذه الجينات هي CESR اذ بينوا حصول تحول جذري في وظيفة هذه الجينات اذ تقوم بتحفيز الخميرة على التبرعم بدلا من الانشطار في حال تعرضها الى شد بيئي معين ومنه تعرضها الى بيروكسيد الهايدروجين.

توجد علاقة بين هيدروكسيد الهايدروجين وقابلية الفطر *Beauveria bassiana* على هظم الكايتين الذي يعتبر بوليمر كاربوهيدراتي استنادا الى ماذكره [9] من ان الفطريات لاتستطيع ان تستفيد من اللكنين lignin (بوليمر كاربوهيدراتي) كمصدر كاربوني وحيد مالم يكون هنالك بيروكسيد هايدروجين ينتج عن التمثيل الغذائي لاحد المركبات الكاربوهيدراتية ذات العلاقة الذي يعد ضروريا لتحفيز الفطريات على النمو وتحليل او هظم اللكنين.

هدفت هذه الدراسة الى الحصول على ابواغ من الفطر *Beauveria bassiana* ذات قابلية على تحمل تراكيز مؤثرة من بيروكسيد الهايدروجين بهدف ادخالها في مستحضرات فطرية مستقبلا.

المواد وطرائق العمل

الفطر Beauveria bassiana

استخدمت في هذه الدراسة العزلة 5x من الفطر *Beauveria bassiana* ، حيث تم رمز للفطر *B. Bassian* بالحرف x ولتسلسل العزلة بالرقم 5 من بين سبعة عزلات من الفطر نفسه ، اذ تم الحصول على هذه العزلة من قسم الحشرات- مركز البحوث الزراعية - منظمة الطاقة الذرية العراقية سابقا سنة 2000 والتي مصدرها من الاردن .

تحضير اللقاح الفطري للفطر Beauveria bassiana

لاجراء هذه الدراسة زرع الفطر *Beauveria bassiana* على الوسط الزرعي اجار دكستروز مستخلص البطاطا PDA في اطباق بتري سعة 9 سم وبعد عشرة ايام من الحضن عند درجة حرارة 28 ±1م تكونت عدد من المستعمرات الفطرية، اضيف لها 15مل من الماء المقطر المعقم وتم قشطها وتفتيت ها باستعمال شريحة عد الابواغ معقمة haemocytometer slide حسب تركيز الابواغ (4×10^7 بوغ / مل) باستخدام شريحة عد الابواغ ووفق المعادلة التالية:

معدل عدد الابواغ / مل = معدل عدد الابواغ في المربع (0.2 × 0.2 ملم) × 25×10^4

رشح المعلق الناتج عن تفتيت المستعمرات عبر قمع بخنرمعقم . جمع الراشح (معلق الابواغ) في قنينة زجاجية معقمة وحفظت في الثلاجة لحين الاستخدام.

تاثير بيروكسيد الهايدروجين في حيوية الفطر Beauveria bassiana

لغرض اختبار تاثير بيروكسيد الهايدروجين 40 % في حيوية ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* تم تحضير اربع تراكيز من محلول بيروكسيد الهايدروجين وكما يلي50،100،200،300،400 ppm وذلك باستعمال الماء المقطر وبمعدل لتر / تركيز، حيث تم توزيع المحاليل في قناني زجاجية مزودة باغطية بلاستيكية سعة 250مل بمعدل 50مل/قنينة كما استخدم ماء مقطر فقط كمعاملة سيطرة وتم توزيعه ايضا في القناني الزجاجية وبنفس المعدل . تم تقسيم وتوزيع عدد القناني على اساس المعاملات التي تضمنت التراكيز المختلفة والفترات الزمنية التي تراوحت بين 1،2،3،4 ايام التي يتم فيها تعريض ابواغ الفطر لتلك التراكيز عند درجة حرارة 28±1 °م وبواقع ثلاث مكررات (ثلاث قناني زجاجية)/ معاملة . اضيف معلق الابواغ الى القناني كل قنينة زجاجية التي تحتوي على التراكيز المختلفة من بيروكسيد الهايدروجين بمعدل مل واحد / قنينة وبواقع ثلاث قناني (مكررات)/معاملة . تم حضن القناني عند 28 ±1°م وحسبت حيوية الابواغ بعد كل فترة من التعرض . حسبت الحيوية بطريقة عد المستعمرات المتكونة على سطح الوسط الزرعي PDA المحضر في اطباق بتري سعة 9 سم حسب الطريقة الموصوفة [10] وذلك باضافة 0.5 مل من كل قنينة الى سطح الوسط الزرعي حيث وزعت كمية اللقاح ال فطري على سطح الوسط الزرعي بصورة متجانسة باستعمال شريحة عد الابواغ المعقمة (haemocytometer slide). تم حضن الاطباق الملقحة لفترة 6 ايام في حاضنة عند 28±1°م ومن ثم حسب عدد المستعمرات المتكونة على سطح الوسط الزرعي في كل طبق(مكرر) عائد لمعاملة معينة.

تاثير بيروكسيد الهايدروجين في قابلية الفطر B. bassiana في استخدام الكايتين

لغرض اختبار تاثير التراكيز المختلفة من بيروكسيد الهايدروجين وفترات تعرض ابواغ الفطر لها في قابلية الفطر ***B. bassiana*** على تحليل الكايتين واستخدامه ، حضر الوسط الزرعي كايتين اكار وفق الطريقة الموصوفة [11]. قسمت الاطباق5سم الى مجاميع اذ كل مجموعة عبارة عن ثلاث اطباق (ثلاث مكررات)/ معاملة. باستعمال ثاقب فلين معقم لوثت الاطباق من المركز باقراص فطرية (قطر القرص 0.5سم) ماخوذة من المستعمرات الفطرية التي تم حسابها في تجربة الحيوية . حضنت الاطباق بعد تلويثهاعند

درجة حرارة 26 ±1°م وتم قياس النمو القطري لكل طبق / معاملة بعد 11 يوم من الحضن واستخرج معدل النمو القطري لثلاث مكررات/معاملة.

النتائج

بينت النتائج في جدول (1) حصول انخفاض في معدل حيوية ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* مع زيادة تركيز بيروكسيد الهايدروجين وفترات تعرض لتلك المادة. كما اوضحت النتائج التفوق المعنوي (P=0.05) لابواغ الفطر في معدل حيويتها في معاملة السيطرة (ماء مقطر فقط) والذي تراوح بين 157- 257 مستعمرة / طبق بتري مقارنة بمعدل حيويتها عند التراكيز المختلفة من بيروكسيد الهايدروجين، كما اظهرت الابواغ بعد يوم واحد من التعرض فروقا معنوية P=0.05 في معدل حيويتها عند التراكيز المختلفة من تلك المادة، اذ بلغ اعلى معدل لها 91.7 مستعمرة/طبق بتري عند التركيز 50 ppm وجاء بالدرجة الثانية 75 مستعمرة/طبق بتري عند التركيز 100 ppm و 53.7 مستعمرة /طبق بتري عند التركيز 200 ppm و 14مستعمرة/طبق بتري عند التركيز300 ppm و 0.0 مستعمرة/طبق بتري عند التركيز 400 ppm، اما بعد يومين من التعرض لبيروكسيد الهايدروجين، اظهرت النتائج في جدول (1) تفوق الابواغ في معدل حيويتها والذي بلغ 77مستعمرة/طبق بتري معنويا P=0.05 على بقية المعدلات عند التراكيز 200،300،400ppm والتي بلغت60، 49.7،7.3،0.0 مستعمرة/طبق بتري على التوالي.

جدول (1) : تاثير تركيز بيروكسيد الهايدروجين في حيوية ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* بعد اربع فترات من التعرض لتلك التراكيز

فترة التعرض(يوم)	تركيز بيروكسيد الهايدروجين (ppm)						**L.S.D (p= 0.05) لتراكيز بيروكسيد الهايدروجين
	ماء مقطر(0.0)	50	100	200	300	400	
1	*157	*91.7	*75	*53.7	*14	*0.0	12.91
2	*185.3	*77	*60	*49.7	*7.3	*0.0	12.45
3	*223.3	*54	*44	*28.3	*5.3	*0.0	11.04
4	*257	*20.7	*14.3	*7.3	*0.0	*0.0	21.75
L.S.D (p= 0.05) لفترات التعرض	26.85	9.45	13.75	11.7	9.49	0.0	

*عدد المستعمرات الفطرية

** Least Significant Difference

على الرغم من عدم وجود فروق معنوية في معدل الحيوية عند التركيزين (50،100) ppm بعد ثلاثة ايام من التعرض لبيروكسيد الهايدروجين والذي بلغ (44،54)مستعمرة/ طبق بتري غير انهما كانا متفوقين معنويا (P=0.05) مقارنة بمعدلات الحيوية عند التراكيز (200 ، 300، 400) ppm والتي بلغت (0.0،5.3،28.3) مستعمرة/طبق بتري على التوالي، كما اظهرت النتائج في جدول (1) عدم وجود فروق معنوية في معدل الحيوية للابواغ عند التراكيز كافة من بيروكسيد الهايدروجين بعد اربعة ايام من التعرض والذي تراوح بين 20.7- 0.0 مستعمرة/طبق بتري . ومن ناحية اخر ى اظهرت النتائج في جدول (1) ان حيوية ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* قد تاثرت بفترات تعرضها لبيروكسيد الهايدروجين الى جانب تاثرها بالتراكيز المختلفة من بيروكسيد الهايدروجين نفسه والتي تم استعراضها اعلاه ، اذ بينت النتائج ان معاملة السيطرة اظهرت تفوقا معنويا (p=0.05) على بقية المعاملات في مستوى حيوية ابواغ الفطر اذ تراوح معدل عدد المستعمرات المتكونة من نمو الابواغ ابتداءا من فترة الحضن الاولى ولغاية فترة الحضن الرابعة بين (157-257)مستعمرة/ طبق بتري كما بينت النتائج بصورة عامة ان افضل معدل من الحيوية حققتها ابواغ الفطر كانت بعد يوم واحد من تعرضها للتراكيز المتصاعدة من بيروكسيد الهايدروجين وكان أعلى معدل(p=0.05) سجلته ابواغ الفطر من الحيوية في هذه الفترة عند التركيزين (50،100) ppm والذي بلغ(75،91.7) مستعمرة/ طبق بتري على التوالي مقارنة بمعدل حيويتها بعد (2،3،4) ايام من تعرضها للتركيزين نفسيهما من بيروكسيد الهايدروجين والذي تراوح بين (20.7- 77) مستعمرة/ طبق بتري و (60- 14.3) مستعمرة/ طبق بتري على التوالي، كما اظهرت ابواغ الفطر بعد يومين من التعرض لبيروكسيد الهايدروجين عند (50،100) ppm تفوقها المعنوي (p=0.05) في معدل حيويتها (60،77)مستعمرة/طبق بتري على التوالي مقارنة بالمعدلات بعد (3و 4) ايام من التعرض كما ظهر هذا التفوق المعنوي في معدل الحيوية بعد 3 ايام (54 و 44) مستعمرة/ طبق بتري عند التركيزين (50،100) ppm على التوالي مقارنة بمعدل الحيوية بعد 4 أيام من التعرض والذي بلغ (20.7و 14.3) مستعمرة/طبق على التوالي عند التركيزين نفسيهما . اما عند التركيز (200 و 300) ppm فان ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* لم تظهر اي فروق معنوية في معدل حيويتها خلال الفترات الاربع من ا لتعرض لهذين التركيزين من بيروكسيد الهايدروجين ومع ذلك فان افضل معدل لحيويتها كان بعد يوم واحد من التعرض والذي بلغ (53.7 و 14) مستعمرة/طبق بتري، اما عند التركيز 400 ppm فلم تظهر اي نموات لمستعمرات فطرية على مدى الفترات الاربع من التعرض لبيروكسيد الهايدروجين .

بينت النتائج في جدول (2) التفوق المعنوي (P=0.05) للنمو القطري للفطر *B. bassiana* في الوسط الزرعي كايتين اكار الذي بلغ معدله (3.47 و 2.03) سم و (3.5 و 2.03 سم) بعد استعمال الاقراص الفطرية الماخوذة من المستعمرات الفطرية التي تم حسابها سابقا في تجربة حساب الحيوية والتي مصدر نموها من الابواغ المتعرضة ليوم ويومين من بيروكسيد الهايدروجين عند (50 و 100) ppm على التوالي مقارنة بالنمو القطري بعد استعمال الاقراص الفطري ة الماخوذة من المستعمرات الفطرية التي مصدرها من الابواغ التي تم تعريضها ليوم واحد لبيروكسيد الهايدروجين عند تركيز (300و400) ppm والذي بلغ معدله 0.1 و 0.0 سم على التوالي وكذلك مقارنة بمعاملة السيطرة 0.43 سم وبالنمو القطري بعد استعمال الاقراص الفطرية الماخوذة من المستعمرات الفطرية

التي مصدرها الابواغ المعرضة ليومين الى بيروكسيد الهايدروجين عند 200 ppm 0.5 سم و 300 ppm 0.0 سم و 400 ppm 0.0 سم .

جدول (2): تاثير تركيز بيروكسيد الهايدروجين في النمو القطري (سم) للفطر *Beauveria bassiana* على الوسط الزرعي كايتين اكار

فترة التعرض(يوم)	تركيز بيروكسيد الهايدروجين (ppm)						**L.S.D (p=0.05) لتراكيز بيروكسيد الهايدروجين
	ماء مقطر(0.0)	50	100	200	300	400	
1	*0.433	*3.466	*3.5	*2.033	*0.1	*0.0	0.5458
2	*1.1	*2.033	*2.033	*0.5	*0.0	*0.0	0.3116
3	*2.6	*0.5	*0.3	*0.3	*0.0	*0.0	0.4068
4	*3.366	*0.3	*0.2	*0.1	*0.0	*0.0	0.1937
**L.S.D (p=0.05)لفترات التعرض لبيروكسيد الهايدروجين	0.5622	0.5462	0.3686	0.2174	0.0	0.0	

** Least Significant Difference

* اقطار المستعمرات

كما اظهرت النتائج في جدول (2) عدم وجود اي فروق معنوية في النمو القطري بين المعاملات ذات التركيز 50 ppm 3.47 سم و100 ppm 3.5 سم من جهة وبين المعاملة ذات التركيز 200 ppm 2.03سم بعد يوم واحد من تعرض الابواغ لتلك التراكيز من بيروكسيد الهايدروجين ، هذا بالاضافة الى ذلك لم تظهر الم عاملات ذات التراكيز 50 ppm 2.03 سم و 100 ppm 2.03سم اي فروق معنوية مع معاملة السيطرة 1.1سم بعد يومين من حضن الابواغ . كما بينت النتائج تفوق معاملة السيطرة معنويا P= 0.05 في معدل النمو القطري للفطر والذي بلغ 3.4،2.6 سم بعد 4،3 ايام من الحضن على التوالي مقارنة بالمعاملات الاخرى التي تراوحت فيها معدلات النمو القطري 0.0– 0.5 سم و0.0 – 0.3سم بعد 4,3 ايام من التعرض على التوالي. ومن ناحية اخرى بينت النتائج في جدول (2) التفوق المعنوي P= 0.05 لمعدل النمو القطري للفطر *B. bassiana* بعد استعمال الاقراص الفطرية المأخوذة من المستعمرات الفطرية التي مصدرها نمو الابواغ المتعرضة ليوم واحد الى التراكيز ppm300،200،100،50 من بيروكسيد الهايدروجين والذي تراوح 0.1-3.5سم مقارنة بمعدلات النمو القطري في التراكيز نفسها لفترات التعرض الاخرى التي تراوح ت بين0.0-2.03سم ، فيما انعكست الحالة في معاملة السيطرة اذ تفوق معدل النمو القطري للفطر معنويا P=0.05 والذي بلغ 3.37 سم بعد استعمال اللقاح الفطري للمستعمرات التي مصدرها من الابواغ المحضونة لفترة 4 ايام مقارنة بفترات الحضن الاخرى .

المناقشة

تتفق نتائج هذه الدراسة في جدول (1) بصورة انسيابية مع الحقيقة التي اكدتها معظم الدراسات السابقة من ان بيروكسيد الهايدروجين يعد عامل مؤكسد قوي [12] وان له دور فعال في تثبيط اغلب الكائنات الحية التي تتعرض اليه ومن بينها الفطريات [13] ، اذ بينت نتائج هذه الدراسة ان الانخفاض المستمر في حيوية ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* بعد تعرضها للتراكيز المتصاعدة من بيروكسيد الهايدروجين او نتيجة استمرارية معاملتها بتلك التراكيز خلال فترات التعرض الاربع لدليل على تزايد تاثرها السلبي بتلك المادة (بيروكسيد الهايدروجين) ، اذ اكد [14] في دراسة سابقة ان بيروكسيد الهايدروجين يمكن ان يلعب دور العامل المثبط لفاعلية بعض الانزيمات Superoxide dismutases في خلايا الفطر *Metarhizium anisopliae*، وان تثبيط عمل مثل هذا النوع من الانزيمات يمكن يؤدي الى تجمع كميات مفرطة من الاوكسجين الفعال Superoxide في داخل كل خلية فطرية وبالتالي يمكن ان يرتبط مع الاوكسجين الفعال لينتج عن ذلك تكون جذور الهايدروكسيل الحرة الشديدة الاكسدة . كما اكد [9] ان الاوكسجين الفعال الناتج من وجود بيروكسيد الهايدروجين عبارة عن ايون ذو شحنة سالبة ويعد محطم للاحماض النووية والجزيئات البروتينية والدهنية الخاصة بالكائنات الحية بل يعد محطم لخلايا الكائنات الحية نفسها مما يؤدي الى موتها . وفي الحقيقة على الرغم من الانخفاض في مستوى الحيوية بصورة عامة في الابواغ المعرضة للتراكيز المختلفة من تراكيز بيروكسيد الهايدروجين ولكن هذه النتائج تعكس حقيقة كون ابواغ الفطر عند اي تركيز او بعد اي فترة تعرض تبدي آلية معينة من المقاومة لهذه المادة الى حد معين من المطاولة مع هذه الظروف الضاغطة وقد يكون من بين هذه الآليات المتبعة هي آلية كنس اوازالة Scavenge انواع الاوكسجين الفعال O2- superoxide anion وجذور الهايدروكسيل الحرة OH" hydroxyl radical و بيروكسيد الهايدروجين H2O2 بمساعدة بعض الانزيمات Catalases التي يزداد تركيزها بزيادة تركيز بيروكسيد الهايدروجين المسؤولة حيث تقوم هذه الانزيمات بتحطيم بيروكسيد الهايدروجين وازالة سميته [16،15] اوتعطيلها Detoxification [17] والمانيتول الذي يعد احد المركبات Polyols المتوافرة في ابواغ الفطر *B. bassiana* و*M. anisopliae* و *Peacilomyces farinosus* والذي يبلغ معدل وجوده اكثر من 39 و 134 و 61 ملغ / بوغ على التوالي [18] والتي لها دور مهم في مساعدة بعض الفطريات على مقاومة الظروف البيئية المتطرفة وكذلك الحال بالنسبة لسكر التريهالوز الذي تبلغ كميته اكثر من 32 ملغ في كونيدة الفطر *B. bassiana* والذي له دور مماثل في تحفيز الفطر *M. anisopliae* على تحمل بيروكسيد الهايدروجين بتراكيزه العالية [19]، ولعل ان معدل عدد المستعمرات 91.7 × 10 مستعمرة/ مل المتكونة على الوسط الزرعي PDA بعد يوم واحد من تعرض الابواغ لـ 50 ppm من بيروكسيد الهايدروجين يدل على الاستخدام الاقل من المانيتول للتخلص من بيروكسيد الهايدروجين مقارنة ببقية المعاملات كم ا قد يمثل معدل عدد المستعمرات المتكونة 75 مستعمرة/طبق بتري في الوسط الزرعي PDA المستوى الثاني الاقل في استخدام المانيتول وهكذا اذا

ماقيست هذه الكمية من السكر الكحولي على بقية المعاملات بدلالة حيوية الابواغ وبمستويات مختلفة وقد يعزى سبب الانخفاض المستمر في حيوية ابواغ الفطر بمرور الوقت الى انخفاض مستوى سكر المانيتول نتيجة دخوله المستمر في آلية التخلص من بيروكسيد الهايدروجين المثبط لحيوية الابواغ في كل فترة وعند كل تركيز مما يؤدي الى استهلاكه وقد تجسد ذلك في الابواغ التي تعرضت الى التركيز 400 ppm والتي ربما فقدت كل خزينها من سكر المانيتول وقد توافق هذا الاستنتاج مع النتائج التي توصل اليها [19] حيث انخفضت كمية سكر الارابيتول والارثريتول المتجمعة في كونيدات الفطر *M. anisopliae* بعد تعرضها الى التراكيز العالية من بيروكسيد الهايدروجين . وتجدر الاشارة الى ان المستعمرات المتكونة على سطح الوسط الزرعي PDA الناتجة من نمو الابواغ المتعرضة للتراكيز المختلفة من بيروكسيد الهايدروجين كانت اصغر حجما من المستعمرات المتكونة على الوسط الزرعي نفسه الناتجة من نمو ابواغ معاملة السيطرة وقد يعزى السبب في ذلك الى افتقار النمو الفطري (نتيجة الاجهاد الغذائي والفسلجي للابواغ المتعرضة لبيروكسيد الهايدروجين) الى القدرة على انتاج الهايفات والابواغ بكميات تضاهي عدد الهايفات والابواغ الناتجة من النمو الفطري للابواغ في معاملة السيطرة . كما ان الزيادة الحاصلة في حيوية الابواغ بمرور الوقت من الحضن متمثلة بزيادة معدل عدد الابواغ في كل فترة من الحضن والتي تمثل حالة مغايرة لما حصل في بقية المعاملات ربما يعود الى آلية ال sporogenessis Microcyclic (انتاج الابواغ مباشرة من البلاستوسبورات blastospores المتوافرة في الاوساط الزرعية السائلة) لانتاج الابواغ بكمية اكبر او بطريقة تبرعم انابيب الا نبات الناشئة من هذا النوع من الابواغ [20 ، 21 ، 22 ، 23] والتي ربما بلغت اوجها بعد اربعة ايام من الحضن .

ومن ناحية اخرى اوضحت النتائج في جدول (2) حصول تباين في معدل النمو القطري للفطر *B. bassiana* في الوسط الزرعي كايتين الكار الناتج من اختلاف تاثر ابواغ الفطر بالتراكيز المختلفة من بيروكسيد الهايدروجين وان ماحصل من تفوق معنوي في معدل النمو القطري 3.7 سم و3.5سم على كافة المعاملات ضمن التراكيز والفترات المختلفة ربما يعود الى تعرض تلك الابواغ بعد يوم واحد الى التطفير عند 100،50 ppmعلى التوالي فيما اخذ هذا التطفير منحا سلبيا على الابواغ بعد اكثر من يوم من التعرض لـ 100 ppm وكذلك عند التركيز 200 ppm والتراكيز الاعلى ويعد التغاير في النمو القطري دليلا على التغاير الحاصل في تحمل ابواغ الفطر لظروف الاكسدة المتمثلة بالتماس المباشر لبيروكسيد الهايدروجين ولفترا ت مختلفة . وعلى هذا الاساس ومن خلال النتائج التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة يعد من المفيد جدا ان يكون هنالك اعداد كبيرة من ابواغ الفطر *B. bassiana* الحية منتشرة في ظروف حقلية او في اماكن تطبيقية اخرى والتي تتميز بتحملها للتراكيز 50،100 ppm من بيروكسيد الهايدروجين على مدى يومين و عادة يتحقق هذا المطلب بالانتاج الواسع لهذه الابواغ، كما ان انتاج هذا النوع من الابواغ المتحملة للتراكيز المعينة م ن بيروكسيد الهايدروجين ربما يعد اسلوبا آخرا للتغلب على احد الوسائل الدفاعية لبعض الآفات الحشرية التي تنتج بيروكسيد الهايدروجين [24] .

الاستنتاجات والتوصيات

نستنتج مما تقدم ان حيوية ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* تتناسب عكسيا مع تركيز بيروكسيد الهايدروجين وفترة تعرضها لتلك المادة وان افضل تركيز وفترة ابدت فيها الابواغ تحملها لتلك المادة بيروكسيد الهايدروجين هو عند 50 ppm ولفترة يوم واحد من التعرض لها والتي بلغ معدل حيويتها 58.4 % اي تقريبا 60 % ، كما تعد القيمة 100 % التركيز القاتل LC50 لـ 50 % من ابواغ الفطر *Beauveria bassiana* بعد يوم واحد من التعرض لبيروكسيد الهايدروجين . كما نستنتج ايضا ان بيروكسيد الهايدروجين يعد مادة مطفرة لابواغ الفطر عند تراكيز معينة ولكنه يكون مادة مثبطة لها 100% عند التركيز 300 ppm بعد اربعة ايام من التعرض لبيروكسيد الهايدروجين وفي الفترات جميعها عند التركيز 400 ppm.

نوصي بالمحافظة على ثباتية stability المتغايرات الفطرية (المستعمرات الفطرية) للفطر *Beauveria bassiana* المتحملة للتراكيز 50،100ppm/ml من بيروكسيد الهايدروجين من خلال تنميتها في الوسط الزرعي اكار دكستروز مستخلص البطاطا PDA الذي يحتوي على التراكيز نفسها من بيروكسيد الهايدروجين .

كما نوصي بتطبيق هذه الطريقة على بقية فطريات المكافحة الاحيائية للحصول على منتجات حيوية فعالة ومتحملة لعامل الاكسدة المتمثل ببيروكسيد الهايدروجين تحت ظروف الحقل .

المصادر

1. Ann. Me. Multi-State Project S-301. Annual Meeting about Multi-State Project S-301. (2001). Development, Evaluation and Safty of Entomopathogens for control of arthropod pests. pp.32.
2. Khamis, Y., Corado, C M., Arben and Antonio, I. (2009). Peracetic acid and hydrogen Peroxide (JET 5) suppress Phytopathogenic fungi and bacteria in vitro and in cold room environment. 10th Arab Journal of plant Protection Vol. 27. Abstract Book. Pp.186.
3. Posas, F., Chambers, JR., Heyman, JA., Hoeffler, JP., Nadal, E. de, and Arino, J. (2000). Transcriptional response of yeast to saline stress. J. Biol. Chem. 275: 17249-17255.
4. Gasch, A P., Spellman, P T., Kao, CM., Carmel-Harel, O., Eisen, M B., Storz, G., Botstein, D., and PO., Brown. (2000).Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol. Biol. Cell. 11: 4241–4257.
5. Causton, HC., Ren, B., Koh, SS. Harbison, CT., Kanin, E., Jennings, EG., Lee, TI., True, HL., Lander, ES., and Young, RA. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. Mol Biol. Cell. 12: 323-337.
6. Yale, J. and Bohnert, H J. (2001). Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. J. Biol. Chem. 276:15996–16007.

7. Sahra, Takehiko, Goda, T. and Ohgiya, H J. (2002). Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic Responses in yeast cells to low temperature. J. Biol. Chem. 277:50015–50021.

8. Chen, D., Toone, WM., Mata,J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. (2003). Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. Mol. Biol. Cell. 14: 214-229.

9. Maheshwari, R. (2005). Fungi: Experimental Methods in Biology. (Edited by J. w. Bennett and Paul A. Lemke) Boca Raton London New York Singapore A CRC title, part of the Taylor & Francis imprint, a member of the Taylor & Francis Group, the academic division of T&F Informa plc. Pp.240.

10. Lacey, A L. (1997). Manual of techniques in insect pathology. Academic press, New yourk. 410 pp.

11. Godoy, G., Rodriguez-kabana R. and Morgan-Jones G. (1982). Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycins.* Nematotropica.12:111-119.

12. Hammel. (1997). Localization and release of 13-glucosidase in the thermophilic and cellulolytic fungus Sporotrichium theramophile. Exp. Mycol. 18: 300-310.

13. Averyanov, AA., Lapicova, VP., Pasechnik, TD., Kuznctsov, VV., and Baker, CJ., (2007). Supression of early stages of fungus development by hydrogen peroxide at low concentrations. Plant Pathol. J. 6 (3): 242-247.

14. Leland, J E. (2001). Environmental-Stress Tolerant Formulations of *Metarhizium anisopliae* var. acridum for control of African Desert locust (*Schistocerca gregaria*). Dissertation submitted to the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and state University partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy. Pp. 173.

15. Müller, E. and W. Loeffler. (1976). Mycology. Translated by Bryce Kendrick and Barlocher. Georg Thieme Publishers Stuttgart. Pp.306.

16. Bilgrami, KS. and Verma, RN. (1988). Physiology of fungi. Translated by Sarhan, A.R.T. and sharif, F.M. Saladin University High Education and Scientific research Ministry pp.596.

17. Davidson, J., Whytet, B., Bissingertt, PH. and Schiestl, RH. (1992). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. 93: 5116-5121.

18. Hallsworth, J E. and Magan, N. (1996). Culture age, temperature, and PH affect the polyol and a trehalose content of fungal propagates Appl. Environ. Microbiolo. 62(7): 2435-2442.

19. Rangle. (2006). Genetic and Phenotypic Variability of *Metarhizium anisopliae* for Virulence, and Tolerance to UV-B Radiation and Heat. A dissertation submitted in partial fulfillment of philosophy in Biology. Utah State University. Pp.300.

20. Thomas, KC., Khachatourians, G. and Ingledew, WM. (1987). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Can. J. Microbiol. 33: 12-20.

21. Feng, MG., Poprawski, TJ., Khachatourians, GG. (1987). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control; current status biocont. Sc. Technol. 4: 3-34.

22. Jaronski, ST and Goettel, MS. (1997). Development of *Beauveria bassiana* for control of grasshoppers and locusts. Mem. Entomol. Soc. Can. 171:225-237.

23. Rombach, MC., Aguda, RM., and Roberts, DW. (1988). Production of *Beauveria bassiana* in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. Entomophaga. 33 (3):315-324.

24. Musser, RO., Kwon, HS., Williams, SA., White, C J., Romano, MA., Holt, SM., Bradbury, S., Brown, JK. and Felton, GW. (2005). Evidence that caterpillarlabial saliva suppresses infectivity of potential bacterial pathogens. Arch Insect Biochem Physiol. 58: 138-144.