الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالى والبحث العلمي

كلية علوم الطبيعة و الحياة

جامعة فرحات عباس

قسم الميكروبيولوجيا

مذكرة

لنيل شهادة الماجستير في علم الأحياء الدقيقة

تخصص: هندسة ميكروبيولوجية

مقدمة من طرف : صدراتي نواري

الموضوع:

عزل و تشخيص الكائنات الحية الدقيقة الداخلية (أندوفيت) لنبات القمح و تقدير نشاطها البيولوجي

قدمت يوم.....أمام لجنة المناقشة المتكونة من:

الرئيس : أ.د. قشي عبد الهادي أستاذ جامعة فرحات عباس سطيف

المشرف: أ.د. حرزالله داود أستاذ جامعة فرحات عباس سطيف

الأعضاء: أ.د. لعور حسين أستاذ جامعة فرحات عباس سطيف

د. زرّوق محمد ميهوب أستاذ محاضر جامعة فرحات عباس سطيف

شکر و تقدیر

إن الشكر و الدمد الله سيدانه و تعالى الذي وفقني لإنجاز هذا العمل.

أتوجه بالشكر الجزيل إلى الأستاذ المشرف : أ.د. داود حرزالله الذي أشرف على هذا العمل و تابعه باهتمام كبير خلال كل أطوار انجازه، مقدم في ذلك كل النصح و التوجيه لإتمامه على أكمل وجه. و يشرفني أن أتوجه بأسمى معاني الشكر و التقدير إلى السادة الأساتذة:

- أ.د. هشي عبد المادي ، أستاذ بقسم الميكروبيولوجيا جامعة فرحات عباس سطيف.
- أ.ح. لعور حسين ، أستاذ بقسو بيولوجيا و فيزيولوجيا النبات جامعة فرحات عباس سطيف.
- د. زروق محمد ميمورج ، أستاذ مداخر بقسم الميكروبيولوجيا جامعة فردات عباس سطيف.

على تكرممه و تشريفهم بقبول مناقشة و إثراء هذا العمل.

كما أتوجه بجزيل الشكر إلى الأستاذ الدكتور بغياني عبد الرحمان و الآنسة جرموني مريم و ذلك لما قدماه من مساعدة من أجل إتمام و إنجاز هذا العمل.

و يسعدني أيضا أن أوجه جزيل شكري و اهتناني إلى الزهلاء زروق أهينة و بلعاج هاني و فندوز علي و معماش و ليد لكل ما قدموه من مساعدة و اهتمام لأجل انجاز هذا العمل.

و كل الشكر لكل أساتذة كلية علوم الطبيعة و الحياة و كل الزملاء.

إهداء

أهدي هذا العمل إلى الوالدين الكريمين مغظهما الله و كل الإخوة و الأخوات و إلى كل الأحبة و الأحدةاء

الملخصص

كل من الفطريات و البكتيريا الخيطية تم عزلها من القمح الصلب (Triticum durum Desf.) صنف محمد بن بشير الذي تم جمعه من ولاية برج بوعريريج في شتاء 2010. من بين مجموع العزلات المتحصل عليها و التي أخضعت إلى إختبار أولى لنشاطيتها المضادة للجراثيم تم الحصول على 10 عزلات نشطة بين الفطريات و البكتيريا الخيطية، هذه الأحيرة تم دراسة و احتبار نشاطية مستخلصاتها المضادة للجراثيم و المضادة للأكسدة، من جهة أخرى تم إختبار هذه العزلات من حيث قدرتها على إنتاج الإنزيمات الخارج خلوية و تعزيز نمو نبات القمح. النشاطية المضادة للجراثيم تم إختبارها على 12 نوع بكتيري ممرض، خميرة واحدة و نوعين من الفطريات الممرضة للنبات و ذلك بإتباع طريقة أقراص الإنتشار على سطح الآقار بعد استخلاص مستقلباتها الثانوية باستعمال مذيبين عضويين مختلفين (الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم). كل المستخلصات شهدت نشاطية مثبطة للنمو على الأقل على كائن حى دقيق ممرض أو أكثر حيث كانت مستخلصات الإيثيل أسيتات أكثر فعالية بأكبر منطقة تثبيط 25ملم على كل Escherichia coli و Candida albicans، بينما أكبر منطقة تثبيطية سجلت من مستخلصات الكلوروفورم هي 20 و 23 ملم على كل من Salmonella typhimurium و Bacillus sp. على التوالي. النشاطية المضادة للأكسدة تم تقديرها عن طريق إختبار β-carotene/linoleic acid، النتائج بينت أن 60% من المستخلصات لها نشاطية مضادة للأكسدة بنسبة تثبيط تراوحت بين 50.57% إلى 78.96%. من جهة أخرى اختبار قدرة هذه العزلات على إنتاج الإنزيمات الخارج خلوية و الذي تم بإتباع طريقة الزرع على أطباق الآقار، النتائج دلت على أنه 90% من هذه العزلات تنتج إنزيم الأميلاز، 50% الليباز، 70% إستيراز و 90% إنزيم الليباز. أما تعزيز نمو نبات القمح الصلب من طرف هذه العزلات اختبر على إنتاش البذور، النتائج بينت أنة من بين 10 عزلات مختبرة عزلتين كان لهما تأثير إيجابي على نمو بذور القمح. من خلال هذه الأعمال يمكن القول أن هذه العزلات يمكن أن تكون مصدر للمركبات النشطة بيولوجيا كما يمكن أن تعمل على تعزيز نمو النباتات و التي تتطلب منا دراسة أوسع و أكثر تعمقا.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الداخلية، البكيريا الخيطية الداخلية، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية الإنزيمية، القمح الصلب .Triticum durum Desf

Summary

A total of ten endophytic fungi and actinomycetes have been isolated from wheat (Triticum durum Desf. Mohamed Ben Bachir variety) collected from Bordj Bou -Arreridj region (Algeria) during winter 2010. Isolates were screened and evaluated for their Antimicrobial activity, antioxidant activity, enzymatic activity and host growth promotion. Antimicrobial activity was evaluated for crude, ethyl acetate and chloroform extracts using an agar diffusion assay against twelve pathogenic bacteria, yeast, and two phytopathogenic fungi. All extracts showed inhibitory activity on at least one or more pathogenic microorganism, with an average zone of inhibition varied between 7 mm to 25 mm. the more effective activity was observed with ethyl acetate extracts, a large zone of 25 mm against Escherichia coli and Candida albicans, 20 mm and 23 mm against Salmonella typhimurium and Bacillus sp respectively. The antioxidant capacity of the extracts was evaluated by β-carotene/linoleic acid assay. Results showed that 60% of these extracts have antioxidant activity, exhibiting 50, 57% to 78, 96% inhibitions. On other hand, these endophytic fungi and actinomycetes were assessed for the production of extracellular enzymes by culture plate method. 90% of them have amylase activity, 50% lipase, 70% esterase and 90% protease activity. Growth promotion ability of these endophytes was tested on seed germination. The result indicated that, among ten isolates tested, two isolates showed significant growth promotion effects on wheat seeds. From the present work we can conclude that these microorganisms could be promising source of bioactive compounds, growth promotion and warrant further study.

KEY WORDS: Endophytic micro-organisms; antimicrobial activity, antioxidant activity, enzymatic activity, *Triticum durum* Desf.

Resume

Un total de dix endophytes incluant champignons et actinomycètes ont été isolés a partir du blé (Triticum durum Desf. Variété Mohamed Ben Bachir) collecté de la région de Bordj Bou Arreridi(Algérie) au cours de l'hiver 2010. Les dix isolats ayant eu un résultat positif au dépistage de l'activité antimicrobienne ont étaient examinés et évalués pour leur activité antimicrobienne, antioxydante, enzymatique et la promotion de la croissance de l'hôte. L'activité antimicrobienne a été évaluée par les extraits bruts d'éthyle acétate et de chloroforme en utilisant le test de diffusion sur disques contre douze bactéries et une levure pathogènes et deux champignons phytopathogènes. Tous les extraits ont montré une activité inhibitrice sur au moins un ou plusieurs micro-organismes pathogènes, avec une moyenne des zones d'inhibition variant entre 7 et 25 mm. L'activité la plus efficace a été observée avec les extraits d'éthyle acétate et la plus grande zone été de 25 mm observé contre *Escherichia coli* et *Candida albicans*, d'autre part les plus grandes zones observé chez les extraits chloroformiques été de 20 et 23 mm contre Salmonella typhimurium et Bacillus sp. Respectivement. La capacité antioxydante des extraits a été évaluée pas la méthode du β-carotène/ acide linoléique. Les résultats ont montré que 60% de ces extraits ont une activité antioxydante, présentant 50.57% à 78.96% d'inhibitions. D'autre part, ces champignons endophytes et ces actinomycètes ont été évalués pour leurs production d'enzymes extracellulaires par la méthode de culture sur boite, 90% d'entre eux ont une activité amylolitique, 50% une activité lipolytique, 70% estéarasique et 90% proteasique. La capacité de promotion de la croissance de ces endophytes a été testée sur la germination des graines. Le résultat a indiqué que parmi les dix isolats testés, deux isolats ont montré des effets significatifs sur la croissance des semences de blé. Nous pouvons donc conclure que ces micro-organismes pourraient être une source prometteuse de composés bioactifs, et permettent la promotion de la croissance, demandant une étude plus large et approfondis.

Mots clé : Micro-organismes endophytes, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité enzymatique, *Triticum durum* Desf.

هائمة المحتصرات

BHT: Butylated hydroxytoluene

CA: Cellulos Agar

CBM: Cellulolysis basal medium

CMB: Cellulolysis basal medium

CMC: Carboxymethyl cellulose

CYA: Czabek yeast extract agar

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DNA: Deoxyribonucleic acid

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

GI: Germination index

GP: Germination percentage

GYP: Glucose yeast extract peptone

I₂: Iodine

IAA: Indole acetic acid

IPS7: Tyrosine agar

IPS9: Basal mineral salts agar

ISP2: Yeast extract-malt extract agar

ISP4: Inorganic salts- starch agar

ISP5: Glycerol-asparagine agar

ITS: Internal transcribed spacer

KI: Potassium **Iodide**

MEA: Malt extract agar

MIC: Minimum inhibitory concentration

MZH: Modified Ziehl-Neelsen stain

MLA: Meat liver agar

NA: Nutrient agar

NB: Nutrient broth

PDA: Potato dextrose agar

PDB: Potato dextrose broth

PKV: Pikovskaya

PL: Plumule length

PSA: Potato sucrose agar

rDNA: Ribosomal deoxyribonucleic acid

RL: Radicale Length

ROS_s: Reactive oxygen species

SCA: Starch casein agar

VI: Vigor inde

YMA: Yeast extract-malt extract agar

ZN: Ziehl-Neelson stain

%: Percentage

μL: ميكرولتر

غرام غ

ملغرام :مغ

حجم :ح

مللتر :م**ا**ر

مكروغرام : مكغ

الغمرس

1	مفدمه
	I الحراسة النظرية
3	1. I. مقدمة حول الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات(Endophytes)
3	1.1. I تعريف الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنبتات
4	2.1. I. لمحة تاريخية عن دراسة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات
6	2. I التنوع البيولوجي للكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات
6	1.2. I المجموعات النباتية العائلة للكائنات الحية الدقيقة الداخلية
7	2.2. I. أهم المجموعات المشكلة للفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات
8	3. I إيكولوجية الأندوفيت
8	1.3. I تخصص العائل
10	2.3. I تخصص النسيج
11	3.3. I. العوامل المؤثرة على توزيع وكثافة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات.
12	4. I. دور الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات
12	1.4. I تعزيز نمو النباتات
14	2.4. I. تعزيز المقاومة ضد الكائنات الحية الدقيقة الممرضة للنباتات
15	3.4. I. تعزيز المقاومة ضد الكائنات العاشبة و الحشرات
17	5. I. الكائنات الحية الدقيقة مصدر للمركبات الطبيعية ذات النشاط البيولوجي
ذات النشاط المضاد للميكروبات 18	1.5. I الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات مصدر للمستقلبات الثانوية
لنوية المضادة للبكتيريا	1.1.5. I الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات مصدر للمستقلبات الث
نوية المضادة للفطريات 20	2.1.5. I الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات مصدر للمستقلبات الثا
المضادة للأكسدة	2.5. I الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات مصدر للمستقلبات الثانوية
	II المـــواد و الطــرق
25	1. II المواد
25	1.1. II. العينات النباتية
)5	2 1 II الأنواع البكتيرية و الفطرية

25	II 3. 1. المواد الكيميائية والأجهزة
26	.I. II الطرق
26	II . 1. 2.جمع العينات النباتية
26	2.2. II. عزل الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية لنبات القمح
29	3. II . 2. إختبار النشاط الأولي المضاد للبكتيريا و الفطريات الممرضة من طرف العز لات
30	4. II . 2. تشخيص الفطريات و البكتيريا المعزولة
30	1.4. II . 2. تشخيص الفطريات المعزولة
31	2.4. II . 2. تشخيص البكتيريا الخيطية المعزولة
33	2 . 5. II استخلاص المستقلبات الثانوية
34	6. II . 2. دراسة نشاطية المستخلصات الخامة المضادة للميكروبات
36	β-carotène . 2 . 7. 1 . II
36	8. II . 2. در اسة النشاطية الإنزيمية
37	1.8. II. دراسة النشاطية الإنزيمية الفطرية
37	1.1.8.2. II الأميلاز
37	2.1.8.2. II. البروتياز
38	3.1.8.2. II. الليباز و الإستيراز
38	4.1.8.2. II. السيليلاز
38	2.8. II. دراسة النشاطية الإنزيمية البكتيرية
39	1.2.8.2. II الأميلاز
39	.2.2.8.2. II بابروتياز
39	3.2.8.2. II. الليباز و الإستيراز
39	4.2.8.2. II. السيليلاز
40	II .9. 2. دراسة تأثير الفطريات و البكتيريا الداخلية على إنتاش و نمو بذور القمح
40	1.9. II. معالجة بذور القمح بالفطريات والبكتيريا المعزولة
40	II .2.9. 1. تأثير الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية على إنتاش و نمو بذور القمح
41	3.9. II. وختبار إمكانية إنتاج أندول حمض الأستيكو (Indole acetic acid (IAA)
41	4.9. II. إختبار إمكانية إذابة الفوسفات(Phosphate Solubilization)

42	.1. 5.9. II انتاج الامونيا(Ammonia Production (NH3))
42	I0. II. إلتحليلات الإحصائية
	III النِتَائِج والمناقِشة
43	1. III. عزل الفطريات و البكتيريا الخيطية
45	2. III. وختبار النشاط الأولي المضاد للبكتيريا و الفطريات الممرضة من طرف العزلات المعزولة
48	3. III .3. تشخيص الفطريات و البكتيريا الخيطية المعزولة
54	4. III مدراسة النشاطية الضد ميكروبيه لمستخلصات العزلات
69	III .5. دراسة النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات العزلات المتحصل عليها
69	β-carotene إختبار 1.5. III
73	6. III. مدراسة النشاطية الإنزيمية لمخلف العينات المعزولة
79	7. III. مدراسة تأثير الفطريات و البكتيريا الداخلية على إنتاش و نمو بذور القمح
85	الحاتمة و الآفاق
87	العراج
10	الملحق

مخائمة البداول

الجدول 01: عدد العزلات و معدل العزل و معدل الإستيطان في عينات جذور و أوراق نبات القمح
الجدول 02 : مناطق تثبيط نمو الأنواع البكتيرية الممرضة بواسطة البكتيريا الخيطية بطريقة المزارع المزدوجة
الجدول 03: نسبة تثبيط نمو الفطريات بواسطة الفطريات و البكتيريا الداخلية المعزولة بطريقة المزارع المزدوحة46
الجدول 04: الخصائص المورفولوجية والميكروسكوبية للعزلات الفطرية بعد الحضن على أوساط مختلفة لمدة سبعة أيام في
درجة حرارة 26 °م
الجدول 05: المظهر المورفولوجي لعزلات البكتيريا الخيطية النشطة
الجدول 06: الخصائص الميكروسكوبية و البيوكيميائية لعزلات البكيريا الخيطية النشطة
الجدول 07: مقارنة متوسطات مناطق التثبيط لمستخلصات الإيثيل أسيتات للفطريات و البكتيريا الداخلية و تأثيرها على
الفطريات و البكتيريا المختبرة.
الجدول 08: مقارنة متوسطات مناطق تنبيط نمو الفطريات و البكتيريا المختبرة و تأثّرها بمستخلصات الإيثيل أسيتات
للعينات المعزولة.
الجدول 09: مقارنة متوسطات مناطق التثبيط لمستخلصات الكلوروفورم و تأثيرها على الفطريات و البكتيريا المختبرة63
الجدول 10: مقارنة متوسطات مناطق تثبيط نمو الفطريات و البكتيريا المختبرة و تأثرها بمستخلصات الكلوروفورم للعينات
المعزولة
الجدول 11: مقارنة متوسطات مناطق التثبيط لمستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم و تأثيرها على الفطريات و
البكتيريا المختبرة.
الجدول 12: النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيفيل أسيتات بواسطة إخبار β-carotene/Linoleic acid
الجدول 13 : مقارنة متوسطات المؤشر الإنزيمي للنشاطية الإنزيمية لمختلف الفطريات و البكتيريا المعزولة73
الجدول 14 : مقارنة تأثير الفطريات و البكتيريا المعزولة على نمو نبات القمح الصلب
الجدول 15 : إختبار إنتاج NH3 و أندول حمض الأستيك و تحليل الفوسفات غير القابل للذوبان من طرف العزلتين
80 Streptomyces sp.2 2 Streptomyces sp.1

جائمة الأشكال

الشكل 01: بنية بعض للركبات الطبيعية المعزولة من الفطريات الداخلية للنبتات ذات النشاط الضد ميكروبي
الشكل 02: بنية بعض للركبات المضادة للأكسدة المعزولة من بعض الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية النباتات24
الشكل 03 :مخطط يوضح تعقيم السطح، عزل و تنقية الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية
الشكل 04: مخطط يوضح استخلاص المستقلبات الثانوية من العينات الفطرية و البكتيرية
الشكل 05: الخصائص المورفولوجية والميكروسكوبية للعزلات الفطرية
الشكل 06: نتائج تأثير مستخلصات الإيفيل أسيتات للفطريات و البكتيريا الداخلية على البكتيريا و الفطريات الممرضة -55
الشكل 07: نتائج تأثير مستخلصات الكلوروفورم للفطريات و البكتيريا الداخلية على البكتيريا و الفطريات الممرضة57
الشكل 08: نتائج تأثير مستخلصات الإيفيل أسيتات (A) و الكلوروفورم (B) للفطريات و البكتيريا الداخلية على بعض
الأنواع البكتيرية الممرضة
الشكل 09: النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيفيل أسيتات لمختلف العزلات
الشكل 10: مقارنة متوسطات للؤشر الإنزيمي للنشاطية الإنزيمية لمختلف الفطريات و البكتيريا للعزولة77
الشكل 11: مقارنة تأثير الفطريات و البكتيريا الداخلية على نمو نبات القمح

مقدمة



مقدمة

مقدمة

إن الإنتاج الغذائي في حاجة ماسة إلى الزيادة و ذلك لتلبية متطلبات العدد السكاني الذي هو في زيادة مستمرة، موازاة مع ذاك تواجه المحاصيل الزراعية عدة مشاكل منها الأحياء الدقيقة المسببة للأمراض النباتية خصوصا الفطريات التي تعدد الأمن و الإنتاج الغذائي المستدام (Haggag, 2010). من بين الطرق المتبعة في مكافحة هذه الأمراض، المكافحة الكيميائية التي تعتمد على استعمال الأسمدة، مبيدات الحشرات، الفطريات و مبيدات الأعشاب الضارة. هذه المواد غالبا ما تشكل خطرا على البيئة و صحة الإنسان زيادة على ذلك الإستعمال المنحصر، التكلفة العالية و محدودية الفعالية (Muhammad et al., 2010; Qin et al., 2011).

من جهة أخرى توجد العديد من المشاكل الصحية التي تقدد البشرية مثل ظهور و زيادة عدد البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية مثل بعض أنواع الأجناس (Staphylococcus)، زيادة عدد الأمراض حديثة الظهور و مسبباتها مثل الإلتهاب الرئوي الحاد، مرض فقدام المناعة المكتسبة، فيروسات مهددة للحياة (إنفلوانزا الطيور)، المشاكل الصحية التي يعاني منها المرضى الذين يقومون بزرع الأعضاء الذي تجعلهم عرضة للإصابة ببعض الفطريات الإنتهازية و التي قد تتسبب في مشاكل مناعية مثل (Aspergillus spp. و Cryptococcus spp. Candida spp.) و Qin et). السرطان، موت الأنسجة، تليف الكبد و إلتهابات المفاصل من الأمراض التي تسببها الجذور الحرة و مختلف أنواع التفاعلات الأوكسيجينية الأخرى (Taechowisan et al., 2009).

كل هذه المشاكل دفعت بالباحثين إلى البحث عن مصادر أحرى لمركبات جديدة نشطة بيولوجيا تكون أكثر فعالية و أقل سمية و أقل ضرر على البيئة. لسنوات مضت ضلت الأبحاث منصبة على الأحياء الدقيقة التي تعيش في التربة من أجل الحصول على مركبات جديدة إلّا أنه على ما يبدوا أن عددها بدأ يتناقص في الآونة الأخيرة ما استلزم البحث على مواطن جديدة تسكنها الأحياء الدقيقة. واحد من بين هذه المصادر هي

مقدمة

الأحياء الدقيقة التي تسكن الأنسجة الداخلية للنباتات الراقية، هذه الكائنات نسبيا غير مدروسة و يمكن أن Tejesvi et) تكون مصدر للمركبات النشطة بيولوجيا ذات الإستعمال المفيد في الزراعة، الطب و الصناعة (al., 2007).

الأحياء الدقيقة الداخلية للنباتات (Endophytes) هي الكائنات الدقيقة التي تعيش داخل أو بين أسحة النباتات الحية الراقية من دون أن تتسبب لها في أعراض مرضية، هذه الأخيرة تلعب دور هام في صحة عوائلها من خلال تعزيز نموها و المقاومة لمختلف ظروف الإجهاد و الحماية ضد الكائنات الدقيقة الممرضة و الحشرات. من جهة أخرى أثبت أنها مصدر هام للمركبات الجديدة النشطة بيولوجيا حيث أنها قادرة على إنتاج مجموعة واسعة من المستقلبات الثانوية التي يمكن أن تكون لها نشاطية المضادات الحيوية، مضادات الطفيليات، مضادات للأكسدة، مضادات للسرطان و استعمالات واسعة في المجال الزراعي Hasegawa et (ها.) 2006; Gao et al., 2010; Pimentel et al., 2010).

و في هذا السياق و لغرض البحث عن عزلات جديدة تكون مصدر للمركبات النشطة بيولوجيا ارتأينا إلى دراسة الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية لنبات القمح الصلب (Triticum durum Desf.) صنف محمد بن بشير و دراسة بعض النشاطات البيولوجية لها و ذلك من خلال:

- عزل الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية من جذور و أوراق القمح الصلب و انتقاء العزلات التي لها نشاطية ضد ميكروبية عن طريق إختبار أولى.
 - التعرف على العزلات التي أظهرت نشاطية ضد ميكروبية من الإختبار الأولي.
 - إستخلاص المستقلبات الثانوية لهذه العزلات.
 - دراسة النشاطية الضد ميكروبية لهذه المستخلصات.
 - دراسة النشاطية المضادة للأكسدة بإتباع إختبار B-caroten/linoleic acid.
 - إختبار إمكانية إنتاج هذه العزلات لبعض الأنواع الإنزيمية الخارج حلوية.
 - دراسة تأثير هذه العزلات على نمو نبات القمح الصلب.

الفصل 1

الدراسة النظرية

1.I. الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات (Endophytes)

1.1.I. تعريف الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات

إن أول من أطلق مصطلح الأندوفيت (Endophytes) هو De Bary منة 1866 في إشارة منه إلى الكائنات الحية الدقيقة التي تسكن الأنسجة الداخلية للنباتات لتمييز هذه الأحيرة عن الكائنات الدقيقة التي تعيش على سطح النباتات (Epiphytes)، هذا المصطلح مكون من شقين Endo تعني داخل و Phyte مشتق من الكلمة اليونانية Phyto و التي تعني النبات (Rodriguez, 1996). منذ إكتشاف الفطريات الداخلية في نبات Lolium temulentum سنة 1904 في ألمانيا (Tan et Zou, 2001)، العديد من الباحثين قدموا تعاريف مختلفة للأندوفيت. ففي بداية الأمر مصطلح الأندوفيت كثيرا ما استعمل ليشمل كل الكائنات بما في ذلك الكائنات الدقيقة الممرضة للأجزاء الهوائية النباتية و فطريات الجذور التكافلية. لكن (Carroll, 1986) عرف الأندوفيت على أنها الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش حياة تتبادل فيها المنافع مع عائلها و هي تلك الفطريات التي تسكن الجزء الهوائي لأنسجة النباتات الحية ولا تتسبب في أعراض مرضية مستثنيا بذلك الفطريات القادرة على إحداث أعرض مرضية للعائل كما استثنى الفطريات الممرضة التي يمكن أن تكون على شكل أوندوفيت. كل من (Pertrini, 1991; Pertrini et, 1986) إقترحوا تعريفا أوسع حيث عرّفوها على أنها جميع الكائنات الحية الدقيقة التي تسكن أنسجة أعضاء النباتات و التي في بعض الأحيان يمكنها أن تغزوا النسيج الداخلي للنباتات من دون أن تتسبب في أضرار لعائلها بما في ذلك الكائنات الممرضة الداخلية الكامنة تنتمي إلى هذه المجموعة. أشار Wilson (2005) في تعريفه للكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات على أنها هي الفطريات أو البكتيريا التي تقضى جزءا أو كل دورة حياتها داخل الأنسجة النباتية الحية لكن لا تتسبب في أي أعراض مرضية. (Zhang et al., 2006) أعطوا تعريفا أوسع و أكثر شمولية للأوندوفيت و هي جميع المكروبات التي تغزوا الأنسجة الداخلية للنباتات الحية من دون أن تتسبب في أي من الأعراض المرضية الفورية أو الآثار السلبية على عائلها، وهذا التعريف هو الأكثر شمولية و الأكثر إستعمالا

لحد الآن. يعتقد أن التفاعلات بين الأندوفيت و عائلها تنميز بكونما غير محايدة و قد تكون إلى حد ما هذه التفاعلات تنطوي تحت ميزان التضاد بين الأندوفيت و العائل، إذ يوجد هناك دائما على الأقل درجة معينة من الإمراضية لهذه الكائنات الدقيقة القادرة على غزو النبات مثل الفطريات في حين أن مقاومة النبات تكون عن طريق الحد من تطور كثافة الفطريات الداخلية و حدة المرض (Schulz et Boyle, 2005). كما يعتقد أن الأندوفيت لها علاقة بالكائنات الدقيقة الممرضة، حيث أن ظهور الفطريات الداخلية يرجع إلى تطو هذه الأخيرة من الفطريات الممرضة عبر فترات زمنية طويلة من الكمون و الحد من درجة إمراضيتها (, 1993).

2.1.I. لمحة تاريخية عن دراسة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات

التفاعل بين النباتات و الميكروبات جزءا لا يتجزأ من نظامنا البيئي و هناك عدة أنواع من التفاعلات بين هذين الأخيرين أكثرها شيوعا علاقة التعايش و التكافل (Saffo, 2001; Wu et al., 2009). أقدم إكتشاق لعلاقة التعايش التكافلية بين النباتات و الميكروبات كان في جذور الشجرة المتحجرة Amyelon radicians التي تعود إلى حقبة الحياة القديمة، و هذا مهم ليس فقط من وجهة نظر أن الأندوفيت هي ذات أصل تكافلي مع النباتات بل أيضا إلى أن ارتباط الفطريات و النباتات ظهر في وقت حد مبكر (Hyde et Soytong,). و على الأرجح أن علاقة التكافل بين الأندوفيت يعود تاريخ ظهورها إلى ظهور النباتات الوعائية (Strobel, 2003; Zhang et al., 2006).

يرجع تاريخ أول عزل للأوندوفيت الغير مسببة للأعراض المرضية إلى سنة 1898 من طرف Vol من بذور (Wilson, 1996) من الدراسات من طرف عزز بعدها بسلسلة من الدراسات من طرف عدة باحثين و الذين توصلوا إلى نتائج مماثلة و ذلك بعزل عدة كائنات حية دقيقة داخلية و غير مسببة لأعراض مرضية من مجموعة واسعة من النباتات العشبية (Latch et al., 1989; Latch et al., 1987; Sampson, 1938).

في غضون المائة سنة التي تلت اكتشاف الأندوفيت تميزت بأبحاث مكثفة على الأشجار الصنوبرية سيما في المناطق المعتدلة (Carroll et al., 1977; Carroll et Petrini, 1983; Sieber et al., 1991). كما تركزت المناطق المعتدلة (Rodriguez, 1996; Rodriguez et Samuels, 1990; Taylor et) الأبحاث على أشجار النخيل مثل أعمال (Endophytic fungi in الداخلية بعنوان الداخلية بعنوان الداخلية بعنوان و Redlin و Carris و Redlin من طرف Redlin و Carris

على الرغم من الإكتشاف المبكر للكائنات الحية الداخلية للنباتات إلّا أن دراستها لم تحض بالإهتمام الكافي سوى في العشرين سنة الأخيرة، إذ برزت عدة أعمال كان لها المساهمة الكبيرة في معرفة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات على غرار أعمال (Arnold et al., 2000; Arnold, 2007)، كما ظهرت منشورات تتناول مختلف المواضيع المتعلقة بالأندوفيت مثل التعريف، التخصص اتجاه العائل، طرق العزل، أنماط إصابة النباتات جمذه الكائنات الدقيقة، الإستيطان و التنوع البيولوجي (Ghimire et Hyde, 2004; Rodriguez et al., 200; Schulz et Boyle, 2005). من جهة أخرى تركزت الأبحاث في هذه الفترة على دور و أهمية هذه الكائنات الدقيقة على مستوى عائلها خاصة بعد إثبات دورها في تعزيز نمو النباتات العائلة لها من خلال مقاومة الكائنات الحية الدقيقة المرضة للنباتات و الحشرات (Lacevedo et al., 2000; Ownley et al., و الحشرات الحية 2010) و إنتاج هرمونات النمو النباتية (Dai et al., 2008; Nadeem et al., 2010). كما تركزت الأبحاث على البحث عن مستقلبات ثانوية جديدة ذات نشاطات بيولوجية مختلفة، ضد ميكروبية (El-Shatoury et al., 2006; He et al., 2009; Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2011)، مستقلبات ذات نشاطية مضادة Chaeprasert et al., 2010; Gangadevi et al., 2008; Igarashi et al., 2007; Suthep et) للسرطان al., 2004)، مستقلبات ذات نشاطية مضادة للإلتهاب مثل أعمال (al., 2004)، مستقلبات ذات

(Thongchai *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2004)، إضافة إلى مستقلبات ذات نشاطية مضادة للأكسدة (Fernandes *et al.*, 2009; Srinivasan *et al.*, 2010; Taechowisan et Lumyong, 2003)

2.I. التنوع البيولوجي للكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات

1.2.1. المجموعات النباتية العائلة للكائنات الحية الدقيقة الداخلية

المجموعات المختلفة للكائنات الحية الدقيقة من بينها الفطريات و البكتيريا الخيطية أشير إليها على أنحا
Lee et) المختلفة داخلية للنباتات هذه الأخيرة تكون غير عدائية و تعيش بالتكافل مع عائلها (al., 2008; Saithong et al., 2010; Tian et al., 2004
Ebel, 2006; Tian et al., 2006; Larsen et al., 2010; Tian et al., 2006

ختلف البيئات المعتدلة، الإستوائية، شبه إستوائية، المناطق الباردة، المناطق الحارة و أعماق البحار (2006; Larsen et al., 2005; Zhang et al., 2006

Tan et Zou, كلد الآن جميع النباتات الراقية (2006; Larsen et al. أنما عائل لها و يعتقد وجودها تقريبا لدى جميع أنواع النباتات الراقية (2001; Ulrich et al., 2008)
الأندوفيت وحدت على أنما غائل لها و يعتقد وحودها تقريبا لدى جميع أنواع النباتات الراقية (2001; Ulrich et al., 2008)
الأندوفيت (2006; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2006)
الأندوفيت عزلت أيضا من الطحالب البحرية (Arnold et al., 2009)، الأشنات (Fang et al., 2011) و الأعشاب البحرية (Fang et al., 2011)، الأشنات (Fang et al., 2001) و الأعشاب البحرية (Fang et al., 2011)

جذير بالذكر أنه حوالي 300000 نوع نباتي على وجه الأرض يمكنه أن يكون عائلا الأندوفيت و بالتالي عول فهي تشكل مصدر حقيقي للتنوع البيولوجي (Qin et al., 2009b) ، حيث دراسات في القرن الحالي حول التنوع البيولوجي للأندوفيت أصبحت أكثر وضوحا إذ يمكن عزل من عشرات الأجناس إلى مئات الأنواع من نبتة واحدة (Hasegawa et al., 2006; Qin et al., 2011; Tan et Zou, 2001). هذا العدد الكبير المعزول يعزز من فرصة الحصول على أنواع جديدة من الكائنات الحية الدقيقة و التي تلعب دور و أهمية كبيرة في التنوع البيولوجي (Clay, 1992).

2.2.I. أهم المجموعات المشكلة للفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات

تعد الفطريات الداخلية هي الأكثر دراسة والأكثر عزلا (Strobel et Daisy, 2003)، في حين أن البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات نسبيا غير مدروسة جيدا (Qin et al., 2009b). الفطريات تملك تنوع بيولوجي هائل وتشكل مصدر جيد للأنواع الجديدة حيث قدر Hawkswo سنة 1991 على أنه يمكن أن يكون هناك حوالي 1,5 مليون نوع فطري إلّا أنه لم يتم تشخيص سوى حوالي 100000 نوع فطري، و مع ذلك تقدير التنوع البيولوجي للفطريات في ارتفاع مستمر حيث قدّر أنه يمكن أن يكون هناك حوالي 1 مليون نوع فطري من الفطريات الداخلية للنباتات لوحدها (Strobel et Daisy, 2003).

أغلب الفطريات الداخلية المعزولة تنتمي إلى شعبة الفطريات الزقية ascomycota و أشكالها اللاجنسية الفطريات الداخلية المعزولة تنتمي إلى شعبة الفطريات الزقية عكن أن تشمل على كل من صف (Guo et al., 2000; Saithong et al., 2010) و التي يمكن أن تشمل على كل من صف Hyphomycetes ، Discomycetes ، Loculoascomycetes ، Pyrenomycetes بعض من أنواع الشعب (Gehlot et al., 2008; Tomita, 2003) Arnold, 2007; Gehlot et al., 2008; Guo et) Oomycota و Basidiomycota ، Zygomycota الفطرية أخرى الفطريات الداخلية يمكن أن تصيب مجموعة واسعة من النباتات العشبية المنتشرة عبر العالم و تعيش مع عوائلها حياة تكافلية (Schulz et Boyle, 2005). تعرف هذه الفطريات بفطريات النباتات العشبية المنتشرة والنباتات العشبية المنتشرة ومثيلاها اللاجنسيين Clavicipitaceous و يمكن أن تشمل بعض أهم الأجناس مثل Balansia و كذلك الجنس Moon et) Claviceps على التوالي و كذلك الجنس £ Epichloë و مثيلاها اللاجنسيين Ephelis و يمكن أن تشمل على التوالي و كذلك الجنس £ Ephelis . (al., 2007; Rodriguez et al., 2008)

تختلف الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية من حيث التنوع و الغزارة من منطقة إلى أخرى، عموما المناطق الاستوائية أظهرت أنها أكثر غنا في التنوع البيولوجي للفطريات و البكتيربا الخيطية الداخلية للنباتات مقارنة بالمناطق المعتدلة و الباردة (Azevedo et al., 2000; Zabalgogeazcoa, 2008). تنتمى غالبا أنواع الفطريات الداخلية المعزولة من المناطق المعتدلة إلى الأجناس الفطرية الشائعة مثل Acremonium، Geniculosporium Fusarium Epicoccum Coniothyrium Cladosporium Alternaria Pleospora ، Phoma و Márquez et al., 2007; Schulz et Boyle, 2005). في حين أن أهم الأنواع المعزولة من نباتات المناطق الإستوائية تنتمي إلى أجناس Xylaria ، Colletotrichum، Cannon et Simmons, 2002; Kumar et Hyde,) Phyllosticta & Phomopsis & Pestalotiopsis Phoma 'Fusarium کل من أجناس (2004; Suryanarayanan et al., 2003). بينما بعض أنواع و Phompsis وجدت على أنما يمكن أن تكون مشتركة بين كل من نباتات المناطق الإستوائية و المعتدلة (Schulz et Boyle, 2005). معظم الدراسات المتعلقة بالبكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات تركزت على أنواع نباتات المحاصيل الزراعية و البستانية (Qin et al., 2011; Ulrich et al., 2008). أجناس البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات و القابلة للزرع وجدت على أنها تحد مجوعة ضيقة و الأكثر عزلا هي بعض أنواع Actinomadura ، Nocardioids ، Nocardia ، Microbispora ، Micromonospora و أنواع جنس Araújo et al., 2000; Hasegawa et al., 2006; Qin et al., الأكثر سيادة Streptomyces .(2009b

3.I. إيكولوجية الأندوفيت

1.3.I. تخصص العائل

يمكن و صف علاقة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات بعائل واحد أو عدة عوائل نباتية بتخصص لعائل، تررد العائل، إنتقاء العائل أو تفضيل العائل (Cohen, 2006; Zhou et Hyde, 2001). علاقة

التخصص هي العلاقة التي يكون فيها الكائن الحي الدقيق منحصر على عائل واحد أو مجموعة أخرى من الأنواع التي لما قرابة وراثية لهذا العائل ولكن لاتظهر عند بقية الأنواع التي لا تملك قرابة وراثية له و التي تظهر في نفس الموطن (Huang et al., 2008). أما علاقة تكرار أو تردد العائل فهي التكرار أو الظهور السائد للكائن الحي الداخلي عند عائل واحد أو مجموعة محددة من الأنواع النباتية لكن هذا الكائن يمكن أن يظهر لدى بقية النباتات العائلة الأخرى التي تنموا في نفس الموطن لكن بتردد مختلف (Zhou et Hyde, 2001). الكائن الحي الدقيق الذي يشكل علاقة مع نوعين نباتيين لهما قرابة و راثية بينهما مع إثبات أنه يميل إلى عائل الكائن الحي الدقيق الذي يشكل علاقة مع نوعين نباتيين لهما قرابة و راثية بينهما مع إثبات أنه يميل إلى عائل معين على الآخر فهذه الظاهرة تدعى إنتقاء أو إحتيار العائل (Cohen, 2004; Cohen, 2006). مصطلح تفضيل العائل هو الأكثر إستعمالا من طرف علماء الفطريات للدلالة على الظهور السائد أو المنحصر لفطر ما على عائل محدد، كما يستعمل للتعبير عن الفروقات بين الجموعات المكونة للفطريات و ترددها و المعزولة ما على عائل محدد، كما يستعمل للتعبير عن الفروقات بين الجموعات المكونة للفطريات و ترددها و المعزولة والنبية مختلفة (Bettucci et al., 2004; Suryanarayanan et Kumaresan, 2000).

أثبت أن تخصص العائل يمكن أن يكون على مستوى المجموعة (الجنس) كما يمكن أن تكون على المستوى النوع مع إمكانية تأثر هذا التخصص بالظروف البيئية المحيطة ;Cohen, 2002) ظهور هذا التخصص يعني وجود نوع من التأقلم مع النبات العائل و القدرة على العيش داخل أنسجته، هذا التأقلم الذي يتطور إلى درجة المساهمة في حماية عائلها من مسببات الأمراض النباتية وهذا الذي يخلق نوع من التعايش بين الكائن الحي الدقيق الداخلي و عائله و بالتالي تخصص العائل (et Kandavel, 2010).

من بين أهم الأنواع الفطرية المعروفة بتخصصها اتجاه عائلها هو فطر Neotyphodium الذي يصيب النباتات العشبية والذي له مجموعة ضيقة من العوائل إذ ينحصر وجوده على نوع أو نوعين نباتيتين فقط، في

حين أن بعض الفطريات الأخرى الشائعة تكون عامة فلها مجموعة واسعة من العوائل تشمل عدة أجناس أو عائلات نباتية مختلفة (Zabalgogeazcoa, 2008).

تبقى الطرق و الأسباب الرئيسية لهذا التفضيل غير مفهومة بدقة بالرغم من إشارة بعض الأبحاث إلى أن الإختلاف بين المجموعات المشكلة للكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات له علاقة بالإختلافات الكيمائية للاختلاف بين المجموعات المشكلة للكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات له علاقة بالإختلاف المشكلة للكائنات التعرف و طرق الإختراق سيما الطرق الأنزيمية لدى العوائل النباتية (Paulus et al., 2006)، كما تعد آليات التعرف و طرق الإختراق سيما الطرق الأنزيمية و الإختلاف المكاني أيضا لها علاقة بتخصص العائل (Arnold, 2005; Tan et Zou, 2001).

2.3.I. تخصص النسيج

تم عزل الكائنات الحية الدقيقة الداخلية من أنسجة أعضاء النباتات المختلفة (الثمار، السيقان، الأوراق، الأزهار، اللحاء، الخشب و البذور)(Kumar et Hyde, 2004; Qin et al., 2011; Zhang et al., 2006). الأزهار، اللحاء، الخشب و البذور)(Kumar et Hyde, 2004; Qin et al., 2011; Zhang et al., 2006) نسيج عضو تصيب هذه الكائنات الحية الدقيقة الداخلية عوائلها في مناطق محدد وينحصر وجودها على نسيج عضو محدد. كما تصيب بعض الأنواع الأخرى عوائلها بشكل منتظم حيث يمكن عزلها من مختلف أنسجة العائل مثل الفطرين Neotyphodium و Photisio اللذان ينتشران بانتظام في الفراغ بين خلوي لكل من الأوراق، السويقات البرعمية و بذور عائلها (Zabalgogeazcoa, 2008). الإختلاف في مجموعات الكائنات الحية الدقيقة الداخلية المعزولة من أنسجة النباتات و انحصار وجود بعضها على نسيج عضو معين لدى النبات يدل الدقيقة الداخلية المعزولة من أنسجة النباتات و انحصار وجود بعضها على نسيج عضو معين لدى النبات يدل (Photita et al., 2001).

يعزى التجمع المختلف للكائنات الحية الدقيقة في مختلف أنسجة العائل إلى الأفضليات التي تقدمها هذه الأنسجة لكائن ما، الإختلاف في المركبات الغذائية لمختلف أنسخة العائل و مدى قدرة الكائن المتخصص على العيش و استعمال مادة محددة في ذلك النسيج. حيث وجد أن الكائن المتخصص ينمو بشكل أفضل على الأوساط التي تحتوي على مستخلصات النسيج الذي تم عزله منه (, Arnold et al., 2003a; Liu et al.) بالإضافة إلى عوامل أخرى مثل عمر النسيج، نسبة الأشعة و الحالة

الفيزيولوجية و الكيميائية لأنسجة النبات تلعب دورا مهم في مدى تخصص هذه الكائنات Bussaban et .al., 2001; Naik et al., 2009; Photita et al., 2001)

3.3.I. العوامل المؤثرة على توزيع وكثافة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات

يتأثر توزيع و كثافة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات بعدة عوامل منها النمط الوراثي للنباتات العائلة، المرحلة التنموية للعائل (الفصلية)، تباين المكان الجغرافي و الظروف البيئية المحيطة (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006; Su et al., 2010). يعد إختلاف المكان الجغرافي من بين أهم العوامل و الذي يعني أيضا إختلاف الشروط البيئية التي تعيش تحتها النباتات و هذا ما يؤدي إلى إختلاف عدد و أنواع الكائنات الحية الدقيقة الداخلية بين النباتات، إذ يمكن لهذه الكائنات أن تختلف في العدد و النوع لدى نفس العائل من منطقة إلى أخرى (Slippers et Wingfield, 2007; Zabalgogeazcoa, 2008). الفرق في نوع و عدد الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات بين المناطق الإستوائية و المعتدلة أحسن دليل على تأثير التباين المكاني على تنوع و كثافة هذه الكائنات، إذ تظهر نباتات المناطق الإستوائية أكثر غنا بالكائنات الحية الدقيقة الداخلية (Zabalgogeazcoa, 2008)، و لعل من بين الأسباب الرئيسة لهذا الإختلاف هي الرطوبة، Naik et al., 2009; Suryanarayanan et al., 1998; Suryanarayanan et al.,) التساقط و الفصلية 2005). إذ وجد أن الإصابة المرتفعة للنباتات لها علاقة كبيرة بارتفاع نسبة التساقط و الرطوبة و هذا ما يفسر قلتها في المناطق المعتدلة التي تتميز بالفصلية و قلة التساقط مقارنة بالمناطق الإستوائية التي تتميز الحرارة الدافئة، إنعدام الفصلية و التساقط الكثيف ما يجعل نباتات هذه المناطق أكثر عرضة للإصابة بهذه الأحياء الدقيقة (Suryanarayanan et al., 2005; Zamora et al., 2008)

المناطق ذات البيئات الجافة و حدت على أنها تحد من تنوع و كثافة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية لدى النباتات لتميزها بالطابع الفصلي و قلة الرطوبة و التساقط، إضافة إلى ذلك و بحكم الظروف البيئية لهذه المناطق فإن نباتاتها تعمل على تطوير بنيات حاصة بهدف التأقلم مع بيئاتها مثل تشكيل الطبقات الشمعية

الثخينة و التقليل من عدد الثغور (Stomata) لأجل التقليل من كمية الماء المتبخرة، كل هذه البنيات الخاصة تشكل عامل إضافي من أجل التقليل و الحد من تنوع و كثافة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية لدى نباتات الجافة (Suryanarayanan et al., 2005).

من جهة أخرى كل من تنوع و كثافة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية تزيد مع تقدم سن كل عضو لدى من جهة أخرى كل من تنوع و كثافة الكائنات الحية الدقيقة الداخلية تزيد مع تقدم سن كل عضو لدى (Hata et al., 1998; Persoh et al., 2010; Sieber, 2007). حيث و مع مرور الزمن تتعرض النباتات إلى لقاح أكبر كثافة من الكائنات الحية الدقيقة ، بالتالي إرتفاع إمكانية غزو الأنسجة النباتية بأعداد و أنواع أكبر من هذه الكائنات و هذا ما يجعل الأجزاء المسنة لدى النباتات ملجأ لعدد أكبر منها مقارنة بالأصغر سنا (Arnold et al., 2003).

4.I. دور الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات

1.4.I. تعزيز نمو النباتات

دفعت الأخطار و الأضرار المخلفة على البيئية الناتجة عن الإستعمال المباشر أو غير المباشر للأسمدة، المبيدات الخشرية، المبيدات الفطرية و مبيدات الأعشاب الضارة إلى البحث عن بدائل جديدة لهذه الإستراتيجيات الكيميائية لتعزيز نمو النباتات في مجال الزراعة، البستنة و الزراعات الغابية (al., 2010; Qin et al., 2011).

تحضى كل من الفطريات و البكتيريا الداخلية باهتمام خاص و ذلك لما تملكه من المميزات التي يمكن أن تعود بالفائدة على نمو عوائلها، حيث يمكنها أن تساهم في تحسين نمو مختلف الأنواع النباتية و التي يمكن أن تتم إما بطريقة غير مباشرة و التي تتمثل في إنتاج عوامل المقاومة ضد الكائنات الحية الممرضة للنباتات و إما بطريقة مباشرة و التي تشمل إنتاج الهرمونات النباتية المنظمة لنموها مثل (gibberllins و توفير و والتي تشمل إنتاج الهرمونات النباتية المنظمة في تحسين إمتصاص العناصر الغذائية و توفير

بعض منها (النيتروجين، الفوسفات و غيرها من العناصر المعدنية) أو التخفيف من الإجهاد المترتب عن إنتاج (Compant et) 1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase (ACC) الإيثيلان بواسطة نشاطية (al., 2005; Kannan et Sureendar, 2009; Nimoni et al., 2010; Sun et al., 2009

من بين أهم الهرمونات التي لها دور في تعزيز نمو النباتات و التي تركزت عليها الدراسات هي الأوكسينات (auxins) و الجيبيرلينات (gibberllins)، ومن بين الأوكسينات التي لها دور وظيفي و فيزيولوجي في نمو النبات هو الهرمون (IAA) الذي يعمل على تحفيز إستطالة الخلايا و إنقسامها و تمايزها في الخلايا الناشئة، كما يعمل على زيادة التفرعات الجانبية للجذور مما يسمح بامتصاص أكبر للأغذية من طرف النبات و نمو جيد له (Shrivastava et al., 2008; Soltani et al., 2010). أما الجيبيرلينات فتظهر على أنها تشارك في كل جانب من جوانب نمو النباتات و تطورها، لكن الميزات الرئيسية لها هي التدخل في تعزيز نمو و تطور السويقات و نضج البذور و تأحير سن الشيخوخة (Nadeem et al., 2010).

بينت العديد من الدراسات أن الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات منتجة لهورمونات النمو النباتية. أشير أن بعض العزلات المنتمية إلى فطري Penicilium و Penicilium أنما مخزة لنمو للباتات، أشير أن بعض العزلات المنتمية إلى فطري Penicilium و ويرجع ذلك لانتاجها لهورمون (Muhammad et al., 2010; Nadeem et al., 2010) gibberllin من خلال أن الفطر الداخلي Fusarium SPP. يعمل على زيادة نمو عائله وعائله Euphorbia pekinensis من خلال إنتاجه لكل من Gai et al., 2008) IAA و gibberllin عدد من البكتيريا الخيطية الداخلية المنتجة للهرمون المعنولة من (winter rye) تعمل على زيادة قدرة الإنتاش و نمو كثيف للبادرات عند معاملة بذور هذه الأخيرة بحذا الأوكسين المنتج من طرف هذه البكتيريا (Pteridic acids) B و A البيريديك A و B (Pteridium aquilinum) المعزولة من البكتيريا الخيطية -IAA المعزولة من Pteridium aquilinum لهما تأثير مماثل للهورمون IAA إذ يعملان على زيادة طول و تشكل الجذور العرضية (Igarashi, 2004).

2.4.I. تعزيز المقاومة ضد الكائنات الحية الدقيقة الممرضة للنباتات

المكافحة البيولوجية ضد الكائنات الدقيقة الممرضة للنباتات باستعمال الكائنات الحية الدقيقة ظهرت كبديل للمكافحة الكيمائية و التي أظهرت أن لها جدوى إقتصادي أكبر إذا ما قورنت بارتفاع التكاليف و الإستعمال المنحصر للمكافحة الكيميائية فضلا عن ذلك تلوث البيئة و الخطر على صحة الإنسان (Rocha et al., 2009).

تعتمد المكافحة البيولوجية على إستعمال الكائنات الحية الدقيقة من بينها التي تعيش ضمن أنسجة النباتات، هذه الكائنات تعمل على الحد من نشاط الكائنات الدقيقة الممرضة للنباتات بعدة آليات تشمل التضاد، المنافسة أو التطفل (Zabalgogeazcoa, 2008).

تشمل آلية المكافحة البيولوجية عن طريق التضاد إنتاج المضادات الحيوية أو الإنزيات الحالة أو المركبات دesters (ammonia (alkyl pyrones (alcohols (acids))). مثل ما هو عليه الحال عند الفطر العضوية الطيارة ذات النشاط البيولوجي مثل (Ownley et al., 2010) (lipids و keones (hydrogen cyanide)). مثل ما هو عليه الحال عند الفطر الداخلي Muscodor albus الذي ينتج مزيج من المركبات العضوية الطيارة والذي تبين أن له نشاطية ضد مجموعة واسعة من الفطريات و البكتيريا الممرضة للنباتات و الإنسان. بعد تحليل هذا المزيج وجد أنه يحتوي على مجموعة من المركبات العضوية الطيارة (lipids و keones (esters (alcohols (acids))) (lipids و البكتيريا الخيطية أشير إليها على أنحا منتجة للمضادات الحيوية و البكتيريا الخيطية أشير إليها على أنحا منتجة للمضادات الحيوية و البكتيريا الخيطية الشياتات عدد من الأنواع الفطية و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات أثبت أن لها نشاطية ضد عدد من الفطريات الممرضة للنباتات الدقيقة الداخلية أو مركبات المرضة الى خفض حدة الأمراض عما يؤكد على قدرة هذه الكائنات الاقمح بالفطريات مركبات القمح بالفطريات الممرضة أو على تحفيز آليات الدفاع لدى النبات. أدى تلقيح نبات القمح بالفطريات

Phoma و Chaetomium أو برشاحتهما الى خفض حدة الإمراضية المسببة من طرف الفطر Pruccinia و Pruccinia و Chaetomium و Pruccinia .(Dingle et McGee, 2003; Istifadah et McGee, 2006).

تساهم الكائنات الحية الدقيقة الداخلية في حماية عوائلها ضد الكائنات الدقيقة الممرضة من خلال منافستها على موطن معيشتها و المصادر الغذائية (Gao et al., 2010). حيث تعمل على منع الإصابة بالكائنات الممرضة و ذلك من خلال الغزو السريع لعوائلها و استنفاذ المواد الغذائية المتاحة التي تكون ضرورية لنمو الكائنات الدقيقة الممرضة (Pal et Gardener, 2006) ، مثل ما هو الحال لدى الفطر الداخلي لنمو الكائنات الدقيقة الممرضة (Beauveria bassiana 11-98) اللطماطم و القطن Rhizoctonia solan الذي يعتقد إلى حد ما أنه يعمل على مكافحة الفطر الممرض المعرضة (Al., 2008).

الجدار الخلوي للفطريات الممرضة للنباتات تتكون أساسا من glucan و كل من chitin و كل من دانفطريات الممرضة النباتات الرئيسية التي تعمل على هدم و تحليل الجدار الخلوي لهذه الفطريات الممرضة من خلال الممرضة، حيث تعمل الكائنات الحية الدقيقة المتطفلة على قتل و تثبيط هذه الفطريات الممرضة من خلال إنتاجها لهذه الإنزيمات المحللة لجدارها الخلوي مشكلة بذلك ثغور على مستواها مما يسهل عملية اخترقها و استخلاص المركبات الغذائية اللازمة لنموها (Sikora, 2009; Dababat et و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات أيضا منتجة لبعض الإنزيمات المحللة للجدار الخلوي للفطريات الممرضة و نشاطيتها المثبطة لنمو هذه الفطريات له علاقة بإنتاج هذه الإنزيمات المحللة للجدار الخلوي للفطريات الممرضة و نشاطيتها المثبطة لنمو هذه الفطريات له علاقة بإنتاج هذه الإنزيمات المحللة الحدرها الخلوية مثل Cao et al., 2009; Quecine et al., 2008) β-1,3-glucanas و chitinas المخللة المحدرها الخلوية مثل و دانشاطيتها المثبطة المعرضة و على المحدرة المحدرة الخلوية مثل و دانشاطيتها المثبطة المعرضة و دانشاطيتها المثبطة المدودة و المحدرة و

3.4.1 تعزيز المقاومة ضد الكائنات العاشبة و الحشرات

أشارت عدة أبحاث إلى أنه يمكن للكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات أن تساهم في حماية عوائلها Clay et Schardl, 2002; Roberts et Andrae, 2004; Spiering) ضد الحيوانات العاشبة و كذا الحشرات

et al., 2005). و ذلك من خلال إنتاج بعض المركبات السامة على مستوى عوائلها و التي تجعل منها عوائل غير مناسبة للتغذي عليها من طرف هذه الحيوانات العاشبة و الحشرات (Azevedo et al., 2000). العديد من الأبحاث أجريت على تأثير الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات على الحشرات و الحيوانات العاشبة و على الرغم من أن النتائج ظهرت أنها تختلف من نبتة إلى نبتة و من حشرة إلى حشرة إلا أنه هناك علاقة قوية تشير إلى أن الكائنات التي تتغذي على النباتات العشبية تفضل التغذي على الأنواع النباتية غير المصابة بالميكروبات الداخلية، حيث أن النباتات غير المصابة بهذه الميكروبات تسمح للحشرات بالتغذي عليها و مواصلة حياتها، فعلى سبيل المثال بعض أنواع الصراصير التي تتغذي على الأعشاب (Ryegrass) المصابة بالميكروبات الداخلية تموت في غضون 48ساعة بينما يمكنها مواصلة حياتها إذا تغذت على نباتات أخرى غير مصابة بالميكروبات الداخلية (Ahmed et al., 1985). بعض الحيوانات العاشبة مثل الأحصنة و المواشى التي تتغذى على النبات العشيي Festuca arundinacea المصابة بالميكروبات الداخلية وجدت أنها تعاني من بعض الأمراض منها مرض Roberts et Andrae, 2004) Tall fescue toxicosis). في دراسة بعدها أين شخص هذا المرض وجد أنه يظهر بسبب بعض المركبات السامة (lysergic acid amides 'alkaloids و ergopeptines) و موازاة مع ذلك نسبة عالية من alkaloids وجدت في أوراق و بذور هذا النبات العشبي و المنتجة من طرف الميكروبات الداخلية لها (Roberts et al., 2005).

إن الميزة الرئيسية للكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات أنها تحفّز و تعمل على رفع من إنتاج المركبات السامة بعد تعرض عوائلها للأضرار المسببة من طرف الحشرات، حيث لوحظ أن المقاومة ضد الحشرات من طرف الكائنات الحية الدقيقة الداخلية راجع إلى إنتاج alkaloids إذ و بعد تعرض عوائلها للغزو من طرف الحشرات هذه الإنتاجية تحفّز و ترفع منها (Azevedo et al., 2000). و على وجه العموم الكائنات الحية الدقيقة القادرة على المساهمة في حماية عوائلها من الحيوانات العاشبة و الحشرات تعمل على إنتاج أنواع مختلفة

من المركبات السامة مثل (retraenone steroids) و التي تعمل على ردع و تسميم الحيوانات العاشبة مثل (الأبقار، الغزلان، الماعز و الخيول) و مختلف الحشرات (Goggin, 2007).

5.I الكائنات الحية الدقيقة مصدر للمركبات الطبيعية ذات النشاط البيولوجي

يوجد على منظومتنا البيئية حوالي 300000 نوع نباتي و كل فرد من هذه الأنواع النباتية يمكن أن يكون عائلا لكائن حي دقيق داخلي أو أكثر و هذا ما يعزز و يرفع فرصة الحصول على أنواع و عزلات جديدة من المكروبات من مختلف الأنواع النباتية التي تنموا في مختلف البيئات (Strobel et al., 2004). العديد من الأبحاث بينت أنه يمكن الحصول على أنواع و عزلات جديدة من المكروبات من ضمنها البكتيريا الخيطية و الأبحاث بينت أنه يمكن الحصول على هذه الأنواع الجديدة يعني بالتالي إمكانية الحصول على مركبات الفطريات الداخلية للنباتات ، و الحصول على هذه الأنواع الجديدة يعني بالتالي إمكانية الحصول على مركبات جديدة ذات نشاط بيولوجي تكون أكبر (Mohanta et al., 20110). أغلب الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من مختلف النباتات تنتمي إلى الفطريات بالإضافة إلى عدد من أنواع البكتيريا الخيطية و التي بدأ عددها يرتفع في السنوات الأخيرة (Mohanta et al., 2010). من جهة أخرى عدد المستقلبات الثانوية المتحصل عليها من الفطريات الداخلية أكبر من أي مكروب داخلي آخر (Zhang et al., 2006).

بينت العديد من الأبحاث أن الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات يمكنها أن تشكل مصدر للختلف المركبات الطبيعية الجديدة التي لها نشاطيات بيولوجية مختلفة، ضد ميكروبية (Zhao et al., 2010;)، مستقلبات ذات نشاطية مضادة للسرطان (Zhao et al., 2010; المصدر (Zhao et al., 2011) كان مستقلبات ذات نشاطية مضادة للإلتهابات (et al., 2007) مستقلبات ذات نشاطية مضادة للإلتهابات (al., 2009)، إضافة إلى ذلك مستقلبات ذات نشاطية مضادة للأكسدة (Al., 2010;)، إضافة إلى ذلك مستقلبات ذات نشاطية مضادة للأكسدة (Zhao et al., 2009)، إضافة إلى ذلك مستقلبات ذات نشاطية مضادة للأكسدة (المنشورات العلمية إلى مختلف (Taechowisan et al., 2009).من جهة أخرى تطرقت العديد من التقارير و المنشورات العلمية إلى مختلف

الجموعات التي تنتمي إليها المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا المعزولة مؤخرا من الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية المعزولة من عدة نباتات مختلفة. حيث (2011) أشار إلى بعض أنواع هذه المستقلبات و أهم الجموعات التي تنتمي إليها المتحصل عليها من البكتيريا الخيطية المعزولة من عوائل مختلفة، إذ يظهر بصورة واضحة أن الأنواع المختلفة لجنس Streptomyces هي المسؤولة بصفة رئيسية على إنتاج المستقلبات الثانوية الجديدة النشطة بيولوجيا. أما Yu و آخرون (2009) أشاروا إلى مختلف المجوعات المشكلة للمستقلبات الثانوية الجديدة النشطة بيولوجيا و المتحصل عليها من الفطريات الداخلية المعزولة من عوائل مختلفة. وعلى وجه العموم ومن خلال هذه التقارير و أخرى يظهر أن الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات قادرة على توفير مجموعات واسعة من المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا و التي في أغلب الأحيان وجدت على أنما تنتمي إلى (Terpenoids ، Steroids ، Quinones ، Phenols ، Peptides ، Aliphatic compounds ، Alkaloids) Anthraquinones ، Arylcoumarins ، Ansamycins ، Coumarins ، Macrotetrolide ، (Flavonoids)

1.5.I. الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات مصدر للمستقلبات الثانوية ذات النشاط المضاد للميكروبات

المستقلبات الثانوية التي تسلك أو لها نشاطية المضادات الحيوية تعرّف على أنما المواد العضوية الطبيعية ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة، هذه المركبات تنتج من طرف الأحياء الدقيقة و التي لها نشاطية مضادة لأحياء دقيقة أخرى عند التراكيز المنخفضة (Guo et al., 2008). و يعتقد أن الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات لها من الآليات الفعالة للتغلب على الكائنات الحية الدقيقة الممرضة و ذلك من خلال إنتاج المستقلبات الثانوية ذات النشاط الضد ميكروبي (Tan et Zou, 2001). و حتى الآن العديد من الدراسات بينت أن الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات لها القدرة على إنتاج عدد واسع من المركبات المضادة بينت أن الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات لها القدرة على إنتاج عدد واسع من المركبات المضادة

للميكروبات و التي تنمي إلى عدة أقسام أهمها (Yu et al., 2009) (Flavonoids و Terpenoids).

إكتشاف مركبات حديدة من المستقلبات الثانوية المضادة للميكروبات يعد بديل مهم للتغلب على العدد المتزايد للميكروبات المقاومة للأدوية و الممرضة للإنسان و النبات، و لعل الوجود الحالي و القليل للمضادات الحيوية الفعالة ضد مختلف الأنواع البكتيرية و العدد القليل للعوامل الجديدة المضادة للميكروبات يعود نسبيا إلى قلة المردود الإستثماري في هذا الجال (Song, 2008; Yu et al., 2009). مضادات الميكروبات المنتجة من طرف الأحياء الدقيقة الداخلية للنباتات لا يمكن استعمالها فقط كأدوية علاجية للبشر بل يمكن أيضا استعمالها في حفظ الأغذية من التلف و السيطرة و مراقبة الأمراض التي يمكن أن تنقلها هذه الأغذية (al., 2008).

1.1.5.I الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات مصدر للمستقلبات الثانوية المضادة للبكتيريا يوجد أكثر من 30000 مرض سريري مشخص و أقل من ثلث هذه الأمراض يمكن التقليل من حدتما و عدد أقل من ذلك يمكن الشفاء منه، كما أن عدد البكتيريا متعددة المقاومة في زيادة مستمرة و التي أدت إلى الحد من فعالية المعاجلة التقليدية ضد هذه الأنواع البكتيرياة، و بالتالي هناك حاجة ماسة إلى عوامل علاجية جديدة لمكافحة هذه الأمراض (Larsen et al., 2005; Strobel et Daisy, 2003).

عدة مضادات حيوية تم الحصول عليها من الفطريات الداخلية للنباتات من بينها (3) (Pro-Thr و هما نوعين جديدين من المضادات الحيوية البيبتيدية لهما نشاطية ضد بكتيرية، وyclo (Pro-Tyr) (4) و هما نوعين جديدين من المضادات الحيوية البيبتيدية لهما نشاطية ضد بكتيرية هذين الأخيرين تم الحصول عليهما من الفطر الداخلي .(Cui et al., 2008) المتحصل عليها من الفطر الداخلي .(Phenolic acids) المعزول من Saurauia scaberrinae أظهرت نشاطية ضد بكتيرية ضد البكتيريا من المراكبين altersolanol A وجبة الغرام (3)- 3-O-methylalaternin كل من المركبين من المركبين 3-O-methylalaternin و 3-O-methylalaternin

(الشكل Vrospermum picroides الني أظهرت نشاطية مضادة للبكتيريا موجبة الغرام Urospermum picroides و التي أظهرت نشاطية مضادة للبكتيريا موجبة الغرام Ampelomyces sp. (Aly et al., 2008) Enterococcus faecalis و S.epidermidis ، aureus و S.epidermidis ، من جهة أخرى البكتيريا الخيطية خصوصا جنس Streptomyces أظهرت أنحا قادرة على إنتاج أنواع مختلفة من المضادات الحيوية، العزلة الخيطية خصوصا جنس Streptomyces pteridifolia و صفت على أنحا منتجة لنوعين من المضادات الحيوية الأسترالية ودان الله نشاطية من المضادات الحيوية (Castillo et al., 2006) و رومنت على أنحا منتجة لنوعين من المضادات الحيوية البكتيريا موجبة الغرام (Castillo et al., 2006) (Castillo et al., 2005) عزلوا نوعين من المضادات الحيوية البيبتيدية Preptomyces NRRL و كل هذه المركبات لها نشاطية الخرام (Macada, 2009) و سابلة الغرام (Yu et al., 2009).

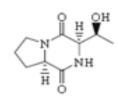
2.1.5.I الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات مصدر للمستقلبات الثانوية المضادة للفطريات

الإصابة بالفطريات الممرضة للإنسان أصبح يشكل خطرا صحي متزايد و ذلك لما يمكن أن تؤدي إليه من أمراض خطيرة كما تؤدي إلى إضعاف الجهاز المناعي سيما عند المرضى الذين يقومون بزرع الأعضاء، و بالتالي هناك حاجة ماسة إلى مضادات حيوية جديدة تحد من هذه الأمراض (Strobel, 2002).

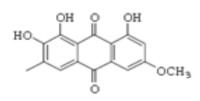
نوعين من المضادات الحيوية تنتمي إلى الألكالويدات Chaetoglobosins A و الشكل الشكل الفطر الداخلي الفطر الداخلي الفطر الداخلي الفطر الداخلي الفطر الداخلي الفطر الداخلي و Chaetomium globosum في الفطر الداخلي و ((2،1)) من الفطر الداخلي المضادات الحيوية ((الشكل الفطريات الفطريات الفطريات الفطريات المرضة للنباتات ((الاستخل الفطريات الممرضة للنباتات ((الاستخل الفطريات الممرضة للنباتات ((الاستخل الفطريات الممرضة للنباتات ((الاستخل الفطريات الممرضة النباتات ((المستخل الفطريات الممرضة النباتات (الفطريات الممرضة النباتات (الفطريات الممرضة النباتات (الفطريات الممرضة النباتات (الفطريات الممرضة الفطريات الممرضة الفلاية الممرضة الفلاية الف

et al., 2008). بعض المضادات الحيوية تنتمى إلى المركبات الأليفاتية مثل المركبان B و Cytosporone C (الشكل1: (10،9)) تم عزلهما من الفطر الداخلي . Phompsis sp. هذه المركبات لها نشاطية ضد الفطر Candida albicans و Candida albicans عن جهة أخرى العديد من المركبات المضادة للفطريات تم عزلها من البكتيريا الخيطية خصوصا جنس Streptomyces منها المركب البسيط 6-prenylindole الذي تم عزله من العزلة Streptomyces sp. TP-A0595 و الذي له نشاطية مضادة للفطر الممرض للنباتات (Igarashi, 2004) Fusarium oxysporium . مركبان آخرين جديدان cedarmycins B و cedarmycins B عزلهما من العزلة Streptomyces sp. TP-A0456 المعزولة من الأرز، cedarmycins A شهد نشاطية ضد الفطر cedarmycins A بتركيز أدبي للتثبيط 0.4 مكغ/مل (Igarashi, 2004). العزلة الداخلية Streptomyces sp. Tc022 المعزولة من جذور galanga تثبط بقوة الفطر Collectotrichum musae و تبين أن هذه العزلة منتجة للمضاد الحيوي actinomycin D. مؤخرا تم عزل مضاد حيوي جديد saadamycin من العزلة Streptomyces sp. Hedaya48 و الذي أظهر نشاطية جد عالية ضد الفطريات الممرضة الجلدية و بعض الفطريات الأخرى الممرضة للإنسان (El-Gendy et El-Bondkly, 2010). الدراسة النظرية

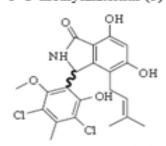
Chaetoglobosins A (1)



Cyclo (Pro-Thr) (3)

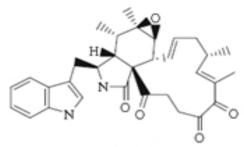


3-O-methylalaternin (5)



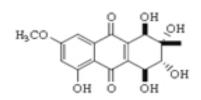
Pestalachloride A (7)

Cytosporone B (9)



Chaetoglobosins C (2)

Cyclo (Pro-Tyr) (4)



Altersolanol A (6)

Pestalachloride B (8)

Cytosporone C (10)

الشكل 01: بنية بعض المركبات الطبيعية المعزولة من الفطريات الداخلية للنبتات ذات النشاط الضد ميكروبي.

الدراسة النظرية 2011

2.5.I الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات مصدر للمستقلبات الثانوية المضادة للأكسدة تتسبب تكمن أهمية المركبات المضادة للأكسدة في كون أنها قادرة على أن تكون فعالة ضد الأضرار التي تتسبب فيها مختلف أنواع التفاعلات الأوكسيجينية (ROSs) و الجذور الحرة المشتقة من الأوكسجين و التي تساهم في وجود مجموعة محتلفة من الأمراض، مثل الأضرار التي تصيب الحمض النووي (DNA)، السرطان و التحلل الخلوي (Huang et al., 2007; Seifried et al., 2007).

تعد المركبات ذات النشاطية المضادة للأكسدة شائعة لدى النباتات مثل الخضروات و الفواكه، مع ذلك الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات أشير إليها على أنها يمكن أن تكون مصدر للمركبات ذات النشاطية المضادة للأكسدة. Huang (2007) قدر النشاطية المضادة للأكسدة لعدة فطريات داخلية و علاقة هذه النشاطية بالمحتوى الإجمالي للفينولات حيث أشار إلى وجود علاقة كبيرة بين كمية هذا المحتوى و فعالية النشاطية المضادة للأكسدة عند هذه الفطريات. المستقلب الفينولي Graphislactone A الحصول عليه من العزلة الفطرية Cephalosporium sp. IFB-E001 المعزولة من النبتة أثبت أن له نشاطية مضادة للأكسدة أعلى من الشواهد المستعملة (ascorbic acid) و (BHT) al., 2005). نو عين من المركبات المضادة للأكسدة تم الحصول عليهما من الفطر الداخلي Pestalotiopsis Pestacin La Terminalia morobensis microspora المعزول من الطبيعة ذو isopestacin) و isopestacin الذي يشبه في بنيته الهيكلية الفلافونويدات (الشكل2)، كل من هذين المركبين أثبت أن لهما نشاطية ضد ميكروبية و مضادة للأكسدة (Harper et al., 2003; Strobel et al., 2002). العزلة البكتيرية Streptomyces sp. Tc052 المعزولة من جذور Alpinia galangal و جدت على أنها منتجة لأربعة مركبات فلافونويدية لها نشاطية مضادة للأكسدة هي (1) kaempferol، umbelliferone (3) ، isoscutellarin (2) و (1) و (2) أظهرا (2) على من المركب (1) و (2) أظهرا قدرة إزاحية عالية لجذر DPPH في حين كل من المركبين (1) و (2) أظهرا قدرة إزاحية متوسطة، كما لوحظ الدراسة النظرية

وجود علاقة بين وجود المجموعة الفينولية في المركبين (1) و (2) و القدرة العالية على إزاحة جذر DPPH). (Taechowisan et al., 2009)

الشكل 02: بنية بعض المركبات المضادة للأكسدة المعزولة من بعض الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية النباتات.

الفصل II

المواد والطرق

1.II. المواد

1.1.II. العينات النباتية

تم الحصول على العينات النباتية من أوراق و جذور لنبات القمح الصلب (Triticum durum Desf.) المنتمية إلى الصنف المحلي الجزائري محمد بن بشير من أحد الأراضي الزراعية النجيلية باليشير شرق ولاية برج بوعريريج في شتاء 2010 بعد 3 أشهر من عملية الزرع. عينات بذور القمح المنتمية إلى نفس الصنف تم الحصول عليها من نفس المزارع.

2.1.II. الأنواع البكتيرية و الفطرية

Stenotrophomonas: استعمل في هذه الدراسة 12 نوعا بكيريا ممرضا منها 9 أنواع سالبة الغرام و هي Serratia ، Escherichia coli ، Salmonella typhimurium ، Citrobacter freundii، maltophilia Pseudomonas sp. ، Pseudomonas aeruginosa ، Enterobacter agglomerans ، marcescens Staphylococcus ، Bacillus sp . : الغرام و هي ، Klebsiella pneumoniae ، و ثلاث أنواع بكتيرية موجبة الغرام و هي . Enterococcus faecalis عمستوى عسوى مستوى عليها على مستوى عليها على مستوى عليها على مستوى عليم البكتيريا والطفيليات بالمستشفى الجامعي لولاية سطيف ، بالإضافة إلى الخميرة Candida albicans عنبر علم البكتيريا والطفيليات بالمستشفى الجامعي لولاية سطيف ، بالإضافة إلى الخميرة الأحياء الدقيقة جامعة كما تم استعمال فطرين ممرضين للنباتات أولهما تم عزله و التعرف علية بمخبر الأحياء الدقيقة جامعة فرحات عباس بسطيف وهو . Phytophtora infestans sp أما الثاني تم الحصول علية من المعهد العلمي . Fusarium oxysporium f.sp . albidinis (FOA) هو (INRA) هو (INRA) هو (INRA) هو المحدث الزراعية (INRA) هو المحدث الزراعية والمعالمة المعلمة المعلمة المعلمة المعلمة المحدث الزراعية والمعلمة المعلمة ال

4. 1.II مواد الكيميائية والأجهزة

استعملت العديد من الأوساط و المركبات الكيميائية من شركات مصنعة مختلفة (SIGMA). Prolabo ، Panreac ، MERCK ، Institut pasteur production ، diagnostics

2.II. الطرق

1. 2. II جمع العينات النباتية

تم اقتلاع نبات القمح بحذر و عشوائيا من خمسة مناطق مختلفة من نفس المنطقة، أين تم فصل الجذور عن الأوراق و أخذ عينات لكل منها، يراعى في أخذ العينات خلوها من الاعراض المرضية. وضعت هذه الأخيرة منفصلة عن بعضها في أكياس معقمة. تحضن العينات بدرجة حرارة 4°م و يتم عزل الكائنات البكتريا و الفطريات منها خلال مدة لا تتعدى 2001, العد عملية الجمع (,2007; Verma et al., 2007).

2.2.II و البكتيريا الخيطية الداخلية لنبات القمح

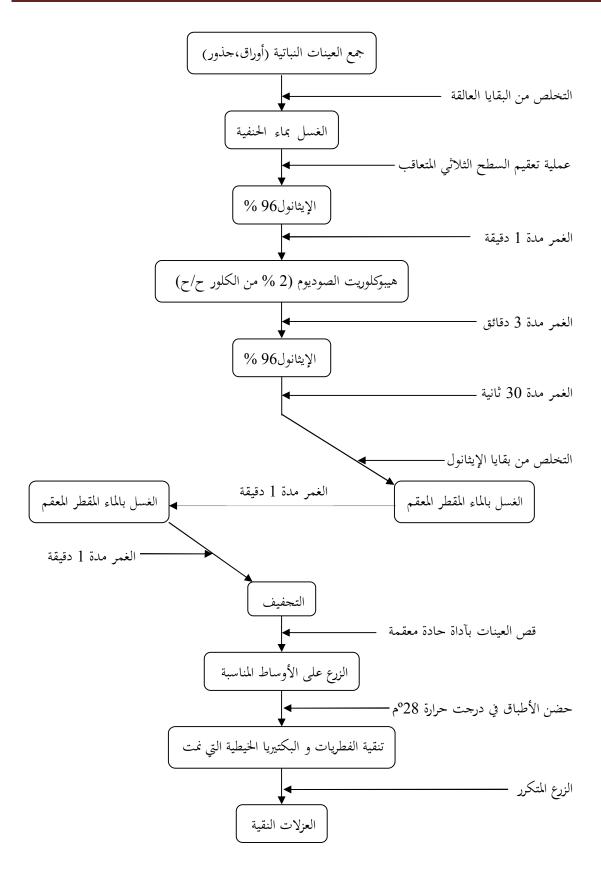
تعرض العينات النباتية لعملية الغسل المستمر تحت ماء الحنفية بحدف نزع البقايا العالقة بحا، ثم تعرض لعملية تعقيم السطح الثلاثي المتعاقب بحدف القضاء على الكائنات الحية التي تعيش على السطح، حيث تقطع إلى أجزاء صغيرة و تغمر تسلسليا في الإيثانول 96% لمدة دقيقة واحدة، هيبوكلوريت الصوديوم (2% من الكلور ح/ح) لمدة 3 دقائق ثم في إيثانول 96 % لمدة 30 ثانية، أحيرا تغسل بالماء المقطر المعقم مرتين و بعد هذه المرحلة تقطع العينات بأداة حادة ومعقمة إلى قطع صغيرة حوالي (5ملم×5ملم) لتترك تجف على الورق الترشيح المعقم. تزرع خمسة قطع من كل عينة و بخمسة مكررات لكل منها على أطباق بتري الحاوية وسط النرع (PSA و الوسط Potato Sucrose Agar (PSA) و و الوسط Starch و الوسط و البكتيريا الخيطية الداخلية على التوالي. تحضن جميع (كطباق في درجة حرارة 28 م، تراقب الأطباق يوميا و بعد عملية الحضن تم اقتطاع جزء من من الطرف المعالمي للعزلات و أعيد زرعها على وسط العزل المناسب من أجل تنقيتها (,2007; Zin et al. و).

تم بالاعتماد للتحقق من فعالية عملية تعقيم السطح في هذه الدراسة على طريقتين وفقا لد المتحصل علية في أخذ في الطريقة الأولى 0.5 مل من الماء المقطر المعقم المتحصل علية في (al., 2009; Verma et al., 2009) أما في الطريقة الثانية فيتم أخذ بعض القطع أخر عملية الغسل و نشر على كل من أطباق PSA و PSA، أما في الطريقة الثانية فيتم أخذ بعض القطع المعقمة و تمسح على أوساط العزل المذكورة، تحضن الأطباق في درجة حرارة 28° م و تراقب يوميا ، غياب أي غو ميكروبي يدل على فعالية طريقة تعقيم سطح العينات. كما تم حساب معدلات الاستيطان و معدلات الاستيطان و معدلات الاستيطان و معدلات الاستيطان و العناد حسب (Yuan et al., 2010) بالاعتماد على العلاقات التالية:

Colonization rate = $\frac{\text{Total number of samples yielding } \ge \text{isolate}}{\text{Total number of samples in that trial}}$

Isolation rate = Total number of isolates yielding in a given trial

Total number of samples in that trial



الشكل 103: مخطط يوضح تعقيم السطح، عزل و تنقية الفطريات و البكتيريا (Larran et al., 2007; Zin et al., 2007)

حفض العزلات الفطرية و البكتيرية المتحصل عليها تم وفقا لطريقة (, 2008; Paul et al., 2008; Paul et al., وفقا لطريقة أوساط الزرع المعقمة (2007). حيث تم تنمية هذه الأخيرة على كل من أوساط الزرع المعقمة (PDA) على التوالي كمرحلة أخيرة للتأكد من نقاوتها، بعدها تزرع على نفس الأوساط في Nutrient Agar (NA) أنابيب الاختبار وبعد نموها تحفظ في درجة حرارة 4° م، هذا بالنسبة للحفظ طويل المدى فتم حفضها في شكل معلقات بوغية باستعمال محلول مائي معقم به 15 % من الغليسيرول لتحفظ في درجة حرارة جد منخفضة.

3.2. II إختبار النشاط الأولى المضاد للبكتيريا و الفطريات الممرضة من طرف العزلات

يهدف هذا الاختبار إلى إظهار العزلات التي تملك نشاط ضد ميكروبي، هذه الأخيرة تنتقى ليتم التعرف عليها و مواصلة العمل عليها في باقي النشاطات البيولوجية المراد اختبارها على هذه العزلات. تم اختبار النشاط الضد ميكروبي للبكتيريا الخيطية المعزولة على4 أنواع بكتيرية ممرضة سالبة الغرام و 3 أنواع أخرى موجبة الغرام سالفة الذكر . حيث تم الاعتماد في هذا الاختبار على طريقة الخط العمودي، زرعت البكتيريا الخيطية إنطلاقا من المعلق البوغي بواسطة إبرة معقمة بشكل خط عمودي عل طبق GN ثم الحضن لمدة أربعة أيام، بعدها وانطلاقا من المزارع البكتيرية الفتية بعمر 24 سا و المنماة على (Nutrient Broth (NB) و بواسطة إبرة معقمة تزرع بشكل خط عمودي على البكتيريا الخيطية ثم الحضن في درجة حرارة 30 °م لمدة 24 ساعة، ابحد عملية الحضن ثم حساب مسافة التثبيط و المعبر عليها بالمليمتر (ملم) (Pandey et al., 2004).

أما في حالة إختبار كل من الفطريات والبكتيريا الخيطية المعزولة على الفطريات الممرضة للنباتات سالفة الذكر فتم الاعتماد على طريقة المزارع المزدوجة (Ruangmek et al., 2008; Prapagdee et al., 2008). غيت كل من الفطريات المعزولة و الممرضة على أطباق PDA لمدة من 5 إلى 7 أيام، النشاطية الضد فطرية تم إظهارها بزرع قرص PDA بقطر 4 ملم منزوع من الهيفا النامية للفطريات الداخلي على إحدى جهتي طبق PDA و على الجهة الأخرى المقابلة قرص من PDA للفطر المختبر، بينما في حالة البكتيريا الخيطية نشاطيتها PDA

الضد فطرية تم باستعمال المعلق البوغي المحضر سابقا، حيث تم صب µ20 بالقرب من حواف أطباق PDA أم قرص بقطر 4 ملم من الفطر المختبر يلقح في مركز الطبق. أجريت العملية مع جميع العزلات و بثلاث مكررات لكل تجربة مع تلقيح أطباق PDA بالفطر المختبر لوحده كشاهد. حضنت كل الأطباق في درجة حرارة 30 م لمدة 7أيام، في آخر يوم من الحضن تم قياس نصف قطر الفطريات المختبرة في كل من الشاهد و المزارع المزدوجة و نسبة التثبيط حسبت باستعمال العلاقة التالية:

Inhibition percentage (%) =
$$\frac{A-B}{A}$$
 X 100 حيث: B هو نصف قطر الفطر المختبر في الطبق الشاهد.

A هو نصف قطر الفطر المختبر في طبق المزرعة المزدوجة.

4.2. II نشخيص الفطريات و البكتيريا المعزولة

1.4.2. II. تشخيص الفطريات المعزولة

تم التعرف على الأجناس الفطرية المعزولة بالاعتماد على الخصائص المورفولوجية باستعمال أوساط زرع على التعرف على الأجناس الفطرية باستعمال المجهر و تعلقه من المستعمال المجهر و الخصائص الميكروسكوبية باستعمال المجهر الضوئي، إذ تم الإستعانة في تحديد الاجناس الفطرية بمفاتيح التشخيص لكل من (Pitt J. I. and Hocking) و ذلك من خلال تحديد الصفات التالية:

- معدل النمو: سريع، بطيء، أو معتدل.
- لون المستعمرات و التغيرات الحاصلة في اللون: توزع منتظم للون أو متذبذب.
 - لون خلفية المستعمرة.
 - إفراز الصباغ الملونة لوسط الزرع.
- بنية سطح المستعمرة: قطيفيه أو قطنية، حبيبية أو ملساء، مسطحة أو مرتفعة على سطح الوسط.

- وجود قطرات مائية (exsuda) على سطح المسليوم.
 - حصائص الهيفات: اللون، مقسمة أو غير مقسمة.
- إنتاج الأجسام الثمرية (fruiting bodies): وإنتاج الأجسام الثمرية . corenia .
 - لون و حجم و شكل الأجسام الثمرية.

2.4.2. II تشخيص البكتيريا الخيطية المعزولة

تم التعرف على البكتيريا الخيطية على مستوى الجنس بالاستعانة بمفاتيح التشخيص (البيوكيميائية المنافض البيوكيميائية (Holt et al, 1924) و ذلك بالاعتماد على الخصائص المورفولوجية المزرعة و وبعض الخصائص البيوكيميائية المنافضة إلى الخصائص المستعمال عدة أوساط وفقا له: (International Streptomyces Project (ISP) بالستعمال عدة أوساط وفقا له: (Muliani, 2008; Shirling et Gottlied, 1966; Silva et al., 2009; Verma et al., الميكروسكوبية (2009). حيث تم تحديد الصفات التالية:

- وجود و لون المسليوم الهوائي، لون مادة المسليوم مقسم أم لا، تشكيل الأبواغ و لونها على وسط الزرع (Inorganic salts-starch agar (ISP 4) بعد 21 يوم من الحضن في درجة حرارة27°م.
 - مورفولوجية و ترتيب السلاسل البوغية: طويلة أو قصيرة، سلاسل في شكل حيط، لولبية أو حلزونية.
 - بنية سطح المستعمرة: جيلاتينية، حبيبية أو غبارية.
- إنتاج الصباغ المنتشرة تم على الوسط (IPS5) بعد 14يوم من الحضن في درجة حرارة 27°م.

-إنتاج صبغة الميلانين (بنية داكنة إلى سوداء) تم على الوسط (IPS7) Tyrosine agar بعد 4 أيام من الحضن في درجة حرارة 27 °م.

- تلوين غرام تم وفقا للطريق الكلاسيكية بتحضير مسحة بكتيرية مثبتة و بعد مراحل التلوين تفحص بالجهر الضوئي تحت تكبير (×100).
- acid-fast أو مقاومة التلوين بالأحماض و الكحولات تم بواسطة تلوين acid-fast حسب المحافر في (Larpent and Larpent-Gourgaud, 1985) و ذلك لتمييز جنس الميكوبكتيريا والتي تتلون باللون الأحمر في حسب معين بقية الأجناس الأخري تتلون باللون الأزرق. تلوين مقاومة الأحماض و الكحولات جزئيا مثل (Gorden et Smith, 1954) و ذلك لتحديد الأجناس التي تكون مقاومة للأحماض و الكحولات جزئيا مثل التي تتلون باللون الوردي.
- إنزيم الكتالاز يحفز تحلل الماء الأوكسيحيني إلى مركبين وفقا للتفاعل التالي: O2 + O2 + O2 + O3 إختبار وجود هذا الإنزيم تم بوضع جزء من المستعمر البكتيرية على صفيحة زجاجية معقمة ثم إضافة قطرة من الماء الأوكسجيني و الخلط بحركات دورانية، ظهور فقاعات غازية دليل على تحلل الماء الأوكسيجيني و وجود إنزيم الكتالاز.
- معرفة نمط التنفس تم حسب (Guiraud ; 1998) باستعمال الوسط Meat Liver Agar الموزع على أنابيب إختبار، يجدد الوسط في حمام مائي لمدة 30 دقيقة ثم يترك ليبرد حتى درجة حرارة 45 م ثم الزرع بواسطة ماصة باستور التي تدخل إلى عمق الوسط وتخرج بواسطة حركات حلزونية بهدف الزرع المتجانس للوسط. بعد تصلب الوسط تحضن الأنابيب في درجة حرارة 45 م لمدة 21 يوم.

- حركة البكتيريا تم حسب (Guiraud ; 1998) باستعمال الوسط Mannitol mobility، حيث تم الزرع عن طريق الثقب العمودي للوسط و بعد 7 أيام من الحضن في درجة حرارة 30 °م، يعبر عن حركة البكتيريا عند إنتشار نموها على الوسط إنطلاقا من منطقة الزرع العمودية.

2. II . 5. إستخلاص المستقلبات الثانوية

بحدف عزل المستقلبات الثانوية ذات النشاط البيولوجي الضد ميكروبي بالنسبة للعزلات الفطرية والبكتيرية الني أظهرت نشاط ضد مكروبي أولي تم الاعتماد على طريقة كل من (,2009; Kwon et al., 2007 ولي أولي تم الاعتماد على طريقة كل من (,2007; Zin et al., 2007 ولي إلى الأوساط المعقمة PDB عمدف استخلاص المستقلبات الثانوية لكل من العزلات الفطرية و البكتيريا الخيطية المعزولة على التوالي . NB بمدف استخلاص المستقلبات الثانوية لكل من العزلات الفطرية و البكتيريا الخيطية المعزولة على التوالي . SCA بميت الفطريات على الوسط السائل PDB لمدة 5 أيام، بعدها 4 أقراص من الآجار الحاوية على الوسط الصلب SCA للمسليوم الفطري تزرع على الوسط السائل PDB المستعمرات البكتيرية تزرع على 15 مل الوسط السائل PDB لمدة 3 بعدها 4 أقراص من الآجار الحاوي على المستعمرات البكتيرية تزرع على 15 مل الوسط السائل PDB لمدة 3 أيام، يتم إضافة هذا الحجم في نحاية اليوم الثالث إلى 100 مل من الوسط السائل NB . مراحل التحرية تمت أيم، يتم إضافة هذا الحجم في نحاية اليوم الثالث إلى 100 مل من الوسط السائل NB . مراحل التحرية تمت الرج (150 دورة/ دقيقة) لمدة 21 يوم. بعد إنتهاء فترة الحضن تمت عملية الاستخلاص وفقا للمراحل التالية: - تمرير أوساط كل عينة كل على حدة عبر طبقتين من الشاش القطني بحدف عزل المسليوم عن الرشاحة حيث يتم استقبال هذه الأخيرة في بيشر نضيف .

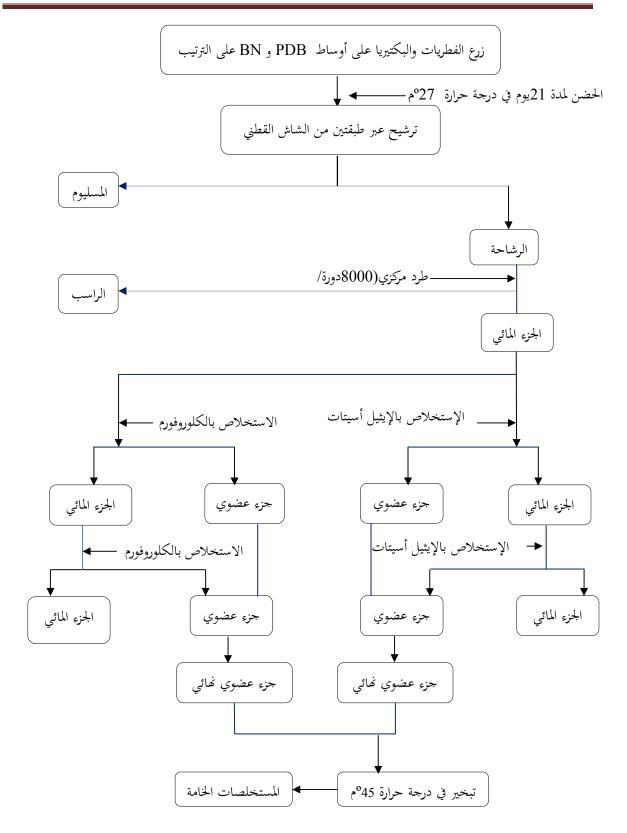
- الرشاحة المحصل عليها لكل عينة تعرض لطرد مركزي (8000 دورة/ دقيقة) لمدة 15 دقيقة بهدف التخلص من بقايا المسليوم و الأبواغ.
- الجزء العلوي من الرشاحة المتحصل عليه بعد عملية الطرد المركزي لكل من المكرر الأول و الثاني يسترجع ليمزح بنفس الحجم من الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم على التوالي، ترج العينات جيدا ثم تترك لعدة ساعات

بهدف انفصال الطبقة العضوية عن الطبقة المائية. بعد انفصال الطبقة العضوية عن الطبقة العضوية تسترجع هذه الأحيرة أما الطبقة المائية فيعاد استخلاصها بنفس الطبيقة.

- تمزج الطبقات العضوية لكل مذيب من نفس العينة ليتم تركيزها بجهاز التبخير (Rotavapor) تحت درجة حرارة 45 °م، نحصل في النهاية على ناتج عبارة عن مستخلص خام يذاب بتركيز 20مغ/ مل في المنابع المنابع (dimethylsulfoxide (DMSO) عاء بنسبة (1:9) ليحفظ في درجة حرارة 4°م إلى غاية استعماله. (الشكل 40) يلخص مراحل الاستخلاص.

6 . 2. II نشاطية المستخلصات الخامة المضادة للميكروبات

تمت دراسة النشاطية الضد ميكروبية للمستخلصات الخامة المتحصل عليها بالاعتماد على طريقة الإنتشار على الوسط الصلب باستعمال الأقراص وفقا له: (Baras et al., 2006). حضرت المعلقات البوغية للعينات الفطرية المختبرة بتنميتها على الوسط الصلب PDA لمدة 10 إلى 15 يوم حتى تتم عملية التبوغ ثم تغطى الأطباق بحجم من الماء القطر المعقم 10مل ، ثم تكشط الأبواغ بلطف بملعقة معقمة لتسترجع بعدها في أنابيب إختبار معقمة و تثبت كثافتها عند 410 بوغة/مل، أما الخميرة Candida albicans و باقي الأنواع البكتيرية المختبرة فتنمى لمدة 18 ساعة على الأوساط السائلة PDB و RB و وقدد كثافتها 100، 100 خلية/مل على الترتيب. يصب 100 لمل من المعلقات الفطرية و البكتيرية على الأوساط الصلبة PDA و RB على الترتيب ثم تنشر بناشر زجاجي معقم و تترك لتحف. توضع أقراص ورقية (وثمان رقم 1) المخضرة والمعقمة سابقا على سطح الآجار ثم تبلل بحجم 125 لمن المستخلص الخام لكل من المذيبين بتركيز (1مغ/ مل) كل على حدة، تكرر العملية ثلاث مرات مع كل عينة و استعمل كشاهد سالب المزيج المستعمل لإذابة المستخلصات حدة، تكرر العملية ثلاث مرات مع كل عينة و استعمل كشاهد سالب المزيج المستعمل لإذابة المستخلصات الخامة (DMSO): ماء بنسبة الشد فطرية و البكتيرية قدرت عن طريق قياس معدل قطر التثبيط.



الشكل 104: مخطط يوضح استخلاص المستقلبات الثانوية من العينات الفطرية و البكتيرية حسب طريقة (Arasu et al., 2009; Kwon et al., 2007; Zin et al., 2007)

7. 2. II لأكسدة

β-carotène إختبار . 1 . 7 . 2. II

يعبر هذا الاختبار عن القدرة المضادة للأكسدة بقياس تثبيط المركبات العضوية الدهنية و الهيدروبيروكسيدات التي تملك روابط ثنائية (conjugated hydroperoxi dediene) والتي تظهر خلال و الهيدروبيروكسيدات التي تملك روابط ثنائية (Dapkevicius et al., 1998).

نأحذ 0.5 مغ من β-carotène تذوب في 1 مل من الكلوروفورم، يضاف له 2μ25 من β-carotène تذوب في 1 مل من الكلوروفورم كليا في جهاز التبخير في 40°م، ونضيف و 200 من المناء المقطر المشبع بالأكسجين. نضع 2.5 مل من الخليط السابق في أنبوبة إختبار ونضيف له 350 مكرولتر من المستخلصات المتحصل عليها في عملية الاستخلاص و المحضرة بتركيز ثابت 2 ملغ/مل، تكرر العملية مع الشواهد والمتمثلة في BHT كشاهد موجب والماء والميثانول كشواهد سالبة يحضن المزيج في درجة حرارة الغرفة بعيدا عن الضوء، بعدها تقاس الامتصاصية في 490 نانومتر. وذلك في أزمنة متتالية 0سا، درجة حرارة الغرفة بعيدا عن الضوء، بعدها ويتم حساب النسبة التثبيطية للمستخلصات المضادة للأكسدة (RAA) حسب المعادلة التالية:

 $RAA\% = A_{laja} / A_{BHT} \times 100$

-حيث: العينة A: امتصاصية العينة، A_{BHT} : امتصاصية A_{BHT}

8.2. II . عند النشاطية الإنزيمية

طرق دراسة النشاطية الإنزيمية للإنزيمات المفرزة خارج الخلية تتعدد وفقا للوسط المستعمل و الذي يمكن أن يكون صلبا أو سائلا، و يعد الكشف عن النشاطية الأنزيمية باستعمال أوساط الآجار الصلبة الأكثر استعمالاً حيث تسمح بالكشف والتقدير السريع لمختلف الإنزيمات الخارج خلوية لدي الفطريات و البكتيريا (El-kady et al., 1984; Taskin et al., 2008)

تم دراسة العينات من حيث قدرتما على إفراز كل من إنزيم (Cellulase ، Esterase ، Lipase) و ذلك بإذابة مادة تفاعل كل إنزيم في الأوساط القاعدية، بعدها تلقح بأقراص الآجار (5ملم) الحاوية على الهيفا النامية للفطريات و التي تكون قد نميت على الوسط بأقراص الآجار (6ملم) الحاوية على الهيفا النامية للفطريات و التي تكون قد نميت على الوسط الصلبالصلب والمحتبريا الخيطية فتزرع إنطلاقا من المعلق السلب المحتبريا الخيطية فتزرع إنطلاقا من المعلق البوغي المحضر سابقا (610 بوغة/ مل)، لتترك بعدها تنمو لمدة 5 إلى 7 أيام لكل من الفطريات و البكتيريا على الترتيب في درجة حرارة 30 م، بعدها تضاف كواشف كل نشاط إنزيمي إلى الأطباق و تم حساب كل من قطر الهالة و المستعمرة لتقدير النشاطية الإنزيمية لكل عزلة على كل مادة مختبرة و نسبة الإنتاج الإنزيمي قدرت (Taskin et al., 2008) حسب العلاقة التالية:

نسبة الإنتاج الإنزيمي= معدل قطر الهالة/ معدل قطر المستعمرة

1.8. 2.II. دراسة النشاطية الإنزيمية الفطرية

1.1.8.2.II. الأميلاز

اختبرت نشاطية إنزيم الأميلاز لدي الفطريات بزرع أقراص الآجار الفطرية (5ملم) على الوسط Soluble Starch) أو (Soluble Starch) مضاف إليه 2 % من النشاء القابل للذوبان (yeast extract peptone (GYP) agar الدكسترين، بعد مدة الحضن غمرت الأطباق بمحلول الكاشف (IKI) المتكون من (1% jodine و 2% المحلول الكاشف و 1%) المالة المحيطة بالمستعمرة الفطرية تعتبر نتيجة موجة لنشاطية إنزيم الأميلاز أما باقي الوسط فيظهر بلون أزرق (Maria et al., 2005).

2.1.8.2.II. البروتياز

نشاطية إنزيم البروتياز تمت باستعمال الوسط GYP مضاف إليه 0.4% من الجيلاتين (حيلاتين: 8 غ/100مل) والذي يعقم لوحده ثم يضاف إلى الوسط GYP المعقم، بعد عملية الحضن تغمر الأطباق بالمحلول المائي المشبع Ammonium sulfate الذي يترسب مع الجيلاتين، حيث منطقة الجيلاتين المحلل تظهر

بشكل هالة شفافة حول المستعمرة الفطرية دلالة على وجود نشاط إنزيم البروتياز أما المنطقة غير المحللة فير المحللة فيترسب معها محلول Aaria et al., 2005) ammonium sulfate).

3.1.8.2.II. الليباز و الإستيراز

حددت نشاطية إنزيم الليباز عن طريق تنمية العزلات على الوسط Peptone Agar حيث يضاف إليه 10 كمصدر وحيد الكربون والذي يعقم بمعزل عن الوسط Peptone Agar حيث يضاف بنسبة 1مل لكل 100مل من الوسط، بعد عملية الحضن يعبر عن النشاطية الموجبة لإنزيم الليباز بظهور هالة حول المستعمرة الفطرية بشكل ترسبات بلورية (Maria et al., 2005). بالنسبة للإستيراز اعتمدت نفس الطريقة المتبعة في تحديد نشاطية الليباز لتحديد نشاطية الإستيراز، حيث استعمل نفس الوسط مضاف إلية Tween 80 ويضاف بنسبة 1 مل لكل 100مل من الوسط المستعمل، ظهور هالة بشكل ترسبات حول المستعمرة الفطرية يدل على وجود نشاطية الإستيراز (Carrim et al., 2006).

4.1.8.2.II. السيليلاز

إختبار نشاطية إنزيم السيليلاز لدى الفطريات تم حسب (Pointing, 1999). زرعت الفطريات على الوسط القاعدي (Rointing, 1999). زرعت الفطريات على الوسط القاعدي (Carboxymethyl Cellulose (CMC) ثم حضنت لمدة 5 أيم في درجة وزن/حجم) من السيليلوز (Carboxymethyl Cellulose (CMC) ثم حضنت لمدة 5 أيم في درجة حرارة 25°م، بعدها غمرت الأطباق بالمحلول المائي لأحمر الكونغو 2% (وزن/حجم) لمدة 15دقيقة بعدها غسلت الأطباق بالماء المقطر و تغمر من جديد بمحلول كلوريد الصوديوم (1M) Nacl (1M) لمدة 15دقيقة، وجود المائة المصفرة حول المستعمرة الفطرية يدل على وجود نشط إنزيم السيليلاز.

2.8. 2.II. دراسة النشاطية الإنزيمية البكتيرية

كل من النشاطية الإنزيمية للأميلاز و البروتياز تمت حسب (Faucher et al., 1995) أما كل من الليباز و البروتياز تمت حسب (Carrim et al., 2006; Sousa et al., 2008).

1.2.8.2.II الأميلاز

تم زرع أجناس البكتيريا الخيطية على الوسط (YMA) يحتوي على 1% (وزن/حجم) من النشاء القابل للذوبان بشكل خط إنطلاقا من المعلق البوغي $^{6}10$ بوغة/مل، حضنت الأطباق في درجة حرارة $^{6}0$ 0 مدة 7 للذوبان بشكل خط إنطلاقا من المعلق البوغي $^{6}10$ بوغة/مل، حضنت الأطباق في درجة حرارة $^{6}0$ 0 مدة 7 أيام ليتم بعدها معاملتها بمحلول الليقول المتكون من $^{6}0$ 0 من $^{6}1$ 1 ظهور الهالة الشفافة حول المستعمرة يدل على نشاطية إنزيم الأميلاز.

2.2.8.2.II. البروتياز

لدراسة نشاطية أنزيم البروتياز لدي البكتيريا الخيطية المعزولة تم إستعمال الوسط(YMA) يحتوي على 5 % (وزن/حجم) من مسحوق الحليب الجاف منزوع الدهون (Skimed Milk) و المعقم لوحدة، حيث تم زرع المعلق البوغي كما وصف سابقا ثم الحضن في درجة حرارة 30°م لمدة 7 أيام ليتم في الأخير معاملة الأطباق بمحلول حمض الكلور HCl بتركيز 0.1 مول/ل، ظهور الهالة الشفافة حول المستعمرة البكتيرية يدل على وجود نشاطية إنزيم البروتياز.

3.2.8.2.II. الليباز و الإستيراز

لإختبار نشاطية كل من إنزيمي الليباز و الإستيراز تم إضافة 1% (ح/ح) من 20 Tween و 40 Tween الوحدهما قبل على الترتيب إلى الوسط Peptone Agar كل من 20 Tween و 80 تعقيمهما لوحدهما قبل إضافتهما إلى الوسط، زرع المعلق البوغي للبكتيريا الخيطية على الأوساط المحضرة ثم حضنت في درجة حرارة إضافتهما إلى الوسط، زرع المعلق البوغي للبكتيريا الخيطية على الأوساط المحضرة ثم حضنت في درجة حرارة ومود ثم لمدة 7 أيام، بعد نهاية مدة الحضن تم معاينة الأطباق و وجود الهالة ذات الترسبات البلورية دليل على وجود نشاطية إنزيمي الليباز و الإستيراز.

4.2.8.2.II. السيليلاز

تم إختبار نشاطية إنزيم السيليلاز حسب (Arunachalam et al., 2010). حيث تم إستعمال الوسط كضن (CMC)، بعد زرع البكتيريا على الوسط تحضن

لمدة 7 أيام في درجة حرارة 30°م يصب في الأطباق أحمر الكونغو بتركيز %0.1. بعد نصف ساعة من الحضن تم التخلص من أحمر الكونغو وغسلت الأطباق ثم أضيف لها كلوريد الصوديوم (0.5M) Nacl (0.5M)، وجود الهالة الشفافة حول المستعمرة دليل على وجود نشاط إنزيم السيليلاز.

9. 2.II دراسة تأثير الفطريات و البكتيريا الداخلية على إنتاش و نمو بذور القمح

1.9. 2.II. معالجة بذور القمح بالفطريات والبكتيريا المعزولة

كدف دراسة تأثر هذه الأحياء الدقيقة على إنتاش وغو بذور قمح الصنف المحلي محمد بن بشير تم الاعتماد على الطريقة المتبعة من طرف (Mukhtar, 2008). حيث في أول مراحل التحربة تم تحضير المعلقات الفطرية و البكتيرية بتنمية كل منها على الوسط MEA في درجة حرارة 30 م حتى درجة التبوغ الجيد، بعدها تغمر بالماء المقطر المعقم وتكشط الأبواغ بلطف بواسطة ملعقة معقمة أين هذه الأبواغ تسترجع في أنابيب إحتبار ويثبت تركيزها عند 10 بوغة/مل ويضاف لها 2 % (وزن/حجم) من النشاء الذي يستعمل كملزج لتسهيل عملية تثبيت الأبواغ على سطح البذور. فيما يخص البذور فتم إختيار بذور سليمة من دون أي صدوع أو شقوق هذه الأخيرة تم تعرضها لعملية تعقيم السطح بغمرها لمدة 15 دقيقة في محلول هيبوكلوريت الصوديوم 1 % ثم تغسل ثلاثة مرات بالماء المقطر المعقم. غمرت البذور في المعلقات المحضرة كل على حدة مدة 1- 2 دقيقة كما استعمل شاهدين الأول بذور مغمورة في معلق النشاء و الثاني مغمورة في الماء المقطر المعقم، تترك العينات لتحف بعدها تزرع بمعدل 10 حبات على أطباق بتري بما طبقتين من ورق الترشيح واتمان المعقم و المشبع بالماء مع أخذ بعين الإعتبار 3 مكررات لكل معاملة ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة و20 م في الظلام لمدة 8 أيام أين يراقب يوميا عدد البذور المنتشة.

2.9. 2.11. تأثير الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية على إنتاش و نمو بذور القمح

في آخر مرحلة الحضن تم حساب نسبة الإنتاش حسب (Mukhtar, 2008) وفقا للعلاقة التالة.

Germinat

كما تم حساب الوزن الرطب لكل من السوقيات والجذور الناتجة و حساب معدلات طول السوقيات والجذور الناتجة و حساب معدلات طول السوقيات والجذور بمدف حساب مؤشر قوة نمو البادرات (Taskin et al., 2008) Vigor Index (VI) وفقا للعلاقة التالية:

$$\sim$$
 VI = (PL + RL) × GP

Vigor Index :VI مؤشر نمو البادرات.

Plumule Length :PL طول السوقيات الناشئة.

Roots Length :RL طول الجذور.

Germination Percentage :GP نسبة الإنتاش.

3.9. 2.II إمكانية إنتاج أندول حمض الأستيك (Indole acetic acid (IAA))

العزلات التي شهدت نتيجة إيجابية فيما يخص تأثيرها على نمو نبات القمح مقارنة بالنسبة إلى الشاهد اختبرت من حيث إمكانية إنتاجها للهرمون IAA حسب (Khamna et al., 2010). نميت العزلات على الوسط السائل الوسط الصلب YMA بعدها قرص بقطر 8 ملم من كل عينة تزرع على إنفراد على 5 مل الوسط السائل Yeast Malt Extract Broth (YMB) مضاف إليه L-tryptophan بتركيز 2 مغ/مل، هذه المزارع تحضن في درجة حرارة 300م لمدة 7 أيام بعدها فصل المسليوم عن الرشاحات بعملية الطرد المركزي 8000 دورة/دقيقة، Salkowski و لغرض الكشف من وجود IAA تم مزج 1 مل من الرشاحة لكل عينة مع 2 ملم من كاشف Salkowski المتكون من 15مل محلول (0.5M) و 30 مل من 42 مل من الرشاحة لكل عينة مع 2 ملم عن الرشاحة لكل على وجود IAA في الرشاحة.

A.9. 2.II إختبار إمكانية إذابة الفوسفات (Phosphate Solubilization)

تم إختبار إمكانية إذابة الفوسفات الغير قابل للذوبان من طرف العزلات البكتيرية بالاعتماد على طريقة (Soltani et al., 2010). زرعت كل من الفطريات و البكتيريا على سطح مركز أطباق بتري الحاوية على

الوسط الصلب المعقم (PKV) Pikovskaya (PKV) ثم الحضن في درجة حرارة 30 °م مدة 8 أيام، المنطقة الشفافة حول المستعمرات دليل على إذابة الفوسفات في حين باقى الوسط يبقى بلون أبيض.

(Ammonia Production (NH3)) إنتاج الأمونيا 5.9. 2.II

إنتاج الأمونيا لدى العزلات تم حسب طريقة (Ahmad et al., 2008). إذ نميت العزلات في أنابيب الحتبار تحتوي على الماء البيبتوني مدة 48 ساعة في درجة حرارة 30 °م، بعدها يتم إضافة 0.5 مل من كاشف اختبار تحتوي على الماء البيبتوني مدة 48 ساعة في درجة حرارة 30 المونيا يستدل علية بتحول اللون البني للوسط السائل إلى اللون الأصفر.

10. 2.II. التحليلات الإحصائية

يعبر عن القيم المحصل عليها بالمتوسط الحسابي (M) \pm الانحراف المعياري (SD)، حللت النتائج إحصائيا \pm Student- عن طريق اختبار SAS/STAT® 9.2 باستعمال (two-way ANOVA) المتبوع باختبار \pm Newman-keuls multip-rang test مناطق التثبيط بين مستخلصات العزلات.

(one-way ANOVA) المتبوع باختبار Student-Newman-keuls multip-rang test للمقارنة بين:

- ✓ المستخلصات و الشواهد بالنسبة للنشاطية المضادة للأكسدة.
- ✓ للمقارنة بين هالات الناتجة عن النشاطية الإنزيمية من طرف العزلات.
- ✓ للمقارنة بين (طول و وزن كل من الجذور و السويقات و نسبة الإنتاش) بالنسبة للبذور المعاملة
 بالعزلات و الشواهد.

حيث اعتبر الفرق إحصائيا ذو معنى عند الدلالة 5 % أي أن معامل التحديد (P < 0.05).

النتائج و المناقشة _____

الفصل III

النتائج والمناقشة

1.III.عزل الفطريات و البكتيريا الخيطية

لم يتم تسجيل أي حالة نمو للفطريات و لا للبكتيريا على أوساط الزرع دلالة على فعالية عملية تعقيم السطح بعد أن تمت بالطريقتين المذكورتين و بعد الحضن و المراقبة. من خلال هذه النتائج يمكن اعتبار المراحل المتبعة في عملية التعقيم كافية للتخلص من الميكروبات السطحية (Epiphytes) و كذا الأبواغ المنتجة من طرف الفطريات و البكتيريا الخيطية السطحية وأن العزلات المتحصل عليها يمكن اعتبارها كائنات حية دقيقة داخلية (Coombs et Franco, 2003a).

تم الحصول من إجمالي 100 قطعة مقسمة بين الأوراق و الجذور على 43 عزلة منها 23 عزلة بكتيرية و 18 فطرية (الجدول 1).

و أوراق نبات القمح*.	ني عينات جذور	ِ معدل الإستيطان في	معدل العزل و	01: عدد العزلات و	الجدول
----------------------	---------------	---------------------	--------------	-------------------	--------

	Organs of Wheat plant					
	Leaves			Roots		
Endophytes	Number of isolates	Isolation rate	Colonization rate (%)	Number of isolates	Isolation rate	Colonization rate (%)
Endophytic fungi	8	0.32	24	12	0.48	32
Endophytic actinomycetes	7	0.28	20	16	0.64	48

^{*} خمسة نبتات من كل نبتة أخذت 5 قطع من الأوراق و 5 قطع من الجذور.

تظهر النتائج أن كل من عدد العزلات الفطرية و البكتيرية المعزولة و معدلات الإستيطان و العزل كانت الظهر النتائج أن كل من عدد العزلات الفطرية و البكتيرية المعزولة و معدل إستيطان 48 % أكبر في الجذور مقارنة مع الأوراق، حيث تم الحصول على 16 عزلات بكتيرية بمعدل إستيطان وعزل 20 % و معدل عزل 0.64 أما من الأوراق فتم الحصول على 12 فطرا من الجذور بمعدل إستيطان وعزل 32 % و 0.28 على الترتيب، أما الأوراق فتم عزل 8 عزلات بمعدل إستيطان 24 % و معدل عزل 32 0.30.

أكدت هذه الدراسة احتواء نبات القمح على العديد من الفطريات و البكتيريا الخيطية . النتائج المتحصل عليها تتوافق مع عدة أبحاث إذ تم عزل الفطريات و البكتيريا الخيطية من مختلف نباتات المحاصيل (Pimentel et al., 2006) و فول الصويا (Naik et al., 2009; Tian et al., 2004) و بذور و جذور و أوراق و سيقان نبات القمح (Naik et al., 2003a; Coombs et Franco, 2003a; Coombs et Franco, 2003b; Larran et al., 2007; Sieber et al., 1988).

عدد العزلات ومعدلات الإستيطان و العزل المتحصل عليها كانت مختلفة حيث كانت أكبر في الجذور مقارنة بالأوراق والذي حسب Gong (2009) فإن هذه المعايير تتأثر بالنوع النباتي المدروس و أوساط العزل و كذا عدد القطع المستعملة. أشارت إلى هذا الاختلاف عدة أبحاث في جذور و أوراق و سيقان نبات القمح (Larran et al., 2007; Sieber et al., 1988)، حذور و أوراق الأرز (Larran et al., 2007; Sieber et al., 1988) et al., 2004). و كذا جذور و أوراق و سيقان و أزهار عدة أنواع من النباتات الطبية (et al., 2004). 2010; Lv et al., 2010). يعزى هذا الإختلاف إلى إبداء بعض الأجناس نوع من التفضيل أو التخصص اتجاه نسيج عضو نباتي ما بسبب قدرة هذه الأجناس على إستهلاك و النمو على مادة محددة في تلك الأنسجة (Huang et al., 2008; Photita et al., 2001)، و بالتالي التأقلم مع الشروط الفيزيولوجية و الإيكولوجية داخل نسيج العضو المعطى (Larran et al., 2007). من جهة أخرى قد يعزى إلى الطبيعة الكيميائية المكونة للطبقات الخارجية لنسيج النبات وقدرة هذه الأحياء الدقيقة على احتراقها، فحسب Petrini (1992) فإن إستيطان الأنسجة الداخلية للعائل من طرف هذه الأحياء الدقيقة يعتمد على الإختراق الناجح لطبقات القشرة الواقية للنباتات و الذي يمكن أن يكون عن طريق ميكانيكي أو الهدم الإنزيمي لمركبات هذه الطبقات. كما أن تواجد البكتيريا الخيطية بنسبة أكبر في الجذور يمكن أن يكون له علاقة بكونها

تمثل قسم كبير من فلورا التربة مما يسهل عملية عدوى جذور العائل عبر نتوءات وشقوق الجذور الفرعية وكذا العقيدات الجذرية (Coombs et Franco, 2003b; Hasegawa et al., 2006).

2.III. إختبار النشاط الأولي المضاد للبكتيريا و الفطريات الممرضة من طرف العزلات المعزولة

يهدف هذا الإختبار إلى انتقاء العزلات ذات النشاط الضد مكروبي من بين العزلات الإجمالية المتحصل عليها و الذي تم عن طريق المزارع المزدوجة (الجدول 2).

الجدول 02: مناطق تثبيط نمو الأنواع البكتيرية الممرضة بواسطة البكتيريا الخيطية بطريقة المزارع المزدوجة.

_		Inhibition Zones (mm)	
Pathogenic Bacteria		Actinomycetes Isolates	
	Isolate 16N	Isolate 3B	Isolate 17B
Bacillus sp.	4	15	14
Staphylococcus aureus	6	6	7
Enterococcus faecalis	7	13	13
Salmonella typhimurium	8	8	6
Escherichia coli	22	23	15
Pseudomonas aeruginosa	14	7	12
klebsiella pneumoniae	8	7	00

Inhibition Zones (mm): تمثل مسافة تثبيط النمو بين البكتيريا الخيطية المعزولة و البكتيريا الممرضة.

تشير النتائج المتحصل عليها على أنه من بين 23 عزلة بكتيرية خيطية تم الحصول على 3 عزلات لها نشاط ضد بكتيري على مجموعة واسعة من الأنواع البكتيرية المستعملة، حيث العزلة 16N شهدت نشاطية ضد مكروبيه على جميع الأنواع البكتيرية و تراوحت مناطق التثبيط من 4 إلى 22 ملم أكبرها كان على البكتيريا Escherichia coli أما العزلة 3B فسجلت مناطق تثبيط بين 7 إلى 23 ملم أكبرها على البكتيريا Escherichia coli فسجلت من 6 إلى 15 ملم وكانت البكتيريا Escherichia coli فسجلت من 6 إلى 15 ملم وكانت البكتيريا A تشيطي على العزلة 8 المله في حين لم تسجل أي نشاط تثبيطي على pneumoniae .

نتائج إختبار النشاط الضد فطري للبكتيريا و الفطريات المعزولة موضحة بنسب التثبيط في (الجدول 03).

الجدول 03: نسبة تثبيط نمو الفطريات بواسطة الفطريات و البكتيريا الداخلية المعزولة بطريقة المزارع المزدوجة.

T	Inhibition percentage (%)			
Isolates	Phytophtora infestans spp.	Fusarium oxysporium F.sp .albidinis		
C3B	8,11	11,11		
C4B	5,41	44,44		
24	21,62	63,89		
39	45,95	16,67		
38	29,73	52,78		
17N	5,42	16,67		
C1B	0,00	58,33		
16N	42,96	45,00		
3B	51,85	43,33		
17B	54,07	7,50		

(%) Inhibition percentage: تمثل نسبة قطر الفطر المختبر في المزرعة المزدوجة \ قطر نفس الفطر في الطبق الشاهد.

تم تسجيل 10 عزلات لها نشاطية ضد فطرية من بين 43 عزلة من بينها 7 عزلات فطرية و 3 عزلات بكتيرية أي بنسبة 23 % من إجمالي العزلات، هذه الأخيرة شهدت نسب تثبيط مختلفة على كل من الفطرين للمرضين أين تراوحت نسب التثبيط على الفطر .Phytophtora infestans spp. بين 5.42 % إلى 54.07 % الممرضين أين تراوحت نسب التثبيط على الفطر 3B و 17N تليها العزلات المحتيرية 3D من العزلات المحتيرية 3D من طرف العزلة 3D بكتيرية 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيطية من طرف العزلة 17B إلى 63.89 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1880 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 17B إلى 1890 % كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 18B كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 18B كأعلى نسبة تثبيط كأعلى نسبة تثبيط من طرف العزلة 18B كأعلى نسبة تثبيط كأعلى كأع

إن وجود الفطريات و البكتيريا الخيطية داخل أنسجة النباتات السليمة يوحي إلى وجود علاقة وثيقة بين هذه الأحياء الدقيقة و أنسجة عائلها، إذ تكمن أهميتها في إنتاج المستقلبات المنظمة لنمو النبات وحمايتة من الكائنات الحية الدقيقة الممرضة (Araújo et al., 2000; Inderiati et Muliani, 2008)، ومن جهة أخرى معروف جدا أن الفطريات و البكتيريا الداخلية للنباتات على أنها مصدر للمستقلبات الثانوية النشطة يولوجيا و ذات الأهمية الزراعية و الصيدلانية (Gong et al., 2009; Inderiati et Muliani, 2008; Kwon بيولوجيا و ذات الأهمية الزراعية و الصيدلانية (Gong et al., 2009; Inderiati et Muliani, 2008; Kwon)

et al., 2007) و نشاطيتها الضد ميكروبيه و عوامل مقاومة بيولوجية ضد الفطريات الممرضة للنباتات (Ghadin et al., 2008; Nedialkova et Naidenova, 2005; Quecine et al., 2008)

من خلال النتائج المتحصل عليها فإن عدد من العزلات الفطرية و البكتيرية المعزولة تملك نشاطية ضد ميكروبيه على الأقل على بكتيريا أو فطر ممرض واحد وهذا ما تم إثباته في عدة دراسات سابقة بطريقة المزارع المزدوجة. حيث وجد أن كل من بعض الفطريات و البكتيريا الخيطية المعزولة من بعض النباتات الطبية تملك نشاطية ضد فطرية و بكتيرية (Ghadin et al., 2008; Jalgaonwala et al., 2010) ما يوافق النتائج المتحصل عليها (الجدول 2 و 3). كل من بعض الفطريات والبكتيريا الخيطية المعزولة من الأرز لها نشاطية ضد فطرية ضد الفطريات الممرضة للنباتات (Naik et al., 2009; Tian et al., 2004). في حين أن بعض الفطريات المعزولة من أوراق و جذور نبتة Taraxacum coreanum Nakai ذات الاستعمال الطبي و جدت أنها تملك نشاطية ضد فطرية (Paul et al., 2006). أما 52 % من عزلات البكتيريا الخيطية المعزولة أيضا من بعض نبتات الغابات الماطرة الطبية تملك نشاطية ضد بكتيرية على الأقل على بكتيريا ممرضة مختبرة من بينها عزلتين لها مجال واسع من البكتيريا التي لها نشاط تثبيطي عليها (Qin et al., 2009b) وهذا ما يوافق النتائج المتحصل عليها عند العزلات البكتيرية الخيطية الثلاث 16N، 3B و 17B (الجدول 2). و لما كانت الفطريات تمثل مصدر للمستقلبات و المركبات ذات النشاط البيولوجي المضاد للميكروبات (Naik et al., 2009; Paul et al., 2007). يعزي وجود النشاط المثبط للنمو من طرف البكتيريا و الفطريات الداخلية المعزولة على الفطريات و البكتيريا الممرضة المختبرة بواسطة المزارع المزدوجة إلى إمكانية إنتاج هذه العزلات لمركبات ذات نشاط بيولوجي مثبط لنمو الكائنات الممرضة في أوساط الزرع (Naik et al., 2009).

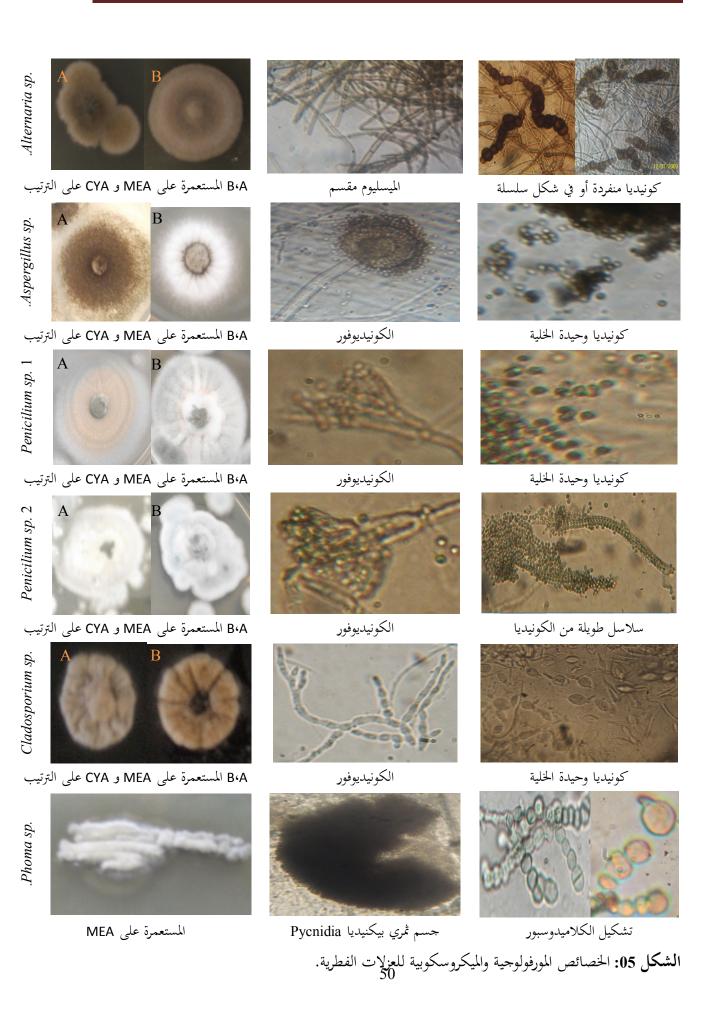
3.III. تشخيص الفطريات و البكتيريا الخيطية المعزولة

بعد دراسة الخصائص المورفولوجية و الميكروسكوبية لكل من الفطريات النشطة تم الحصول على النتائج التالية (الجدول 4 و الشكل 5).

الجدول 04: الخصائص المورفولوجية والميكروسكوبية للعزلات الفطرية بعد الحضن على أوساط مختلفة لمدة سبعة أيام في درجة حرارة 26 °م.

الخصائص					
الخصائص الميكروسكوبية	الخصائص المورفولوجية للمستعمرة	العزلات			
- الهيفا مقسمة، إنتاج أجسام ثمرية					
Perithicia بعد 11يوم، كبيرة الحجم	– نمو سريع، قطنية، ذات لون أبيض في				
دائرية سوداء و محاطة بميفات سميكة سوداء	البداية ثم يتحول إلى اللون الرمادي، تكون	(17N)			
بما فتحة تحرر منها أكياس بوغية الحاوية	البداية م يتحول إلى اللول الرسادي، فالول أقل كثافة على الوسط MEA.	(17N)			
على أبواغ كيسية دائرية الشكل بنية إلى	NILA DIE SIE HOLL				
زيتية اللون.					
- الهيفا مقسمة بنية اللون، ذات حامل	- نمو سريع من 40 إلى 50 ملم على كل من				
كونيدي مقسم بني، مشكلة لكونيديا بنية	MEA و CYA. بيضاء إلى بنية رمادية ذات	(C2D)			
اللون إيجاصية الشكل و مقسمة طوليا و	حواف فاتحة، صوفية. خضراء زيتية على	(C3B)			
عرضيا في شكل سلاسل أو منفردة.	PDA و صوفية.				
– الهيفا مقسمة بنية إلى شفافة ينشأ منها	- نمو سريع من 35 إلى 50 ملم على كل				
حامل أبواغ طويل غير متفرع و ينتهي	من CYA MEA . بيضاء مجعدة سطحية				
بانتفاخ كروي محاط كليا بصف من	على CYA شعاعيه الأطراف. سوداء المركز	(38)			
Mutulae التي تحمل عليها Mutulae	بيضاء الحواف و مسطحة غبارية على الوسط	(38)			
قارورية الشكل و التي تحمل بدورها سلاسل	·MEA				
من الكونيديا سوداء اللون دائرية الشكل.					

- الهيفا مقسمة ذات لون أخضر فاتح إلى	- نمو سريع من 34 إلى 44 ملم على كل من	
شفافة،حامل الكونيديا غير متفرع، وجود	CYA و MEA. بيضاء المركز و رمادية	
كل من Mutulae و Phialides قارورية	مزرقة على الحواف، مخملية مسطحة على	(2.4)
الشكل تحمل سلاسل متوسطة الطول من	CYA. برتقالية بنية في المركز مع حواف	(24)
الكونيديا. الكونيديا وحيدة دائرية الشكل	خضراء مزرقة، غبارية مسطحة على MEA.	
شفافة إلى خضراء فاتحة.		
- الهيفا مقسمة شفافة، حامل الكونيديا	– نمو معتدل من 18 إلى 32 على كل من	
غیر متفرع، وجود کل من Mutulae،	CYA و MEA. بيضاء مزرقة، كثيفة ،	
Phialides قارورية الشكل تحمل سلاسل	مخملية و مسطحة على الوسط CYA. بيضاء	(39)
طويلة من الكونيديا. الكونيديا وحيدة	مسمرة مخملية مسطحة على الوسط MEA.	
دائرية الشكل شفافة إلى خضراء فاتحة.		
- الهيفا مقسمة بنية زيتية، الحامل الكوندي	- النمو متوسط بين 28 و 25 على كل من	
قائم مقسم قليل التفرع و الالتواء.	CYA و MEA.بنية فاتحة في المركز إلي	
الكونيديا يتم إنتاجها في شكل سلال	بيضاء على الحواف على CYA. سمراء	
متفرعة طرفية بما احتناقات واضحة،	مخضرة مع وجود آثار مسليوم أبيض. غبارية	(C4B)
تنفصل الكونيديا إلى خلايا منفردة بيضاوية	مجعدة و كثيفة على كل من الوسطين.	
الشكل و بنية زيتية اللون.		
 الهيفا مقسمة سمراء مخضرة، إنتاج الجسم 	- نمو سريع، مسطحة، ناعمة، منغرسة في	
الثمري Pycnidia كبيرة الحجم دائرية	الآجار ، رمادية إلى زيتية اللون .	
سوداء بما فتحة تطرح عبرها الكونيديا		
أسطوانية الشكل، مشكلة للكلاميدوسبور		(C1B)
على الوسط PDA في شكل سلسلة أو		
فردية غير منتظمة الشكل.		



بالاعتماد على الخصائص المزرعية و الميكروسكوبية و البيوكيميائية لعزلات البكتيريا الخيطية تم الحصول على النتائج التالية (الجدول 5 و 6).

الجدول 05: المظهر المورفولوجي لعزلات البكتيريا الخيطية النشطة.

الأوساط						
	ISP4			ISP2		العزلات
مادة المسليوم	مسليوم هوائي	مظهرالمستعمرة	مادة المسليوم	مسليوم هوائي	مظهر المستعمرة	
بني فاتح	أبيض	غبارية	أصفر فاتح	أبيض	غبارية	16N
بني داكن	أبيض	غبارية	أسمر	رماد <i>ي</i>	غبارية	3B
بني م خضر	رمادي مخضر	غبارية	بني فاتح	رمادي مخضر	غبارية	17B

.International Streptomyces Project :ISP

الجدول 06: الخصائص الميكروسكوبية و البيوكيميائية لعزلات البكتيريا الخيطية النشطة.

	العزلات			
17B	<u>3B</u>	16N	الخصائص	
غير مقسم	غير مقسم	غير مقسم	مادة المسليوم	
لولبية طويلة	حلزونية متوسطة الطول	حلزونية متوسطة الطول	طبيعة سلاسل الأبواغ	
-	+	-	إنتاج الصباغ المنتشرة	
-	-	-	إنتاج صبغة الميلانويد	
+	+	+	تلوين غرام	
+	+	+	الكتالاز	
-	-	-	ZH	
-	-	-	MZH	
ساكنة	ساكنة	ساكنة	الحركة	
هوائية	هوائية	هوائية	نمط التنفس	

. (-) إختبار سالب،(+) إختبار موجب. (-) Modified Ziehl-neelsen stain:MZH ،Ziehl-Neelson stain :ZH

من حلال النتائج المتحصل عليها وجدنا أن كل العزلات الثلاثة تظهر بعد 2 إلى 3 أيام من الحضن وتكون شمعية، بعد 14 يوم من الحضن تعطي مستعمرات دائرية غبارية ذات ألوان مختلفة (أبيض، رمادي أو رمادي مخضر) مع تشكيل المسليوم الهوائي. وبعد 21 يوم من الحضن تأخذ مادة المسليوم لونما النهائي (أسمر، بني، بني فاتح، أصفر فاتح أو بني مخضر). بالنسبة للصباغ المنتشرة فلم تسجل إلا عند العزلة 3B لكن بدرجة قليلة، أما صبغة الميلانويد فكانت كل العزلات غير منتجة لها. المعاينة المجهرية للعزلات بالمجهر الضوئي بين أن كل العزلات لها مادة مسليوم غير مجزأ و مسليوم هوائي و كلاهما غزير التفرع لكن بدرجة أقل لدى العزلة 17B مع وجود سلاسل حاملة للأبواغ تكون حلزونية و متوسطة الطول لدي العزلة و سالبة تلوين أما العزلة الكافرية و ماليقة غير متحركة. Modified Ziehl-neelsen Stain و Neelson Stain

دراسة كل من الخصائص المورفولوجية و الميكروسكوبية لكل من العزلات الفطرية التي أظهرت نشاط ضد كروبي أولي و مقارنة النتائج المحصل عليها إلى مفاتيح التشخيص (; 1995 Ret J. I. and Hocking A. D. 1995) بيّن أنه من مجمل السبع فطريات المشخصة خمسة منها (Botton B et al, 1990; Champion R, 1997) و المستحصة المستح

دراسة الخصائص المورفولوجية و المظهرية و الميكروسكوبية (مادة المسليوم مقسمة أم لا و لونها، وجود المسليوم الهوائي ولونه، مورفولوجية سلاسل الأبواغ و إنتاج الأصبغة) إضافة إلى تلوين غرام و الكتالاز و مقاومة الأحماض و الكحولات هي خصائص واسعة الإنتشار للتعرف على أجناس البكتيريا الخيطية و مقاومة الأحماض و الكحولات مي خصائص واسعة الإنتشار للتعرف على أجناس البكتيريا الخيطية إنطلاقا من الخصائص (Taddei et al., 2006)

المورفولوجية بملاحظة بسيطة بالمجهر الضوئي (Zaitlin et al., 2003)، كذلك هو الحال فيما يخص المورفولوجية بملاحظة بسيطة بالمجهر الذين توصلوا إلى التعرف عليها من خلال ملاحظة سلاسل الأبواغ Balagurunathan و آخرون (1996) الذين توصلوا إلى التعرف عليها من خلال ملاحظة سلاسل الأبواغ بالمجهر الضوئي.

فمن حلال المظهر المورفولوجي و الميكروسكوبي كانت العزلات تتميز بمستعمرة دائرية الشكل مغمسة في الآجار و غبارية، لها مادة مسليوم متفرع غير مقسم و مسليوم هوائي متفرع، ذات ألوان تختلف باختلاف وسط الزرع و مشكلة لسلاسل أبواغ طويلة حلزونية أو لولبية. هذه الصفات هي من خصائص جنس Arifuzzaman et al., 2010; Myadoh et al., 2002; Saurav et) Streptomyces الستربتومايس Kannabiran, 2010; في متحركة و موجبة الغرام، هوائية و غير متحركة و موجبة الكتالاز و غير مقاومة للأحماض و الكحولات، هذه الميزات تعد أيضا من خصائص جنس Charmaraj et). إضافة إلى الكتالاز و غير مقاومة للأحماض و الكحولات، هذه الميزات تعد أيضا من خصائص جنس (Dharmaraj et) Dhevendaran, 2010; Lee et al., 2005; Saurav et Kannabiran, 2010 كذلك يمكن لبعض أنواع هذا الجنس أن يكون منتج أو غير منتج للأصبغة الملونة و أصبغة الميلانويد (al., 2009; Dharmaraj et Dhevendaran, 2010; Li, 1997; Vijayakuman et al., 2010 و على هذا الأساس تم اعتيار العزلات الثلاث على أنها تنتمي إلى جنس . Streptomyces sp.

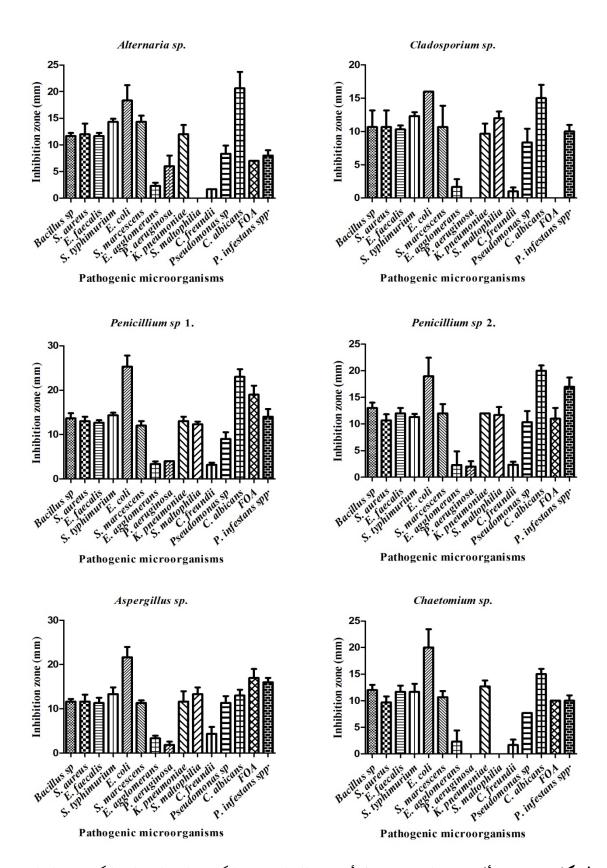
الأجناس الفطرية و البكتيرية المتحصل عليها هي أجناس داخلية شائعة العزل من العديد من النباتات (Márquez et al., 2007; Schulz et Boyle, 2005)، إذ تم عزل كل من أجناس Aspergillus، إذ تم عزل كل من أجناس (Márquez et al., 2007; Schulz et Boyle, 2005) و Chaetomium ، Cladosporium ، Penicilium ، Alterernaria من طرف (Arifuzzaman et al., 2010; Larran et al., 2002; Larran et al., 2007). فول الصويا (Pimentel et al., 2006) (Glycine max L. Merril). أهم جنس للبكتيريا الخيطية المعزول من ألقمح اللين هو Conn et Franco, 2004; Coombs et Franco, 2003a) Streptomyces في حين تم

عزل كل من هذه الأجناس الفطرية و البكتيرية من الأرز(. Naik et al., 2009; Tian et Oryza sativa L. عزل كل من هذه الأجناس الفطرية و البكتيرية من الأرز(. (al., 2004).

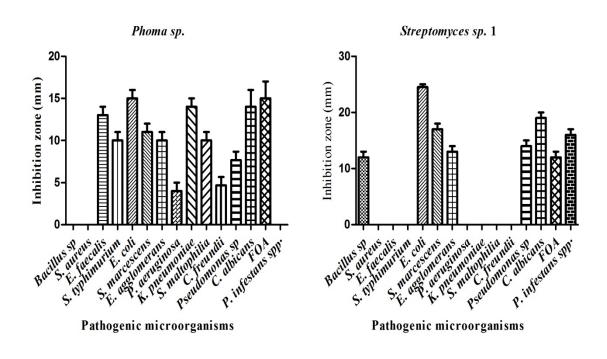
عزل هذه الفطريات و البكتيريا الخيطية من الأنسجة السليمة لنبات القمح يوحي بأن العائل قد يستمد بعض الفوائد من الفطريات و البكتيريا التي يأويها، و يتعلق الأمر خاصة بإنتاج المستقلبات الثانوية ذات النشاط الضد بكتيري و الفطري و المستقلبات التي لها دور في تعزيز نمو النبات (,Coombs et Franco).

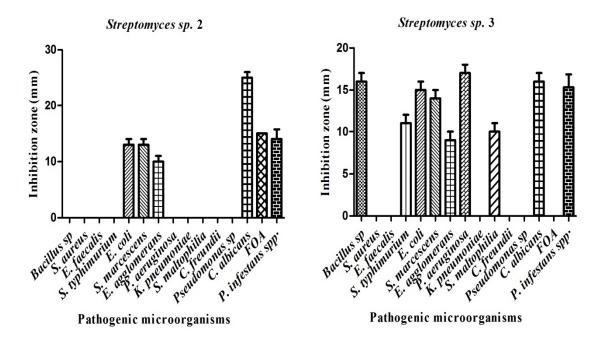
4.III. دراسة النشاطية الضد ميكروبيه لمستخلصات العزلات

بعد إحتبار النشاطية الضد مكروبيه لكل من مستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم (طريقة أقراص الانتشار على سطح الآجار) للعزلات الفطرية و البكتيرية التي أظهرت نشاط ضد مكروبي أولي سجلنا أن كل المستخلصات لها نشاطية ضد مكروبيه على الأقل على كائن حي ممرض واحد أو أكثر إذ اختلفت مناطق التثبيط باختلاف الكائن الحي الدقيق الممرض و مصدر المستخلص (العزلات الداخلية الفطرية أو البكتيرية المعزولة) و كذا نوع المذيب المستعمل في استخلاص المستقلبات الثانوية. حيث تراوحت مناطق التثبيط من 7 إلى 25 ملم، أكبر منطقة تثبيط سجلت من مستخلصات الإيثيل أسيتات (24.5-25 ملم) على Serratia من طرف Streptomyces sp.1 و Penicilium sp. 1 على التوالي تليها Serratia على التوالي تليها الخميرة «Streptomyces sp.1 من طرف (Streptomyces sp.1 في حين أكبر نشاطية تثبيط عالية على الخميرة من طرف 20-23 ملم) من طرف Streptomyces sp.2 في حين أكبر نشاطية تثبيطية من طرف مستخلصات الكلوروفورم كانت على البكتيريا . Chaetomium sp و الشكل من مستخلصات على الترتيب من طرف الفطر . Chaetomium sp. نتائج النشاطية الضد ميكروبيه لكل من مستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم موضحة في (الشكل 6 و 7) ، (الشكل 16 الملحق 3) و (الشكل 8).



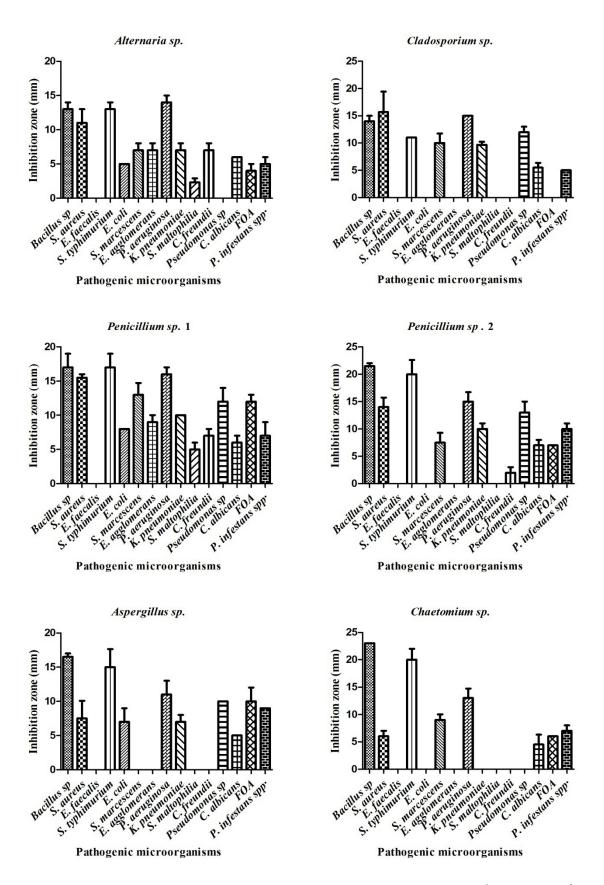
الشكل06: نتائج تأثير مستخلصات الإيثيل أسيتات للفطريات و البكتيريا الداخلية على البكتيريا و الفطريات المرضة.



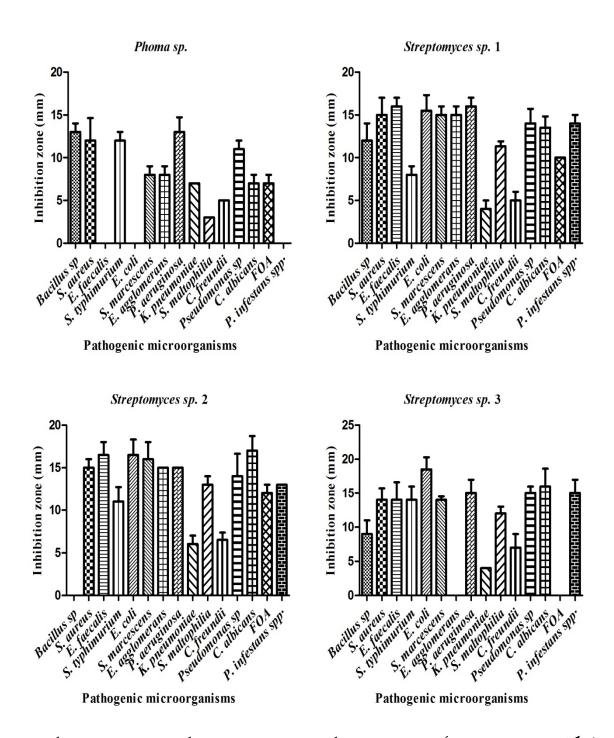


الشكل06 (تابع): نتائج تأثير مستخلصات الإيثيل أسيتات للفطريات و البكتيريا الداخلية على البكتيريا و الفطريات الممرضة.

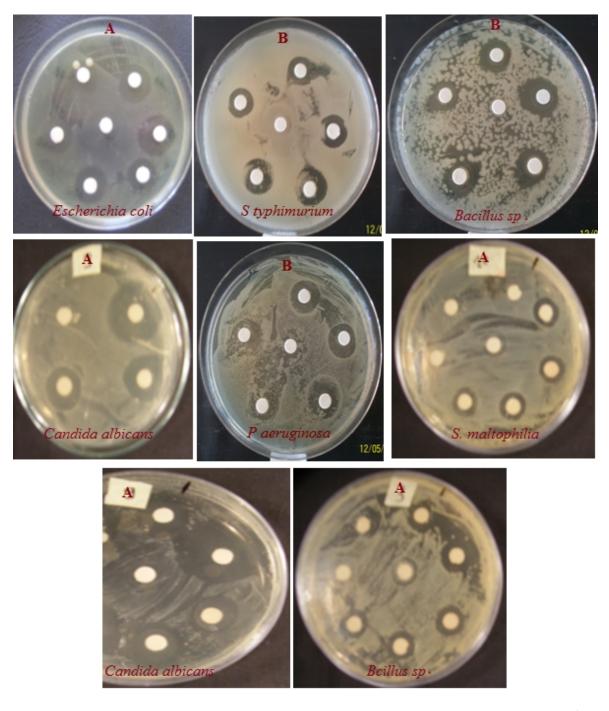
Salmonella typhimurium ، Enterococcus faecalis ، Staphylococcus aureus ، Bcillus sp. ، Pseudomonas aeruginosa ، Enterobacter agglomerans ، Serratia marcescens ، Escherichia coli ، pseudomonas sp. ، Citrobacter freundii ، Stenotrophomonas maltophilia ، klebsiella pneumoniae . Phytophtora infestans spp. . ، Fusarium oxysporium F.sp . albidinis · Candida albicans الأعمدة ممثلة بالمتوسط الحسابي لثلاث مكررات ±الإنحراف المعياري (M±SD).



الشكل 07: نتائج تأثير مستخلصات الكلوروفورم للفطريات و البكتيريا الداخلية على البكتيريا و الفطريات المرضة.



الشكل07 (تابع): نتائج تأثير مستخلصات الكلوروفورم للفطريات و البكتيريا الداخلية على البكتيريا و الفطريات الممرضة.



الشكل 08: نتائج تأثير مستخلصات الإيثيل أسيتات (A) و الكلوروفورم (B) للفطريات و البكتيريا الداخلية على بعض الأنواع البكتيرية الممرضة.

(Stenotrophomonas maltophilia) S. maltophilia (Pseudomonas aerugenosa) P. aeruginosa .(Salmonella typhimirium) S typhimurium

بهدف معرفة أي المستخلصات ذات النشاط الواسع و أي الكائنات الممرضة أكثر حساسية قمنا بإجراء تحليل تغير مناطق التثبيط لمستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم.

بعد إجراء تحليل تغير مناطق تثبيط النمو لمستخلصات الإيثيل أسيتات لمختلف العزلات الفطرية و البكتيرية و مدى فعالية تأثيرها على نمو البكتيريا و الفطريات الممرضة سجلنا وجود فرق معنوي بين المستخلصات عند (P<0.05) في مدى تأثيرها على نمو نفس المجموعة الممرضة (بكتيريا غرام سالبة أو غرام موجبة أو فطريات) من جهة، و من جهة أخرى وجود فرق معنوي فيما بينها في مدى تأثيرها على كل المحموعات الممرضة معا. مقارنة متوسطات مناطق التثبيط موضحة في (الجدول 07).

الجدول 07: مقارنة متوسطات مناطق التثبيط لمستخلصات الإيثيل أسيتات للفطريات و البكتيريا الداخلية و تأثيرها على الفطريات و البكتيريا المختبرة.

Ethyl agetete		Inhibition Zor	nes (mm) (mean)				
Ethyl acetate extacts	Test micro-organisms						
extacts	G Bacteria	G ⁺ Bacteria	Fungi	All			
Alternaria sp.	8.704 ^a	11.778 ^a	11.889 ^{cb}	9.956 ^{ab}			
Cladosporium sp.	9.075 ^a	10.556 ^a	8.333 °	9.223 cab			
Penicilium sp. 1	10.741 ^a	13.111 ^a	18.667 a	12.800 ^a			
Penicilium sp. 2	9.223 ^a	11.889 ^a	16.00 ab	11.112 ab			
Aspergillus sp.	10.241 ^a	11.556 ^a	15.333 ab	11.523 ab			
Chaetomium sp.	7.408 ^a	11.111 ^a	11.667 ^{cb}	9.000 ^{cb}			
Phoma sp.	9.593 ^a	4.333 ^b	9.667 °	8.556 cb			
Streptomyces sp.1	7.611 ^a	$4.000^{\rm b}$	15.667 ^{ab}	8.500 ^{cb}			
Streptomyces sp.2	4.000 ^b	$0.000^{\rm c}$	18.000 ^a	6.000 ^c			
Streptomyces sp.3	8.481 ^a	5.333 ^b	10.444 ^{cb}	8.244 ^c			

(mean): متوسط مناطق التثبيط لكل عزلة على مجموعة الانواع البكتيرية 'G+ 'G أو الفطرية المحتبرة.

.Fungi, G⁺, G⁻:All

كل قيمة من الجدول متبوعة بحروف مشتركة لا يوجد فرق معنوي عند (P<0.05).

تبين النتائج أن كل مستخلصات الإيثيل أسيتات لها تقريبا نفس التأثير على البكتيريا سالبة الغرام حيث سحّلت أكبر فعالية تثبيط من طرف Penicilium sp. 1 و بمتوسط تثبيط (10.741 ملم و 10.241 ملم) على الترتيب. في حين أن كل من Penicilium sp. 1 و Penicilium sp. 2 هي الأكثر فعالية على البكتيريا

موجبة الغرام بمتوسط تثبيط (11.181ملم و 11.889ملم) على الترتيب. من جهة أخرى عدد العزلات التي لها على موجبة الغرام بمتوسط تثبيط كان أكبر فقد تم تسجيل كل من Penicilium sp. 1 و Streptomyces sp.2 و كان متوسط التثبيط عندهما إذ وصل إلى (18 ملم) يليهما كل من Streptomyces sp.2 و كان متوسط تثبيط أكبر من (1ملم)، من جهة أخرى وجد أن كل من الم بحوسط تثبيط أكبر من (1ملم)، من جهة أخرى وجد أن كل من البكتيريا و Streptomyces sp. 2 و الفطريات إذ فاق متوسط تثبيطها الإجمالي (11ملم) بينما لوحظ أن عزلات سالبة و موجبة الغرام و الفطريات إذ فاق متوسط تثبيطها الإجمالي (11ملم) بينما لوحظ أن عزلات كانت أقل.

لغرض معرفة الأنواع الممرضة الأكثر حساسية لمستخلصات الإيثيل أسيتات قمنا بمقارنة متوسطات تثبيط النمو و مدى تأثرها بمذه المستخلصات (الجدول 8).

تبيّن من تحليل النتائج المتحصل عليها أنه يوجد فرق معنوي عند (P<0.05) في مدى تأثر وحساسية الأنواع المحتبرة بالمستخلصات. في مجموعة البكتيريا سالبة الغرام Escherichia coli هي الأكثر حساسية بمتوسط تثبيط إجمالي (19.093ملم) بينما Pseudomonas aeruginosa و Escherichia كانتا أكثر مقاومة. أما في المجموعة موجبة الغرام سجّل أن البكتيريا .Bacillus sp هي الأكثر تأثرا مقارمة بين الما الفطريات فكانت Candida albicans هي الأكثر حساسية (18.067ملم). المقارنة بين المجموعات الممرضة (بكتيريا سالبة الغرام و موجبة الغرام و الفطريات) دلت أن المجموعتين البكتيريتين أقل حساسية مقارنة بالفطريات التي كان متوسط تثبيطها الإجمالي (13.5667ملم).

الجدول 08: مقارنة متوسطات مناطق تثبيط نمو الفطريات و البكتيريا المختبرة و تأثرها بمستخلصات الإيثيل أسيتات للعينات المعزولة.

Tost miana anganisms	In	Inhibition Zones (mm) (mean)				
Test microorganisms	G Bacteria	G ⁺ Bacteria	Fungi	All		
Salmonella typhimurium	9.093 ^c			_		
Escherichia coli	19.204 ^a					
Serratia marcescens	12.444 ^b					
Enterobacter agglomeran	6.407 ^c					
Pseudomonas aeruginosa	1.981 ^d			8.5079 ^b		
klebsiella pneumoniae	9.444 ^c					
Stenotrophomonas maltophilia	6.593 ^c					
Citrobacter freundii	2.114 ^d					
pseudomonas sp.	8.706 ^c					
Bacillus sp.		10.0667 ^a				
Staphylococcus aureus		6.7667 ^b		8.3667 ^b		
Enterococcus faecalis		8.2667 ^{ab}				
Candida albicans			18.067 ^a			
Fusarium oxysporium F.sp .albidinis			10.600 ^b	13.5667 ^a		
Phytophtora infestans spp.			12.033 ^b			

(mean): متوسط مناطق تثبط كل نوع فطري أو بكتيريا مختبرة بواسطة جميع مستخلصات العزلات المعزولة.

.(P<0.05) کل قیمة من الجدول متبوعة بحروف مشترکة G^+ یوجد فرق معنوي عند (P<0.05).

تميزت مقارنة متوسطات مناطق التثبيط لمستخلصات الكلوروفورم بوجود فرق معنوي فيما بينها عند P<0.05) على البكتيريا سالبة الغرام و الفطريات بينما تؤثر بنفس الطريقة على البكتيريا موجبة الغرام، و من جهة أخرى وجود فرق معنوي فيما بينها في مدى تأثيرها على كل المجموعات الممرضة معا (الجدول P).

تشير النتائج المتحصل عليها على أن مستخلصات الكلوروفورم التي لها تأثير تثبيطي للنمو على كل من البكتيريا سالبة و موجبة الغرام و الفطريات هي مستخلصات العزلات الثلاثة لجنس Streptomyces و بفعالية أكبر من طرف العزلة 2 Streptomyces sp. 2 على البكتيريا سالبة الغرام بمتوسط تثبيط إجمالي (12.556ملم) و Streptomyces sp. 2 على البكتيريا موجبة الغرام و الفطريات (14.333ملم) و Streptomyces sp. 1 على

الفطريات (14.000ملم) تليها العزلة Streptomyces sp.3 التي كان تأثيرها متوسط على كل من البكتيريا سالبة و موجبة الغرام بمتوسط تثبيط إجمالي أكبر من 10ملم بينما بقية العزلات فكانت مستخلصاتها أقل حدة.

الجدول 09: مقارنة متوسطات مناطق التثبيط لمستخلصات الكلوروفورم و تأثيرها على الفطريات و البكتيريا المختبرة.

Chloroform	Inhibition Zones (mm) (mean)							
extacts	Test micro-organisms							
	G Bacteria	G Bacteria G Bacteria Fungi All						
Alternaria sp.	6.926 ^b	8.000 a	5.000 ^{cd}	6.756 ^c				
Cladosporium sp.	6.407 ^b	9.889 ^a	3.500 ^d	6.522 °				
Penicilium sp. 1	10.778 a	10.833 ^a	8.333 ^{cb}	10.300 ab				
Penicilium sp. 2	7.500 b	11.833 ^a	8.000 bcd	8.467 bc				
Aspergillus sp.	5.556 b	8.000^{a}	8.000 bcd	6.533 °				
Chaetomium sp.	4.667 b	9.667 ^a	5.833 ^{cd}	5.900 °				
Phoma sp.	7.444 ^b	8.333 ^a	4.667 ^{cd}	7.067 ^c				
Streptomyces sp.1	11.537 ^a	14.333 ^a	12.500 ^a	12.289 ^a				
Streptomyces sp.2	12.556 ^a	10.500 ^a	14.000 ^a	12.433 ^a				
Streptomyces sp.3	11.056 ^a	12.333 ^a	10.333 ^{ab}	11.167 ^{ab}				

(mean): متوسط مناطق التثبيط لكل عزلة على جميع أنواع المجموعة البكتيرية "G+ 'G- أو الفطرية الواحدة المختبرة.

.Fungi و G^+ و G^- :All

كل قيمة من الجدول متبوعة بحروف مشتركة لا يوجد فرق معنوي عند (P<0.05).

تبيّن من دراسة و تحليل النتائج للأنواع الممرضة و المجموعات (بكتيريا غرام سالبة أو غرام موجبة أو فطريات) أكثر حساسية لمستخلصات الكلوروفورم أنه وجود فرق معنوي عند (P<0.05) في مدى التأثّر والحساسية بين أنواع البكتيريا موجبة و سالبة الغرام في حين أن الأنواع الفطرية تتأثر بنفس الدرجة ولا يوجد فرق معنوي بينها (الجدول 10).

حيث سجل في مجموعة البكتيريا سالبة الغرام أن الأنواع البكتيرية الأكثر حساسية هي مجموعة البكتيريا سالبة الغرام أن الأنواع البكتيريا (14.222ملم) على التوالي، في aeruginosa و Salmonella typhimirium بمتوسط تثبيط إجمالي (14.222ملم) على التوالي، في حين أن بقية الأنواع الأخرى كانت أكثر مقاومة، أما مجموعة البكتيريا موجبة الغرام فكانت كل من

Bacillus sp. 8.7500 و Staphylococcus aureus هي الأكثر حساسية (13.900 و 13.900 على التوالي، أما الفطريات فكانت كلها أقل حساسية لمستخلصات الكلوروفورم إذ لم يتعد إجمالي متوسط التثبيط (8.7500 ملم). بينت المقارنة بين المجوعات الثلاث أن البكتيريا موجبة الغرام بصفة عامة هي الأكثر حساسية بمتوسط تثبيط عام (10.3722ملم) بينما سالبة الغرام و الفطريات تتأثر بنفس الدرجة إذ لم يتحاوز متوسط التثبيط (8ملم).

الجدول 10: مقارنة متوسطات مناطق تثبيط نمو الفطريات و البكتيريا المختبرة و تأثرها بمستخلصات الكلوروفورم للعينات المعزولة.

Test mione and mions	Inhibition Zones (mm) (mean)				
Test microorganisms	G ⁻ Bacteria	G ⁺ Bacteria	Fungi	All	
Salmonella typhimurium	12.583 ^a			8.4426 b	
Escherichia coli	5.778 ^{cd}				
Serratia marcescens	9.500 ^b				
Enterobacter agglomeran	$6.000^{\text{ cd}}$				
Pseudomonas aeruginosa	14.222 a				
klebsiella pneumoniae	6.741 ^c				
Stenotrophomonas maltophilia	3.852 ^d				
Citrobacter freundii	3.611 ^d				
pseudomonas sp.	9.556 ^b				
Bacillus sp.		13.900 ^a		10.3722	
Staphylococcus aureus		12.567 ^a		a	
Enterococcus faecalis		4.650 ^b			
Candida albicans			8.7500 a	8.0167 ^b	
Fusarium oxysporium F.sp. albidinis			8.5000 a		
Phytophtora infestans spp.			6.8000 ^a		

(mean): متوسط مناطق تثبط كل نوع فطري أو بكتيريا مختبرة بواسطة جميع مستخلصات العزلات المعزولة.

. Fungi و G^+ و 'All

كل قيمة من الجدول متبوعة بحروف مشتركة لا يوجد فرق معنوي عند (P<0.05).

مقارنة بين متوسطات مناطق التثبيط لمستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم للعينات المعزولة و مدى تأثيرها على كل مجموعة ممرضة دلت على عدم وجود فرق معنوي بينها عند (P<0.05) في تأثيرها على المجموعة على عدود (8ملم)، بينما دلت على وجود فرق معنوي بين مجموعة البكتيريا

موجبة الغرام و الفطريات، إذ وجد أن مستخلصات الكلوروفورم لها تأثير أكبر على البكتيريا موجبة الغرام (مام) مقارنة بمستخلصات الإيثيل أسيتات على نفس المجموعة (8.3667ملم) و عكس ذلك فيما يخص الفطريات كانت مستخلصات الإيثيل أسيتات هي الأكثر تأثيرا (13.5667ملم) مقارنة مع مستخلصات الكلوروفورم (الجدول 11).

الجدول 11: مقارنة متوسطات مناطق التثبيط لمستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم و تأثيرها على الفطريات و البكتيريا المختبرة.

T (Zones Inhibition (mm) (mean)				
Extracts -	G Bacteria	G ⁺ Bacteria	Fungi		
Ethyl acetate extacts	8.5079 ^a	8.3667 ^b	13.5667 ^a		
Chlorform extacts	8.4426 a	10.3722 ^a	8.0167 ^b		

(mean): متوسط مناطق التثبيط لجميع العينات على جميع أنواع المجموعة البكتيرية G^+ G^+ أو الفطرية الواحدة المختبرة. كل قيمة من الجدول متبوعة بحروف مشتركة لا يوجد فرق معنوي عند (P<0.05).

تعيش الكائنات الحية الدقيقة الداخلية أنسجة النباتات السليمة من دون أن تتسبب في أعراض مرضية النباتات (Madki et al., 2010)، وهي قادرة علي تخليق العديد من المركبات الكيميائية داخل أنسجة هذه النباتات فاصطلاح التي يمكن أن تساهم في الدفاع ضد الكائنات الممرضة للنباتات (Gayathri et al.,) من جهة أخرى تمثل مصدر هام للمستقلبات الثانوية الجديدة التي تملك نشاطات بيولوجية مختلقة ضد بكتيرية ، ضد فطرية ، ضد فيروسية أو ضد عوامل السرطان (Devaraju et Satish, 2011).

في هذه الدراسة وحد أن مستخلصات العزلات الفطرية و البكتيرية الداخلية المعزولة تملك نشاطية ضد ميكروبيه على الأقل عل كائن حي ممرض واحد، حيث مدى التأثير يعتمد على مصدر المستخلص و الكائن المرض المستعمل. بينت عدة أبحاث أن بعض أنواع الفطريات الداخلية تملك نشاطية ضد ميكروبيه (Devaraju et Satish, 2011; Fernandes et al., 2009; Sutjaritvorakul et al., 2010)

ذلك لدى البكتيريا الداخلية الخيطية خصوصا جنس Streptomyces البكتيريا الداخلية الخيطية خصوصا جنس Amain et al., 2008; Verma et الخيطية تعزي إلى احتواء هذه المستخلصات على مستقلبات ثانوية (al., 2009; Zhao et al., 2011) ذات نشاط بيولوجي ضد الأحياء الدقيقة الممرضة.

من خلال تحليل النتائج تم الوصول إلى أنه من بين العزلات المختبرة وجد أن العزلات المختبرة وجد أن العزلات المنائج تم الوصول إلى أنه من بين العزلات الثلاث لجنس Streptomyces عملك نشاطة تثبيط و Aspergillus sp. و العزلات الثلاث لجنس Alternaria sp. عمل عمل من البكتيريا و الفطريات الممرضة معا. بينما كل من البكتيريا و الفطريات الممرضة معا. بينما كل من البكتيريا و الفطريات الممرضة معا. و Cladosporium sp. و Cladosporium sp. و المعدول 7 و 9).

كل من الجنسين Penicilium و Aspergillus معروفين بإنتاجهما الواسع للمستقلبات الثانوية ذات النشاط البيولوجي المختلف بما في ذلك المركبات ذات النشاط ضد البكتيري و الفطري ((Maria et al., 2005; Nakashima et al., 2008)، من جهة أخرى تعتبر البكتيريا الخيطية أيضا مصدر هام للمستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا خصوصا جنس Streptomyces المتميز بإنتاج المضادات الحيوية للمستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا خصوصا جنس مضاداتها الحيوية ليست موجهة فقط لمعالجة إصابات الإنسان و الحيوان الممرضة فقط لكن تستعمل حتى في المحال الزراعي.

تتوافق هذه النتائج مع عدة أبحاث أخرى إذ تم عزل كل من هذه الأجناس من الأنسجة الداخلية لعدة نباتات مختلفة كما أثبتت قدرتها على إنتاج مركبات حيوية لها نشاط ضد بكتيري و فطري. بينت العديد من الأبحاث أن كل من الأجناس الفطرية .Aspergilus sp و Aspergilus sp الداخلية لها نشاط ضد فطري و بكتيري (Madki et al., 2010; Maria et al., 2005)، و أيضا عدد من العزلات الداخلية من المواود عدت أن لها نشاط ضد بكتيري و فطري معا (Penicilium sp و حدت أن لها نشاط ضد بكتيري و فطري معا (Al., 2009) فعدة إثباتات بينت أن هذا الأخير يمكن أن هذا الأخير يمكن أن

تكون له نشاطية ضد بكتيرية و فطرية، حيث تم الحصول على عزلتين ذات نشاط ضد مكروبي واسع النطاق المورن اله نشاطية ضد بكتيرية و فطرية، حيث تم الحصول على عزلتين ذات نشاط ضد مكروبي واسع النطاق هي العزلة Streptomyces sp. RM17 لها نشاطية ضد مكروبيه منها 3 عزلات لها نشاط ضد مكروبي على كل من البكتيريا موجبة و سالبة الغرام و الخمائر و الفطريات الممرضة هي العزلات ES19 ،ES15 والعزلة والعزلة والعزلة والعزلة والمعالم و الخمائر و الفطريات الممرضة هي العزلات كائنات الممرضة هي العزلات وصفت أيضا على أساس أنها كائنات المعلم والعزلة المعالم والعزلة المعالم والمعالم المعالم والمعالم المعالم والمعالم والعزلات المعالم والمعالم والمعالم والمعالم والعزلات المعالم والعزلات المعالم والمعالم المعالم المعالم

تتعلق النشاطية الضد ميكروبيه للمستخلصات بنوع المذيب المستعمل في استخلاص المستقلبات الثانوية والكائن الممرض المختبر، إذ وجد أن مستخلصات الإيثيل أسيتات لها فعالية أكبر على الفطريات و البكتيريا سالبة الغرام (الجدول 11) مع تسجيل أكبر قيمة للنشاطية (25ملم) على كل من Candida alibicans من طرف مستخلص العزلة Bericilium و Streptomyces sp.2 من طرف مستخلص العزلة الغرام (الجدول والشكل 6). بينما مستخلصات الكلوروفورم فكانت نشاطيتها أكبر على البكتيريا موجبة الغرام (الجدول المعتصل أكبر قيمة للتثبيط (23ملم) على البكتيريا و Bacillus sp. من طرف العزلة العضويين العضويين العضويين العضويين العضويين العضويين المستخلاص و الذوبان في المذيب العضوي المستعمل، إذ هو من المدينات العضوية المعتوف أن المذيبات العضوية المختلفة تستخلص مركبات مختلفة (2006). و على الأرجح

أن المركبات المستخلصة بواسطة الإيثيل أسيتات لها القطبية التي تسمح لها لاستخلاصها بمذا المذيب بينما المركبات النشطة المستخلصة بواسطة الكلوروفورم فهي أقل قطبية. و هذا ما تم إثباته في عدة دراسات إذ تختلف فعالية النشاطية الضد ميكروبيه باختلاف المذيب المستعمل في عملية الاستخلاص مثلما وجدفي عدة المناطبة النشاطية الضد ميكروبيه باختلاف المذيب المستعمل في عملية الاستخلاص مثلما وجدفي عدة المناطبة النشاطية الضد ميكروبيه و Ethyl acetate و Pandian,) Chloroform و Pandian,) Chloroform و Parthasarathi et al., 2010) Ethyl acetate و Methanol و Chloroform و Pandian و كذلك باستعمال كل من Chloroform و Methanol و Methanol و Chloroform و المناطبة المناطبة و كذلك باستعمال كل من Chloroform و Methanol و Methanol و (ijayakumar, 2008).

من جهة أخرى و من مقارنة متوسطات مناطق التثبيط الإجمالية على مختلف المجموعات المختبرة وجد أن أكبر متوسط تثبيط إجمالي للمستخلصات كان على الفطريات و البكتيريا موجبة الغرام مقارنة بمجموعة سالبة الغرام (الجدول 11). يعود ذلك كون أن عدد من البكتيريا سالبة الغرام (الجدول 11). يعود ذلك كون أن عدد من البكتيريا سالبة الغرام (الجدول 11). يعود ذلك كون أن عدد من البكتيريا سالبة الغرام و Enterobacter ، pseudomonas sp. ، Citrobacter freundii ، Stenotrophomonas maltophilia و قي (agglomeran) تميزت في العموم بحساسيتها المنخفضة إلى منعدمة اتجاه مستخلصات بعض العزلات و في كل من الحالتين مستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم (الجدول 8 و 10) مثلما هو مثبت في عدة دراسات مثل (Sutjaritvorakul et al., 2011). في العموم البكتيريا موجبة الغرام و الفطريات أكثر حساسية من البكتيريا سالبة الغرام و الركتيريا سالبة الغرام (Gayathri et al., 2010). و يمكن أن يكون السبب في الحدار الخلوي، وجود الغشاء ذو الطبيعة السكرية الحامل بخموعات الليبوبوليسكاريد لدى البكتيريا سالبة الغرام بجعل المواد القابلة للذوبان في الدهون غير قابلة للنفاذية بينما البكتيريا موجبة الغرام تكون أكثر عرضة للمضادات الحيوية كون جدارها الخلوي يحتوي على طبقة من بينما البكتيريا موجبة الغرام تكون أكثر عرضة للمضادات الحيوية كون جدارها الخلوي يحتوي على طبقة من

البيبتيدوجليكان و الذي لا يشكل حاجز فعال ضد نفاذية المركبات النشطة (Pandey et al., 2006).

إن النتائج المتحصل عليها في دراستنا هذه حول النشاطية الضد ميكروبيه لمستخلصات عزلات الفطريات و البكتيريا الخيطية الداخلية لنبات القمح تثبت على أنه هذه الأحياء الدقيقة يمكن أن تكون مصدر مهم في إنتاج المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا ذات الأهمية الصيدلانية و الزراعية.

5. III أنشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات العزلات المتحصل عليها β-carotene.

يستعمل في هذه الطريقة اختبار β-carotene /ممض اللينولييك لقياس تثبيط أكسدة الليبيدات و/ أو إزاحة الجذور الحرة. بعد تعرض حمض اللينولييك لعملية الأكسدة تقوم نواتج الأكسدة والمتمثلة في الهيدروبيروكسيدات الليبيدية ونواتج الضم المزدوجة Conjugated dienes و المركبات الطيارة بمهاجمة جزيئات الهيدروبيروكسيدات الليبيدية ونواتج الضم المزدوجة β-carotene عند طول موجة 490 نانومتر مرفوق بزوال لون مركب β-carotene نقوم المركبات المضادة للأكسدة بتعديل الجذور الحرة المتشكلة خلال هذا النظام مما يمنع حدوث الأكسدة وزوال لون β-carotene).

لوحظ أن بعض مستخلصات العينات تعمل على تثبيط أكسدة حمض اللينولييك في حين البعض الآخر غير نشط، حيث سجلنا أن كل من مستخلصات العزلتين Penicilium sp. 2 و يراوحت نسب التثبيط من (78,961±3,183%) إلى نشاطية مضادة لأكسدة حمض اللينولييك و تراوحت نسب التثبيط من (73,970±1,102%) إلى التوالي و هي نسب عالية مقارنة بمادة BHT التي اعتبرت على أنما تثبط أكسدة حمض اللينولييك بنسبة 100%. بينما العزلات . Phoma sp و Phoma sp و 1 و المؤللية مقارنة بمادة 100% و المؤللية مقارنة بمادة 100% و المؤللية مقارنة بمادة العزلات . Chaetomium sp. 1 و المؤللية العزلات . Chaetomium sp. و المؤللية المؤ

و العزلات الثلاثة لجنس .Streptomyces sp فكانت نشاطيتها المثبطة لأكسدة حمض اللينولييك أقل من 50%. (الشكل 9) و (الجدول 12) و (الملحق3، الجدول 17).

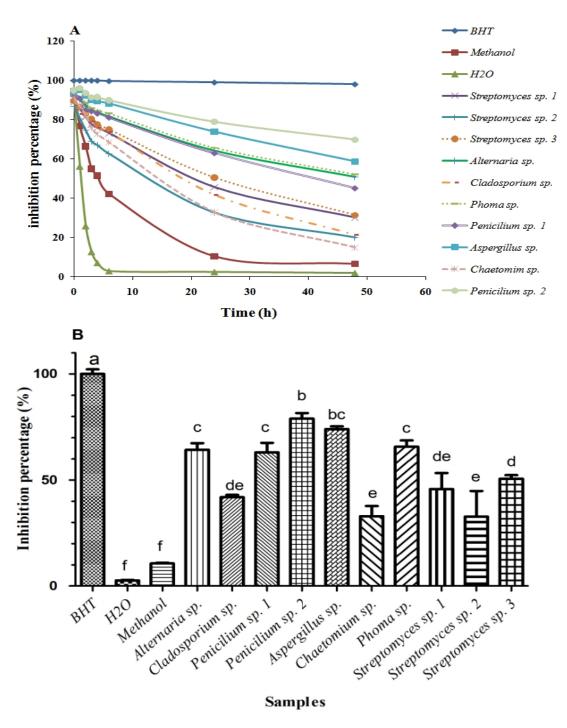
العديد من النباتات و الثمار تم دراستها لغرض البحث على مركبات جديدة ذات النشاطية المضادة للأكسدة حصوصا المركبات الفينولية و الفلافونويدية التي أثبتت قدرتها المضادة للأكسدة و إزاحة الجذور الحرة (Srinivasan et al., 2010). من جهة أخري معظم الدراسات بينت أن النشاطية المضادة للأكسدة ترجع بالدرجة الأولى إلى المركبات الفينولية إذ وجد إرتباط واضح بين إجمالي الفينولات و إجمالي النشاطية المضادة للأكسدة (Huang et al., 2007b).

الجدول12: النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيثيل أسيتات بواسطة إختبار β-carotene/Linoleic معناطية المضادة للأكسدة المستخلصات الإيثيل أسيتات بواسطة إختبار acid

Samples	Ethyl acetate extracts	Inhibition percentage (mean±SD)
C3B	Alternaria sp.	64,218±7,569°
C4B	Cladosporium sp.	$41,868\pm12,107^{de}$
24	Penicilium sp. 1	$63,012\pm1,734^{c}$
39	Penicilium sp. 2	$78,961\pm3,183^{b}$
38	Aspergillus sp.	$73,977\pm1,102^{bc}$
17N	Chaetomium sp.	$32,949\pm2,954^{e}$
C1B	Phoma sp.	$65,740\pm4,486^{c}$
16N	Streptomyces sp.1	$45,698\pm1,345^{de}$
3B	Streptomyces sp.2	32,739±4,728 ^e
17B	Streptomyces sp.3	$50,577\pm2,597^{d}$
BHT		$100,000\pm2,183^{a}$
H20		$0,630\pm0,157^{\mathrm{f}}$
Methanol		10,651±0,551 ^f

كل القيم المتبوعة بحروف مشتركة لا يوجد فرق معنوي بينها عند (P<0.05).

كل قيمة تمثل الوسيط الحسابي لثلاث إختبارات±الإنحراف المعياري (M±SD).



الشكل 09:النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيثيل أسيتات لمختلف العزلات.

- (A) النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيثيل أسيتات لمختلف العزلات بواسطة إختبار β-carotene/Linoleic النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيثيل أسيتات لمختلف العزلات بواسطة إختبار acid و Methanol خلال 48 ساعة
- β carotene/Linoleic النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات الإيثيل أسيتات لمختلف العزلات بواسطة إختبار (B) و H_2O و BHT) بعد 24 ساعة. كل نقطة من المنحنى تمثل الوسيط acid مقارنة فيما بينها و مع الشواهد ($M\pm SD$).

كل قيمة من المنحني متبوعة بحروف مشتركة لا يوجد فرق معنوي بينها عند (P<0.05).

تعد عديد الفينولات من أهم المستقلبات الثانوية للفطريات (Arora et Chndra, 2010)، لكن عدد قليل من الأبحاث تمت على الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات ، و في النتائج المحصل عليها وجدنا بعض مستخلصات العزلات الفطرية لها نشاطية مضادة للأكسدة و هذا ما تم إثباته في بعض الدراسات إذ أرجع في معظم الحالات النشاطية المضادة للأكسدة لبعض الفطريات الداخلية المعزولة من نباتات مختلفة إلى النسبة العالية للفينولات و الفلافونويدات في المستخلصات، مثل ما أثبت في المستخلصات النباتية (Abderrahmane et al., 2010; Sedik et al., 2010). وجد فطر عزلت من بعض النباتات الطبية و وجد أن 29 منها تملك نشاطية مضادة للأكسدة كما وجد إرتباط وثيق بين إجمالي النشاطية المضادة للأكسدة و إجمالي المركبات الفينولية في المستخلصات (Huang et al., 2007b). بينما وجدت كل من الفطريات Phoma و Cladosporium و Chaetomium ها نشاطية مضادة للأكسدة و كانت أكبر عند Chaetomium يرافقه نسبة أكبر في إجمالي الفينولات مقارنة بالعزلات الأخرى النشطة (Chaetomium 2007a). وجد أيضا أن مستخلص Alternaria alternata المعزولة من نبتة .Coffea arabica L لها نشاطية مضادة للأكسدة أعلى مقارنة بمستخلص القمح و أرجع ذلك إلى إرتفاع إجمالي الفينولات في مستخلص Alternaria alternata مقارنة بمستخلص القمح (Fernandes et al., 2009). الجنس Aspergilus هي العزلة ST22 و ST21 المعزولة من Aspergilus هما نشاطية مضادة للأكسدة مع كمية إجمالية للفينولات أكبر من الفلافونويدات وكلاهما أكبر لدى العزلة SX10 هذه الأخيرة ذات نشاطية أكبر (Qui et al., 2010). فمستخلصات الإيثيل أسيتات التي شهدت نشاطية مضادة لأكسدة الليبيدات بطريقة β-carotene قد يعزى إلى احتوائها على مركبات فينولية، خصوصا و أن المذيبات العضوية الأكثر قطبية تستعمل لاستخلاص المركبات الفينولية مثل ما هو عليه الحال عند الإيثيل أسيتات الذي يستعمل لاستخلاص المركبات الفينولية ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة و عديدات الفينول ذات الأوزان الجزيئية العالية (Abdelwahab et al., 2011) الجزيئية

6. III معزولة النشاطية الإنزيمية لمخلف العينات المعزولة

إختبار النشاطية الإنزيمية تم عن طريق الزرع على الأوساط الصلبة والتي تحتوي على مادة تفاعل كل إنزيم وبعد حساب المؤشر الإنزيمي الذي يعبر عن قوة النشاطية الإنزيمية (نسبة الإنتاج الإنزيمي= قطر الهالة/قطر المستعمرة (سم) و مقارنة متوسطات المؤشرات الإنزيمية بين مختلف العزلات على كل إنزيم مختبر تبين أنه يوجد

فرق معنوي عند (P<0.05) بين بعض العزلات في إنتاج مختلف الإنزيمات مقارنة بالعزلات الأخرى في حين البعض الآخر لم تبد اختلاف كبير (الجدول 13) و (الشكل 10) و (الملحق3، الجدول 18).

الجدول 13: مقارنة متوسطات المؤشر الإنزيمي للنشاطية الإنزيمية لمختلف الفطريات و البكتيريا المعزولة.

Isolated		Enzymatic Index (EI)*(mean)					
microorganisms	Esterase	Lipase	Cellulase	Amylase	Amylase	Protease	Protease
	(T80)	(T20)	(CMC)	(Strach)	(Dextrine)	(Casein)	(Gelatin)
Alternaria sp.	0,0	0,0	1.5 ^b	1,1 ^d	1.1 ^d	nf	1,2 ^d
Cladosporium sp.	1,1 ^d	0,0	0,0	1,5 ^d	1,5 ^d	nf	$1,2^{d}$
Penicilium sp.1	0,0	1,2 ^d	0,0	1,9 ^d	1,6 ^d	nf	$2,1^a$
Penicilium sp.2	$1,2^{d}$	1,2 ^d	0,0	$1,7^{d}$	1,3 ^d	nf	1,5 ^b
Aspergillus sp.	0,0	0,0	0,0	1.6 ^d	1,4 ^d	nf	1,5 ^b
Chaetomium sp.	$1,7^{c}$	0,0	1.0^{c}	1,5 ^d	1,5 ^d	nf	1,4 ^c
Phoma sp.	1,1 ^d	0,0	0,0	1,9 ^d	1,6 ^d	nf	0,0
Streptomyces sp.1	$2,3^a$	3.8^{a}	2.0^{a}	6,1 ^a	$4,0^{b}$	$2,1^{b}$	nf
Streptomyces sp.2	$2,1^{b}$	$2,9^{b}$	1.9 ^a	$5,2^{b}$	4.8^{a}	$2,9^{ab}$	nf
Streptomyces sp.3	1,7°	2,2°	0,0	4,3°	3,2°	4,6 ^a	nf

^{*(}EI): المؤشر الإنزيمي الذي يمثل نسبة الإنتاج الإنزيمي = قطر الهالة/قطر المستعمرة (سم) ، nf الإختبار لم يجر. المتوسطات المرفوقة بنفس الحرف لا يوجد فرق معنوى بينها عند (P<0.05).

كل نقطة من المنحني تمثل الوسيط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري(M±SD).

نشاطية إنزيم الأميلاز و الدكستريناز كانت كل العزلات قادرة على إنتاجهما مع تسجيل تشابه كبير بين الفطريات في إنتاج هذين الأخيرين بينما العزلات الثلاث لجنس .Streptomyces sp. فتميزت بنشاطية أكبر، إذ سجلنا أكبر قيمة للمؤشر الإنزيمي عند 1. Streptomyces sp. عند إستعمال النشاء القابل للذوبان أما باستعمال الدكسترين المؤشر الإنزيمي إلى أكبر قيمة له (5.8) عند العزلة 2. Streptomyces sp. نشاطية إنزيم البروتياز باستعمال الجيلاتين تم اختبارها على الفطريات حيث وجدنا 85% من العزلات قادرة على إنتاج الجيلاتيناز مع تسجيل أكبر قيمة للمؤشر الإنزيمي (2.1) من طرف العزلة . Penicilium sp أما العزلات كل الغزلات الثلاثة لجنس . Streptomyces sp نشاطية البروتياز تم اختبارها باستعمال الكازيين حيث كانت كل العزلات الثلاثة نشطة و بمؤشر إنزيمي أكبر لدى العزلة 3. Streptomyces sp في الليباز العزلات الثلاثة نشطة و بمؤشر إنزيمي أكبر لدى العزلة 3. Streptomyces sp في الليباز العزلات الثلاثة نشطة و بمؤشر إنزيمي أكبر لدى العزلة 3. Streptomyces sp في الليباز العزلات الثلاثة نشطة و بمؤشر إنزيمي أكبر لدى العزلة 3. Streptomyces sp في الليباز العزلات الثلاثة نشطة و بمؤشر إنزيمي أكبر لدى العزلة 3. العزلات الثلاثة الشاطية إنزيمي الكبرين حيث المينان المؤلات الثلاثة المؤلود المؤلود المؤلود المؤلود المؤلود المؤلود الثلاثة المؤلود ا

و الإستيراز فتم تسجيل أن 50 % من العزلات تملك إنزيم الليباز بنشاطية أكبر لدى العزلة Streptomyces sp.1 و 70% من العزلات تملك إنزيم الإستيراز و بنشاطية أكبر لدى العزلات تملك إنزيم الإستيراز و بنشاطية أقل إذ تم تسجيل فقط 40% من العزلات النشطة أقل إذ تم تسجيل فقط 40% من العزلات المختبرة لها نشاطية إنزيم السيليلاز و كانت العزلتان Streptomyces sp.2 و Streptomyces sp.1 الأكثر المختبرة لها نشاطية إنزيم السيليلاز و كانت العزلتان (1.9) على التوالى.

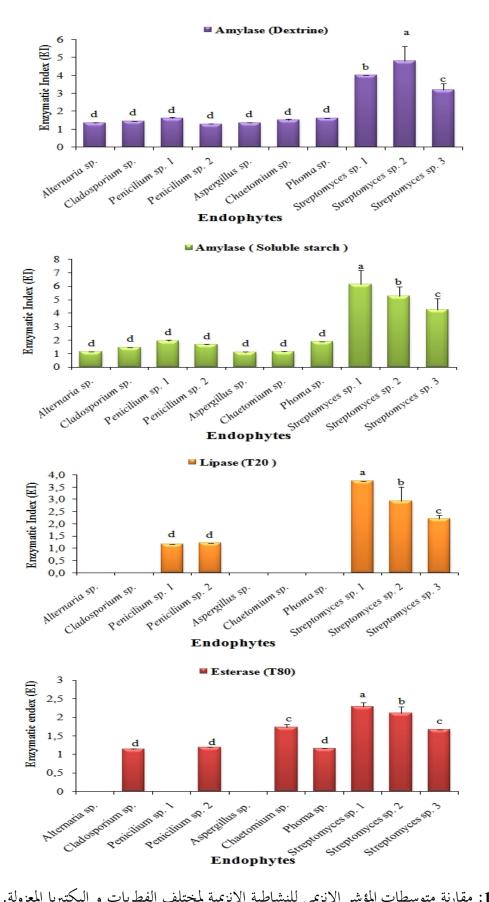
طريقة الزرع على سطح الآجار من بين الطرق الهادفة إلى معرفة النشاطية الإنزيمية النوعية المباشرة والمتعلقة بالنسبة بين قطر هالة الهدم الإنزيمي وقطر المستعمرة و المعبر عنها بالمؤشر الإنزيمي، هذا الأخير هو وسيلة سريعة و سهلة لإختبار و المقارنة بين النشاطية الإنزيمية لعدد أكبر من الكائنات الحية الدقيقة (,Alves et al. المنافق الإنزيمية لعدد أكبر من الكائنات الحية الدقيقة (,2002 Carrim et al. 2006 وحسب (2002; Carrim et al. 2006) إذا كان المؤشر الإنزيمي أكبر من 1 فإن الكائنات المختبرة تعد منتجة للإنزيم الخارج خلوي المختبر و هذا ما يتماشى و النتائج المتحصل عليها حيث كل العزلات التي أبدت نشاطية اتجاه إنزيم ما كان مؤشرها الإنزيمي أكبر من 1 و التي يمكن اعتبارها منتجة له (الجدول 13).

من الكائنات الدقيقة التي قد تغزوا النبات الميت و الذي يحلل إلى أحماض عضوية و CO₂ و دكسترين أثناء عملية التحليل.

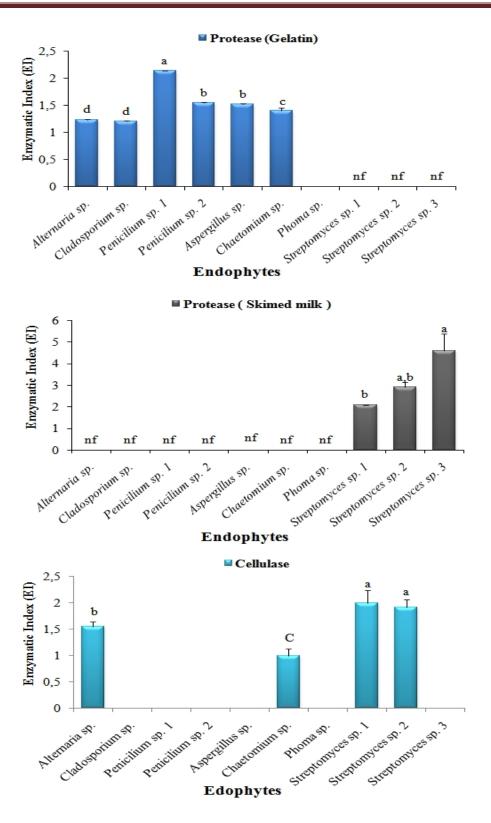
أظهرت كل العزلات نشاطيتها اتجاه إنزيم البروتياز و بعضها الليباز و بعضها الإستيراز و البعض الأخر لها نشاطية اتجاه الإنزيمات الثلاثة، هذا ما يتوافق مع ما وحده Maria و آخرون (2005) الذين عزلوا فطريات داخلية من بينها .Aspergillus sp و Alternaria sp لها نشاطية لكل من إنزيمي الليباز و البروتياز و الذي الجمع نشاطية إنزيم الليباز إلى إمكانية إستعمال الليبيدات كمصدر للطاقة. كما وحد أن كل عزلات البكتيريا الخيطية لها نشاطية إنزيمي الأميلاز و الليباز اعتقد أن هذه الإنزيمات يمكن أن يكون لها دور في تعزيز نمو النبات و كذلك مكافحة الأمراض النباتية(Sousa et al., 2008).

في دراستنا هذه وجد أن 40% من العزلات تملك نشاطية إنزيم السيليلاز وهذا ما توصل إليه (2005) الذين عزلوا عدة عزلات فطرية داخلية قادرة على إفراز إنزيم السيليلاز من بينها . (2005) Maria et و كذلك بينما وجد من بين العزلات النشطة اتجاه إنزيم السيليلاز . (Alternaria sp. من طرف (على القادرة على . (al., 2005) هذا ما تم الحصول عليه في هذه الدراسة. الكائنات الحية الدقيقة الداخلية للنباتات القادرة على هدم السيليلوز غالبا ما تكون قادرة على هدم الهميسيلسلوز حيث تشكل هذه الأخيرة تشكل حوالي 40% و 20% على التوالي من الكتلة الحيوية للنباتات، هذه الكائنات و بعد نفاذ مصادر الغذاء البسيطة مثل الجلوكوز و النشاء تبدأ في استغلال مركبات الجدار الخلوي و تعتبر هذه الكائنات المنتجة لإنزيم السيليلاز المنافس الأول على أنسجة النباتات الميت (Choi et al., 2005). كما يعتبر Pointing أن الكائنات الداخلية المنتجة لإنزيم السيليلاز غالبا ما تكون رمية المعيشة ومنه يمكن أن تلعب دورا هاما في تحليل المواد العضوية المنباتات التي تملك في حدر خلاياها السيليلوز مثل Phytophtora و Phytophtora و Phytophtora). (Sousa et al., 2008).

تتميز البكتيريا الخيطية بإنتاجها للمستقلبات الثانوية خاصة الإنتاج الكبير لمختلف الإنزيمات مثل البروتياز والأميلاز و السيليلاز (Bhasin et al., 2010) مثلما تم الحصول علية في نتائجنا إذ لوحظ في أغلب الملياز و الأميلاز و السيليلاز (Bhasin et al., 2010) تمينت بإنتاج أكبر لمختلف الإنزيمات (الجدول 13). تعد الإنزيمات مهمة في عمليات الإستقلاب لدى جميع الكائنات الحية، بالتالي هذه الأخيرة يمكن الحصول عليها من النباتات و الحيوانات و الكائنات الحية الدقيقة ، لكن تعد الإنزيمات المعزولة من الكائنات الحية الدقيقة أكثر أهمية سيما على المستوى الصناعي كونما أكثر استقرارا في درجات الحرارة و PH الحرجة، إذ يمكن إستعمالها في المجالات النسيجية (الأميلاز، الليباز، السيليلاز) و الأغذية (البروتياز، السيليلاز، البكتيناز، أوكسيدو ريدكتاز) و الصناعات المجلدية (البروتياز، الليباز) و الورقية (الليباز، أوكسيدو ريدكتاز، كزيلاناز) و المنظفات (البروتياز، السيليلاز، الليباز، أوكسيدو ريدكتاز) (Maria et al., 2005; Sousa et al., 2008). من خلال النتائج المتحصل عليها يمكن اعتبار الكائنات الحية الدقيقة الداخلية مصدر لعزلات جديدة ذات الأهمية البيوتيكنولوجية في عدة صناعات مثل الصناعات الغذائية و الورقية و الصيدلانية و النسيحية و الجلدية.



الشكل 10: مقارنة متوسطات المؤشر الإنزيمي للنشاطية الإنزيمية لمختلف الفطريات و البكتيريا المعزولة.



الشكل10 (تابع): مقارنة متوسطات المؤشر الإنزيمي للنشاطية الإنزيمية لمختلف الفطريات و البكتيريا المعزولة. (EI): المؤشر الإنزيمي والذي يمثل نسبة الإنتاج الإنزيمي = قطر الهالة/قطر المستعمرة (سم) ، nf الإختبار لم يجرى. المتوسطات المرفوقة بنفس الحرف لا يوجد فرق معنوي بنها عند (P<0.05). كل نقطة من المنحني تمثل الوسيط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري(M±SD).

7. III و الفطريات و البكتيريا الداخلية على إنتاش و نمو بذور القمح

من مقارنة تأثير مختلف العزلات الفطرية و البكتيرية الداخلية المعزولة على نمو القمح الصلب و ذلك بالاعتماد على إنتاش البذور و على طول و وزن السويقات تبين أنه معظم العزلات لم يكن لها تأثير إيجابي على نمو نبات القمح ما عدى العزلتين Streptomyces sp.2 (Streptomyces sp.1 التي أظهرتا وجود فرق معنوي عند (P<0.05) مقارنة بالشاهد (Control 2 Control 1). (الجدول 14)، (الشكل 11).

الجدول 14: مقارنة تأثير الفطريات و البكتيريا المعزولة على نمو نبات القمح الصلب.

Treatment	Germination (%)	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Root fresh weight (mg)	Shoot fresh weight (mg)	Vigour Index
Control 1	63,33°	4,01 ^{bc}	$3,42^{b}$	18,50 ^b	17,50 ^{dc}	470,97 ^{cd}
Control 2	$60,00^{c}$	4,01 ^{bc}	$3,41^{b}$	$17,00^{b}$	$19,50^{c}$	446,97 ^{cd}
Streptomyces sp.1	$90,00^{a}$	$8,58^{a}$	$5,96^{a}$	$25,50^{a}$	$57,50^{a}$	$1323,00^{a}$
Streptomyces sp.2	$70,67^{bc}$	$8,42^{a}$	$6,52^{a}$	$27,50^{a}$	43,33 ^b	995,67 ^b
Alternaria sp.	$64,00^{c}$	4,23 ^b	$3,40^{\rm b}$	19,00 ^b	$20,67^{c}$	488,73 ^{cd}
Cladosporium sp.	$61,00^{c}$	$3,83b^{c}$	$3,37^{b}$	17,50 ^b	$19,17^{c}$	439,23 ^{cd}
Penicilium sp. 1	$45,00^{c}$	$4,00^{bc}$	$3,80^{b}$	$18,00^{\rm b}$	$20,00^{c}$	465,01 ^{cd}
Penicilium sp. 2	$58,00^{c}$	$3,50^{bc}$	$3,23^{b}$	$16,00^{b}$	$18,00^{dc}$	389,60 ^{cd}
Aspergillus sp.	$60,00^{c}$	$3,93^{bc}$	$3,40^{b}$	$17,00^{b}$	19,33°	$440,17^{cd}$
Chaetomium sp.	$62,00^{c}$	4,07 ^{bc}	$3,50^{\rm b}$	$18,00^{\rm b}$	18,17 ^{dc}	$468,67^{cd}$
Phoma sp.	$62,67^{c}$	$3,97^{bc}$	$3,47^{b}$	17,50 ^b	18,63 ^{dc}	465,61 ^{cd}
Streptomyces sp.3	65,00°	4,77 ^b	$3,73^{b}$	19,00 ^b	18,00 ^{dc}	552,23°

Control 1 (ماء مقطر معقم)، Control 2 (ماء مقطر معقم+ نشاء).

القيم المرفوقة بنفس الحرف لا يوجد فرق معنوي بنها عند (P<0.05).

كل نقطة من المنحني تمثل الوسيط الحسابي لثلاث مكررات الإنحراف المعياري (M±SD).

تبين النتائج أن كل من العزلتين Streptomyces sp.1 و Streptomyces sp.1 كان لهما تأثير إيجابي على نمو نبات القمح مقارنة بالشاهد ، حيث هذه الأخيرة وجدت أنها تعمل على رفع الكتلة الحيوية لكل من السويقات و الجذور الناشئة، من جهة أخرى ترفع من مؤشر قوة نمو البادرات (vigour index) و الذي يعبر على النمو الجيد من خلال تأثيرها إيجابا على كل من نسبة الإنتاش و طول السويقات و الجذور الناشئة، مؤشر قوة نمو البادرات المسجل لدى العزلة Streptomyces sp.1 كان أكبر من ذلك المسجل عند

2 على التوالي و هذين الأخيرين أكبر من الشاهدين 1 و 2 (995,67،1323,00) Streptomyces sp.2 على التوالي. أما باقى العزلات فكانت النتائج قريبة جدا من الشواهد (الجدول 14).

وجدت العزلتين Streptomyces sp.1 و Streptomyces sp.2 و Streptomyces sp.1 أن كلا منهما منتجة لإندول حمض الأستيك (NH3) بينما تحليل الفوسفات غير القابل للذوبان فكانت النتيجة سلبية (الجدول 15).

الجدول 15: إختبار إنتاج NH3 و أندول حمض الأستيك و تحليل الفوسفات غير القابل للذوبان من طرف Streptomyces sp. 2 و Streptomyces sp. 2

Test isolates	NH ₃ production	Indole acetic acid (IAA) production	Phosphate solubilization
Streptomyces sp 1	+	+	-
Streptomyces sp.2	+	+	-

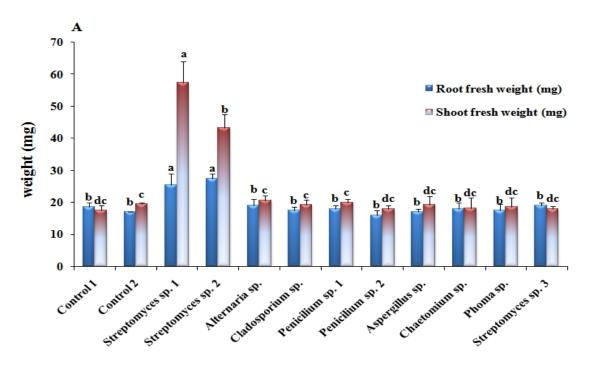
⁻ تفاعل سلبي، + تفاعل إيجابي.

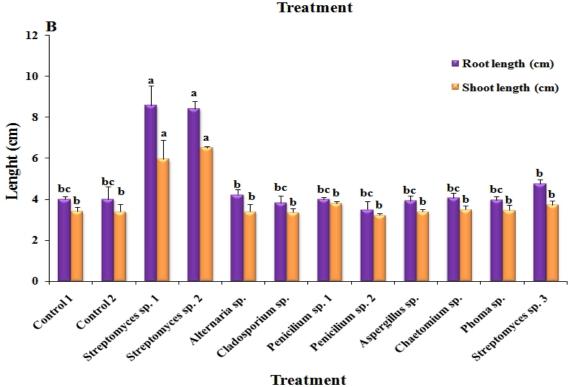
تعد البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات معروفة بتعزيزها لنمو هذه الأخيرة حيث يمكن أن تحفز نمو النباتات بطريقة غير مباشرة مثل إنتاج بعض المستقلبات ذات النشاط البيولوجي ضد الفطريات المعرضة للنباتات أو بطريقة مباشرة مثل إنتاج الهرمونات المعدلة لنموها (ethylene and abscisic acid (في عنين الحالة الغذائية الغذائية النباتات في مختلف مراحل النمو، تحسين الحالة الغذائية للنباتات من خلال التزويد و تسهيل عملية امتصاص الأغذية خصوصا النيتروجين و الفوسفات (, Cin et al., وكذلك هو الحال لبعض البكتيريا المعزولة من التربة (2010). وكذلك هو الحال لبعض البكتيريا المعزولة من التربة (3010). وحد في دراستنا هذه الأخيرة في وزن و طول الأوراق و الجذوز و نسبة الإنتاش مع ملاحظة أن هذه الأخيرة قادرة على إنتاج خلال الزيادة في وزن و طول الأوراق و الجذوز و نسبة الإنتاش مع ملاحظة أن هذه الأخيرة قادرة على إنتاج المونيا من طرف

Streptomyces أثبت في عدة دراسات سواء المعزولة من التربة أو من داخل الأنسجة النباتات (Khamna et al., 2010; Nimnoi et al., 2010; Oliveira et al., 2010). و بالتالي هذه البكتيريا يمكن أن تلعب دورا في تعزيز نمو نبات القمح وقد يعزى هذا الدور إلى إمكانية إنتاج هذه العزلات IAA باعتبار أن من بين العوامل المسؤولة على النمو الجيد إنتاج هذا الأخير (Khamna et al., 2009; Oliveira et al., 2010). إذ تعتبر الأوكسينات (auxins) من بين أهم الهرمونات المعدلة لدى النبات، ومن بين الأوكسينات التي لها دور وظيفي و فيزيولوجي IAA الذي هو هرمون يعمل على تحفيز إستطالة الخلايا، إنقسامها و تمايزها في الخلايا الناشئة (Soltani et al., 2010)، كما يعمل على زيادة التفرعات الجانبية للجذور مما يسمح بامتصاص أكبر للأغذية من طرف النبات و نمو جيد (Shrivastava et al., 2008). (Merzaeva et Shirokikh, 2010). عزلوا عدد من البكتيريا الخيطية الداخلية المنتجة للهرمون IAA من (winter rye) وعند معاملة بذور هذه الأخيرة بمذا الأوكسين المنتج من طرف هذه البكتيريا وجد زيادة في قدرة الإنتاش و نمو كثيف للبادرات. كما أن أجناس البكتيريا الخيطية Actinomaduar Nocardia Micromonospora و Streptosporangium المنتجة للهرمون IAA ذكرت على أنها ترفع من الوزن الجاف لكل من الذرى، الخيار و الطماطم. من جهة أخري عدة إثباتات بينت البكتيريا المعزولة من التربة المنتجة للهرمون IAA تعمل أيضا على تعزيز نمو النبات (Nimnoi et Pongsilp, 2009) ،(Nimnoi et al., 2010) وجدوا أن العزلات البكتيرية المعزولة المنتجة للهرمون IAA تعمل على تعزيز نمو الجذور و البادرات الهوائية عند نبات Raphanus sativus و Brassica oleracea بأكثر من 5 مرات من الشاهد. بينما (Khamna et al., 2010) و جدوا أن عزلات Streptomyces المنتجة للهرمون IAA تعمل على تعزيز نمو الذري و الطماطم من خلال الرفع من قدرة إنتاش البذور و زيادة وزن و طول الجذور و البادرات الهوائية. من جهة أخرى تعزز البكتيريا الخيطية من نمو النبات بتزويده بمصادر الغذاء من بينها النتروجين (Qin et al., 2011) و هذا الأخير عنصر مهم في تغذية

النبات و نموه غالبا ما يتم توفيره من طرف البكتيريا للنباتات في شكل أمونيامن خلال تثيت الآزوت الجوي (Hasegawa et al., 2006; Janso et Carter, 2010) مكن للكائنات الداخلية للنباتات من بينها البكتيريا الخيطية الداخلية للنباتات تثبيت النيتروجين الجوي.

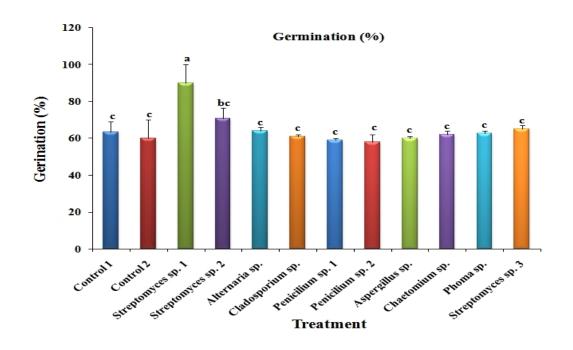
من هذه الدراسة يمكن القول أن البكتيريا الخيطية الداخلية لنبات القمح مخبريا تعزز نمو نبات القمح و يمكن اعتبارها مصدر لبعض الهرمونات و العناصر الغذائية المعززة لنمو نبات القمح و التي تتطلب المزيد من و الدراسة الميدانية و إمكانية إستعمالها في الجال الزراعي.

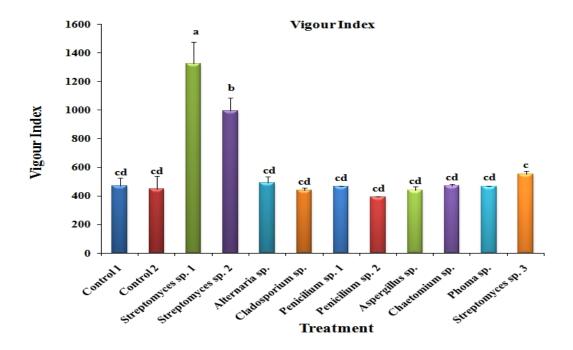




الشكل 11: مقارنة تأثير الفطريات و البكتيريا الداخلية على نمو نبات القمح.

- (A): التأثير على الوزن الرطب للجذور و السويقات.
- (B): التأثير على طول الجذور و السويقات. 1 Control (ماء مقطر معقم)، 2 Control (ماء مقطر معقم+ نشاء). المتوسطات المرفوقة بنفس الحرف لا يوجد فرق معنوي بنها عند (P<0.05)، كل نقطة من المنحنى تمثل الوسيط الحسابي لثلاث مكررات \pm الإنحراف المعياري ($M\pm$ SD).





الشكل 11 (تابع): مقارنة تأثير الفطريات و البكتيريا الداخلية على نمو نبات القمح.

(C): التأثير على قوة نمو البادرات.

(D): التأثير على إنتاش البذور. 1 Control (ماء مقطر معقم)، 2 Control (ماء مقطر معقم+ نشاء). المتوسطات المرفوقة بنفس الحرف V = (P < 0.05) بنها عند (V = (P < 0.05))، كل نقطة من المنحنى تمثل الوسيط الحسابي لثلاث مكررات V = (D + (D + D)).

الخاتمة و الآفاق

الخاتمة و الأفاق

الخاتمة و الأفاق

الخاتمة و الأفاق

الأحياء الدقيقة التي تستوطن الأنسجة الداخلية للنباتات غلبا ما تتحصل على أغذيتها من عائلها و في مقابل ذلك تعمل هذه الأحياء على تعزيز صحة عائلها من خلال إنتاج المستقلبات النشطة بيولوجيا، كما أن تعزيز هذه الأحيرة لنمو عائلها يمكن أن يتم من خلال تثبين النيتروجين، إنتاج الهرمونات النباتية، المكافحة البيولوجية ضد الكائنات الممرضة للنباتات و المنافسة على المغذيات (2006).

كل من البكتيريا الخيطية و الفطريات الداخلية للنباتات و صفت على أنما مصدر لجموعة واسعة من المستقلبات الثانوية ذات الأهمية الصناعية، الطبية و الزراعية، مختلف النشاطات البيولوجية لهذه المستقلبات عكن أن تكون مضادات بكتيرية، فطرية، فيروسية، سرطانية و مضادات حشرية ((Tejesvi et al., 2007). هذا ما جعل البحث عن المركبات الجديدة المنتجة من طرف الأحياء الدقيقة الداخلية للباتات يحمل آفاق واعدة لحل بعض المشاكل الصحية عند الإنسانية كظهور البكتيريا المقاومة لبعض الأدوية شائعة الإستعمال، هذه المركبات تكون ذات فعالية أكبر، أقل سمية و أقل خطرا على البيئة (al., 2009).

تشير النتائج المتحصل عليها من خلال دراسة بعض الأنشطة البيولوجية للبكتيريا الخيطية و الفطريات الداخلية لنبات القمح الصلب (Triticum durum Desf.) إلى أن بعض أنواع هذه الكائنات يمكن أن تشكل مصدر للمستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا ذات الأهمية الطبية، الصناعية و الزراعية، حيث أن بعض العزلات تميزت بامتلاكها لنشاطية ضد ميكروبية واسعة الطيف ضد بعض الأنواع البكتيرية و الفطريات الممرضة للنباتات و الإنسان كما أن بعض مستخلصات هذه العزلات تميزت بامتلاكها نشاطية مضادة للأكسدة ما يشجع البحث على المستقلبات الثانوية النشطة بيولوجيا من هذه المصادر التي من شأنها أن تحل بعض المشاكل الصحية لدى الإنسانية مثل الأمراض الناتجة عن الإصابة ببعض الكائنات الحية الدقيقة و بعض

الخاتمة و الأفاق

الأمراض الناتجة عن التفاعلات التأكسدية للجذور الحرة، بالإضافة إلى ذلك يمكن إستعمالها في المكافحة البيولوجية ضد الأحياء الدقيقة الممرضة للنباتات خصوصا الفطريات.

على صعيد آخر بعض أنواع هذه العزلات خصوصا البكتيريا الخيطية أثبتت مقدرتها على إنتاج بعض أنواع الإنزيمات و التي يمكن أن تكون لها أهمية على المستوي الصناعي.

من جهة أخري بعض العزلات أيضا و جدت على أنها تعمل على تعزيز نمو نبات القمح الصلب (Triticum durum Desf.) صنف محمد بن بشير من خلال إنتاج بعض الهرمونات النباتية مثل IAA و توفير بعض المصادر الغذائية مثل النيتروجين ما يجعل أهميتها أكبر خصوصا لغرض الإستعمالات الزراعية الغذائية.

كآفاق، هذه الدراسة ما هي إلا مرحلة أولية لدراسة أكثر شمولية، أكثر دقة و تمعن تشمل:

- التعرف على العزلات النشطة بيولوجيا باستعمال الطرق الجزيئية الحديثة التي تعتمد على تحليل تتابع القواعد الآزوتية لتحت الوحدة 18S و ITS للحمض النووي rDNA.
- إيجاد الشروط المزرعية و الفيزيولوجية التي تعطي إنتاج أكبر للمركبات النشطة بيولوجيا من طرف هذه العزلات.
 - عزل، تنقية و التعرف على البنية الجزيئية للمركبات النشطة.
- دراسة ميدانية لمعرفة مدى تأثير العزلات على نمو و المردود الزراعي لنبات القمح تحت ظروف إجهاد مختلفة مثل الجفاف و PH.
- إيجاد الشروط المزرعية و الفيزيولوجية المناسبة لإنتاج كميات أكبر من الهرمونات النباتية من طرف هذه العزلات.
 - دراسة كمية لهذه العزلات من حيث إنتاجها لمختلف الإنزيمات.



المراجسع

1- **Arnold A. E.** Understanding the diversity of foliar endophytic fungi:progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 2007; **21**: 51-66.

- 2- **Abdel-raheem A. and Shearer C. A.** Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity* 2002; **11**: 1-19
- 3- Abdelwahab S. I., Mohan S., Mohamed E. M., Al-Mekhlafi N., Mariod A. A., Abdul A. B., Abdulla M. A. and Alkharfy K. M. Antiapoptotic and Antioxidant Properties of Orthosiphon stamineus Benth (Cat's Whiskers): Intervention in the Bcl-2-Mediated Apoptotic Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; **2011**: 156765.
- 4- Abderrahmane B., Sabah B., Farida B., Seddik K., Noureddine C., Daoud H., Lekhmici A. and Mosaad Attia A.-W. Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae* 2010; 1: 128-136.
- 5- Adaskaveg J. E., Blanchetter A. and Gilbertson R. L. Decay of date palm wood by white-rot and brown-rot fungi. *Canadian Journal of Botany* 1991; **69**: 615-629.
- 6- Ahmad F., Ahmad I. and Khan M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 2008; **163**: 173-181.
- 7-Ahmed S., Govindarajan J. M., Funk C. R. and Johnson-Cicalese J. M. Fatality of house crickets on perennial ryegrasses infected with a fungal endophyte. *Entom exper et appl* 1985; **39**: 183-190.
- 8- Alva P., Mckenzie E. H. C., Pointing S. B., Pena-Muralla R. and Hyde K. D. Do sea grasses harbour endophytes? *Fungal Diversity* 2002; 7: 167-178.
- 9- Alves M. H., Campos-Takaki G. M., Proto A. L. F. and Milanez A. I. Screening of *mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002; **33**: 325-330.
- 10- Aly A. H., Edrada-Ebel R., Wray V., Muller W. E., Kozytska S., Hentschel U., Proksch P. and Ebel R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry* 2008; **69**: 1716-1725.
- 11- **Anitha A. and Rabeeth M.** Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of *Streptomyces griseus*. *African Journal of Plant Science* 2010; **4**: 061-066.
- 12- Arasu M. V., Duraipandiyan Y., Agastian P. and Ignacimuthu S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale* 2009; **19**: 22-28.
- 13- Araújo G. M. d., Silva A. C. d. and Azevedo J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2000; 43: 447-451.
- 14- Arifuzzaman M., Khatun M. R. and Rahma H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology* 2010; **9**: 4615-5619.

15- Arnold A. E. Diversity and Ecology of Fungal Endophytesin Tropical Forests. In: Deshmokh, S.K. and Rai, M.K. (eds) Biodiversity of Fungi, their rol in Human Life. Sience Publishers, Enfields, New Hampshire, USA 2005; pp. 49-68

- 16- Arnold A. E., Maynard Z., Gilbert G. S. and Coley P. D. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* 2000; **3**: 267-274.
- 17- Arnold A. E., Mejýa L. C., Kyllo D., Rojas E. I., Maynard Z., Robbins N. and Herre E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* 2003; **100**: 15649-15654.
- 18- Arnold A. E., Miadlikowska J., Higgins K. L., Sarvate S. D., Gugger P., Way A., Hofstetter V., Kauff F. and Lutzoni F. A phylogenetic estimation of trophic transition networks for ascomycetous fungi: are lichens cradles of symbiotrophic fungal diversification? *Syst Biol* 2009; **58**: 283-297.
- 19- Arora D. S. and Chndra P. Assay of antioxidant potential of two *aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41: 765-777.
- 20- Arunachalam R., Wesely E. G., George J. and Annadurai G. Novel approaches for identification of *streptomyces noboritoensis* TBG-V20 with cellulase production. *Current Research in Bacteriology* 2010; **3**: 15-26.
- 21- Azevedo J. L., Maccheroni W. J., Pereira J. O. and Welington L. A. I. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 2000; **3**: 40-65.
- 22- Balagurunathan R., Xu L. and Jiang C. Diversity of soil actinomycetes from south india and south china. *Actinomycetes* 1996; **4**: 89-94.
- 23- Baras O., Gulluce M., Sahin F., Ozer H., Kilic H., Ozkan H., Sokmen M. and Ozbek T. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turk J Biol* 2006; **30**: 64-73.
- 24- Bettucci L., Semito S., Alonso R. and upo S. Endophytic fungi of twigs and leaves of three native species of Myrtaceae in Uruguay. *Sydowia* 2004; **58**: 8-23.
- 25- **Bhasin S., Cameotra S. S. and Modi H. A.** Actinomycetal diversity of western region of madhya pradesh. *Journal of Advances in Developmental Research* 2010; **1**: 132-138.
- 26- Botton B. Breton A., Fevre M., Guy P.H., Iarpent J.P., Sanglier J.J., Vayssier V. and Veau, P. Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. Masson 1990. pp. 20-191.
- 27- **Breed R.S.; Murray E.G.D. and Smith N.R.** Bergey's Manual of determinative bacteriology. 7 th ed. Williams & Wilkins, Baltiùore 1957; pp. 694-826.
- 28- Bussaban B., Lumyong S., Lumyong P., Mckenzie E. H. C. and Hyde K. D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. Can J Microbiol 2001; 47: 943-948.
- 29- Cannon P. F. and Simmons C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* 2002; **94**: 210-220.
- 30- Cao R., Liu X., Gao K., Mendgen K., Kang Z., Gao J., Dai Y. and Wang X. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Curr Microbiol* 2009; **59**: 584-592.

31- Carrim A. J. I., arbosa E. C. and Gonçalves J. D. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2006; **49**: 353-395.

- 32- Carroll F. E., MUller E. and Sutton B. C. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. *Sydowia* 1977; **29**: 87-103.
- 33- Carroll G. C. The biology efo endophytism in plants with particular reference to woody perenials. In: microbiology pf phylospher. Fokkinna N.J. Van Den Heuvel J. (eds). *Cambridge University press, Cambredge* 1986; *pp.* 205-222.
- 34- Carroll G. S. and Petrini O. Patterns of substrate utilization of fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 1983; **75**: 53-63.
- 35- Castillo U. F., Strobel G. A., Mullenberg K., Condron M. M., Teplow D. B., Folgiano V., Gallo M., Ferracane R., Mannina L., Viel S., Codde M., Robison R., Porter H. and Jensen J. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **255**: 296-300.
- 36- Castillo U., Harper J. K., Strobel G. A., Sears J., Alesi K., Ford E., Lin J., Hunter M., Maranta M., Ge H., Yaver D., Jensen J. B., Porter H., Robison R., Millar D., Hess W. M., Condron M. and Teplow D. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 224: 183-190.
- 37- Chaeprasert S., Piapukiew J., Whalley A. J. S. and Sihanonth A. Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: their antimicrobial and anticancer potentials. *Botanica Marina* 2010; **53**: 555-564.
- 38- Champion R. Identifier les champignons transmis par les semences. INRA edition 1997. P. 401
- 39- Choi Y. W., Hodgkiss I. J. and Hyde K. D. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology* 2005; 1: 55-66.
- 40- Clay K. and Leuchtmann A. Infection of woodland grasses by fungal endophytes. *Mycologia* 1989; **81:** 805-811.
- 41- Clay K. and Schardl C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *Am Nat* 2002; **160** Suppl 4: S99-S127.
- 42- Clay K. Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. *Nat Toxins* 1992; 1: 147-149.
- 43- Cohen S. D. Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelial compatibility. *European Journal of plant Plant Pathology* 2004; **110**: 713-721.
- 44- **Cohen S. D.** Host selectivity and genetic variation of *Discula umbrinella* isolated from two oak spacies: Analyses of intergenic spacer region sequences of ribosomal DNA. *Microbial Ecology* 2006; **52**: 463-469.
- 45- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C. and Barka E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 4951-4959.
- 46- Conn V. M. and Franco C. M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl Environ Microbiol* 2004; **70**: 1787-1794.

47- Coombs J. T. and Franco C. M. Isolation and Identification of Actinobacteria from Surface-Sterilized Wheat Roots. *Applied And Environmental Microbiology* 2003a; **69**: 5603-5608.

- 48- Coombs J. T. and Franco C. M. Visualization of an endophytic Streptomyces species in wheat seed. *Appl Environ Microbiol* 2003b; **69**: 4260-4262.
- 49- Cui H. B., Mei W. L., Miao C. D., Lin H. P., Hong K. and Dai H. F. Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium* sp.0935030 of mangrove plant *Acrostichum aureurm*. *Chemical Journal of Chinese Univer- sities* 2008; 33: 407-410.
- 50- Dababat A. A. F. A. and Sikora R. A. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 2007; **3**: 297-309.
- 51- Dai C. C., Yu B. Y. and Li X. Screening of endophytic fungi that promote the growth of Euphorbia pekinensis. African Journal of Biotechnology 2008; 7: 3505-3510.
- 52- Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T. A. and Linssen P. H. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agr* 1998; 77: 140-146.
- 53- Deshmukh S. K., Mishra P. D., Kulkarni-Almeida A., Verekar S., Sahoo M. R., Periyasamy G., Goswami H., Khanna A., Balakrishnan A. and Vishwakarma R. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. *Chem Biodivers* 2009; **6**: 784-789.
- 54- **Devaraju R. and Satish S.** Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian j exp biol sci* 2011; **2**: 75-79.
- 55- Devi P., D'Souza L., Kamat T., Rodriguez C. and Naik C. G. Batch culture fermentation of *Penicilium chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. *Indian Journal of Biotechnology* 2009; **38**: 38-44.
- 56- **Dharmaraj S. and Dhevendaran K.** Evaluation of *Streptomyces* as a probiotic feed for the growth of ornamental fish *Xiphophorus helleri*. *Food Technol Biotechnol* 2010; **48**: 497-504.
- 57- **Ding T., Jiang T., Zhou J., Xu L. and Gao Z. M.** Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Genet Mol Res* 2010; 9: 2104-2112.
- 58- **Dingle J. and McGee P. A.** Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. tritici in wheat. *Mycol Res* 2003; **107**: 310-316.
- 59- **Ebel R.** Secondary metabolites from marine-derived fungi. *In:* Proksch P. Müller W.E.G.(eds). *Frontiers in Marine Biotechnology*. Horizon Scientific Press, Norwich 2006; pp. 43-173
- 60- El-Gendy M. M. and El-Bondkly A. M. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic Streptomyces sp. Hedaya48. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; **37**: 831-841.
- 61- El-kady I. S., Mazen M. B. and Saber S. M. Some enzimatic activities of fungi isolated from cotton seeds and cotton seed products. *Qatar Univ Sci Bull* 1984; **4**: 85-93.
- 62- El-Shatoury S., Abdulla H., El-Karaaly O., El-Kazzaz W. and Dewedar A. Bioactivities of Endophytic Actinomycetes from Selected Medicinal Plants in the World Heritage Site of Saint Katherine, *Egypt. International Journal of Botany* 2006; **2**: 307-312.

63- **El-Tarabily K. A.** Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* 2008; **308**: 161-174.

- 64- Fang L., Ke L., Xiaoming L. and Bingui W. Chemical constituents of marine algal-derived endophytic fungus *Exophiala oligosperma* EN-21. *Chinese journal of oceanology and limnology* 2011; **29**: 63-67.
- 65- Faucher E., Paradis E., Goyer C., Hodge N. C., Hougue R., Stall R. E. and Beaulieu C. Characterization of streptomycetes causing Deep-pitted scab of potato in québec, canada. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1995; **45**: 222-225.
- 66- Fernandes M. D. R. V., Silva T. A. C., Pfenning L. H., Costa-Neto C. M. D. C., Heinrich T. A., Alencar S. M. D., Lima M. A. D. and Ikegaki M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 45: 677-685.
- 67- Gangadevi V., Murugan M. and Muthumary J. Taxol determination from *Pestalotiopsis pauciseta*, a fungal endophyte of a medicinal plant. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2008; **24**: 1433-1438.
- 68- Gao K. F., Dai C. C. and iu X. Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 2010; **4**: 1346-1351.
- 69- Gao K., Lui X., Kang Z. and Mendgen K. Mycoparasitism of *Rhizoctonia solani* by Endophytic *Chaetomium spirale* ND35:Ultrastructure and Cytochemistry of the Interaction. *First publ in: Journal of Phytopathology* 2005; **153**: 280-290.
- 70- Gayathri S., Saravanan D., Radhakrishnan M., Balaguruna R. and Kathiresan K. Bioprospecting potential of fast growing endophytic bacteria from leaves of mangrove and saltmarsh plant species. *India Journal of Biotechnology* 2010; 9: 402.
- 71- **Gehlot P., Bohra N. K. and Purohit D. K.** Endophytic mycoflora of inner bark of *Prosopis cineraria* a key stone free species of Indian desert. *American-Eurasian Journal of Botany* 2008; 1: 1-4.
- 72- Ghadin N., Zin N. M., Sabaratnam V., Badya N., Basri D. F., Lian H. H. and Sidik N. M. Isolation and characterization of a novel endophytic *streptomyces* SUK 06 With Antimicrobal Activity From Malaysian Plant. *Asian Journal of Plant Sciences* 2008; 7: 189-194.
- 73- **Ghimire S. R. and Hyde K. D.** Fungal endophytes. In: Plant Surface Microbiology. Varma, A., Abbott, L., Werner, D., and Hampp, R. (eds). *Springer Verlag* 2004; 281-288.
- 74- **Goggin F. L.** Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**: 399-408.
- 75- Gong l. J., Gou S. X. and . Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology* 2009; **8**: 731-736.
- 76- Gorden R. E. and Smith M. M. Proposed group of characters for the separation of *Streptomyces* and *Nocardia*. *J Bacteriol* 1954; **69**: 147-150.
- 77- **Guiraud J.P.** Techniques d'analyses microbiologiques. In: Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris.1998; pp.168-333.
- 78- **Guo B., Wang Y., Sun X. and Tang K.** Bioactive natural products from endophytes: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2008; **44**: 153-158.

79- **Guo L. D., Hyde K. D. and Liew E. C.** Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of Livistona chinensis based on rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2001; **20**: 1-13.

- 80- Guo L. D., Hyde K. D. and Liew E. C. Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytol* 2000; **147**: 617-630.
- 81- **Haggag W. M.** Role of Entophytic Microorganisms in Biocontrol of Plant Diseases. *Life Science Journal* 2010; 7: 57-62.
- 82- Hamayun M., Khan S. A., Iqbal I., Ahmad B. and Lee I. J. Isolation of a Gibberellin-producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and Growth Promotion of Crown Daisy (*Chrysanthemum coronarium*). *J Microbiol Biotechnol (2010)*, 2010; **20**: 202-207.
- 83- Harper J. K., Ford E. J., Strobel G. A., Arif A., Grant D. M., Porco J., Tomer D. P. and Oneill K. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* 2003; **59**: 2476.
- 84- Hasegawa S., Meguro A., Shimizu M., Nishimura T. and Kunoh H. Endophytic actinomycetes and fheir interactions with host plants. *Actinomycetologica* 2006; **20**: 72-81.
- 85- Hata K., Futai K. and Tsuda M. Seasonal and needle age-dependent changes of the endophytic mycobiota in *Pinus thunbergii* and *Pinus densiflora* needles. *Can J Bot* 1998; **76**: 245-250.
- 86- **Hawkswo D. L.** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 1991; **95**: 641-655.
- 87- He R. L., Wang G. P., Liu X. H., Zhang C. L. and Lin F. C. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. *African Journal of Biotechnology* 2009; **8**: 191-195.
- 88- Hoffman A. M., Mayer S. G., Strobel G. A., Hess W. M., Sovocool G. W., Grange A. H., Harper J. K., Arif A. M., Grant D. M. and Kelley-Swift E. G. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic Phoma species. *Phytochemistry* 2008; **69**: 1049-1056.
- 89- Holt J.G.; Krieg N.R.; Sneath P.H.A.; Staley J.T. and Williams S.T. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9 th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore 1994; pp. 605-619
- 90- **Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyde K. D., Corke H. and Sun M.** Biodiversity of endophytic fungi assosiated with 29 traditional chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 2008; **33**: 61-75.
- 91- Huang W. Y., Cai Y. Z., Hyhe K. D., Corke H. and Sun M. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007a; 23: 1253-1263.
- 92- Huang W. Y., Cai Y. Z., Xing J., Corke H. and Sun M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Springer* 2007b; **61**: 14-30.
- 93- **Hyde K. D. and Soytong K. D.** The fungal endophytes dilomma. *Fungal Diversity* 2008; **33**: 163-173.
- 94-**Igarashi Y.** Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. *Actinomycetologica* 2004; **18**: 63-66.

95- Igarashi Y., Trujillo M. E., Martinez-Molina E., Yanase S., Miyanaga S., Obata T., Sakurai H., Saiki I., Fujita T. and Furumai T. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete Micromonospora lupini sp. nov. *Bioorg Med Chem Lett* 2007a; 17: 3702-3705.

- 96- Inderiati S. and Muliani S. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes of tobacco plants . *Journal Agrisistem* 2008; 4: 89-100.
- 97- **Istifadah N. and McGee P. A.** Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australas Plant Path* 2006; **35**: 411-418.
- 98- Jalgaonwala R. E., Mohite B. V. and Mahajan R. T. Evaluation of endophytes for their antimicrobial activity from indigenous medicinal plants belonging to north maharashtra region india. *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research (IJPBR)* 2010; 1: 136-141.
- 99- **Janso J. E. and Carter G. T.** Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 4377-4386.
- 100- Jayapakasha G. K., Singh R. P. and Sakariah K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis Vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem* 2001; 73: 285-290.
- 101- **Kannan V. and Sureendar R.** Synergistic effect of beneficial rhizosphere microflora in biocontrol and plant growth promotion. *J Basic Microbiol* 2009; **49**: 158-164.
- 102- **Khamna S., Yokota A., Peberdy J. F.** and Lumyong S. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp.isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Eur Asian Journal of Biosciences* 2010; **4**: 23-32.
- 103- **Khamna S., yotoka A. and Lumyong S.** Actinobacteria isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; **25**: 649-655.
- 104- Seddik K., Nadjet I., Abderrahmane B., Daoud H. and Lekhmici A. Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* Asso. leaves and some phenolic compounds. *Journal of Medicinal Plants Research Vol* 2010; 4: 1273-280.
- 105- **Kumar D. S. S. and Hyde K. D.** Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii. Fungal Diversity* 2004; **17**: 69-90.
- 106- Kwon H. P., Son S. W., Han H. R., Choi G. J., Jang K. S., Choi Y. H., Lee S., Sung N. D. and Kim J.C. Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant Pathol J* 2007; 23: 318-321.
- 107- **Larpent J.P. and Larpent-Gourgaud M.** Manuel pratique de microbiologie. Hermann, Paris 1985; pp. 157-162.
- 108- Larran S., Perello A. and Simon M. R. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). World J Microbiol Biotechnol 2007; 23: 565-572.
- 109- Larran S., Perello A., Simon M. R. and Moreno V. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2002; **18**: 683-686.
- 110- Larran S., Perello A., Simon M. R. and Moreno V. The endophytic fungi from wheat (Triticum aestivum L.). *World J Microbiol Biotechnol* 2007; **23**: 565-572.

111- Larsen T. O., Smedsgaard J., Nielsen K. F., Hansen M. E. and Frisvad J. C. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat Prod Rep* 2005; **22**: 672-695.

- 112- Latch G. C. M., Hunt W. F. and Musgrave D. R. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1985; **28:** 129-132.
- 113- Lee J. Y., Lee J. Y., Jung H. W. and Hwang B. K. *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenoic acid. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; **55**: 257-262.
- 114- Lee S. O., Choi G. J., Choi Y. H., Jang K. S., Park D. J., Kim C. J. and Kim J. C. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to Plasmodiophora brassicae. *J Microbiol Biotechnol* 2008; **18**: 1741-1746.
- 115- Li E., Jiang L., Guo L., Zhang H. and Che Y. Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorg Med Chem* 2008; **16**: 7894-7899.
- 116- Li X. Streptomyces cellulolyticus sp. nov., a new cellulolytic member of the genus Streptomyces. International Journa off Systemathica Cteriology 1997; 47: 443-445.
- 117- Liu C., Liu T., Yuan F. and Gu Y. Isolating endophytic fungi from evergreen plants and determining their antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research* 2010; **4**: 2243-2248.
- 118- Liu X., Dong M., Chen X., Jiang M., Lv X. and Zhou J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; **78**: 241-247.
- 119- Lv Y. L., Zhang F. S., Chen J., Cui j. L., Xing Y. M., Li X. D. and Guo S. X. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated withthe alpine plant *Saussurea involucrata*. *Biol Pharm Bull* 2010; **8:** 1300-1306.
- 120- Madki M. A., Manzoor A. S., Powar P. V. and Patil K. S. Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from Withania Somnifera. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; **2**: 848-858.
- 121- Maria G. L., Sridhan K. S. and Raviraja N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophyticfungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology* 2005; 1: 67-80.
- 122- **Márquez S. S., Bills G. F. and Zabalgogeazcoa I.** The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata. Fungal Diversity* 2007; **27**: 171-195.
- 123- **Merzaeva O. V. and Shirokikh I. G.** The production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. *Appl Biochem Microbiol* 2010; **46**: 44-50.
- 124- **Mohanta S., harma G. D. S. and Deb B.** Diversity of endophytic diazotrophs in Non-Leguminous Crops A Review. *Assam University Journal of Science & Technology :Biological and Environmental Sciences* 2010; **6:** 109-122
- 125- Moon C. D., Guillaumin J. J., Ravel C., Li C., Craven K. D. and Schardl C. L. New neotyphodium endophyte species from the grass tribes stipeae and meliceae. *Mycologia* 2007; **99**: 895-905.
- 126- **Mukhtar I.** Influence of *Trichoderma* species on seed germination in okra . *Mycopath* 2008; **6**: 47-50.

127- **Myadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J. and Hotta K.** Digital Atlas of Actinomycetes.(Http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas). *The Society of Actinomycetes*. The Society of Actinomycetes Tokyo, Japan 2002.

- 128- Nadeem A., Hamayun M., Khan S. A., Khan A. L., Lee I. J. and Shin D. H. Gibberellin-producing endophytic fungi isolated from *Monochoria vaginalis*. *J Microbiol Biotechnol* 2010; **20**: 1744-1749.
- 129- Naik B. S., Shashikala J. and Krishnamurthy Y. L. Study on the diversity of endophytic communities from rice (Oryza sativa L.) and their antagonistic activities in vitro. *Microbiol Res* 2009; **164**: 290-296.
- 130- Nakashima T., Mayuzumi S., Inaba S., Park J. Y., Anzai K., Suzuki R., Kuwahara N., Utsumi N., Yokoyama F., Sato H., Okane I., Tsurumi Y. and Ando K. Production of bioactive compounds based on phylogeny in the genus *Penicillium* preserved at NBRC. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72: 3051-3054.
- 131- **Nedialkova D. and Naidenova M.** Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from antarctica. *Journal Of Culture Collections* 2005; 4: 29-35.
- 132- **Nimnoi P. and Pongsilp N.** Genetic diversity and plant-growth promoting ability of the indole-3-acetic acid (IAA) synthetic bacteria isolated from agricultural soil as well as rhizosphere, rhizoplane and root tissue of *Ficus Religiosa* L., *Leucaena Leucocephala* and *Piper Sarmentosum* Roxb. *Res J Agric Biol Sci* 2009; **5**: 29-41.
- 133- Nimnoi P., Pongsilp N. and Lumyoung S. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; **26**: 193-203.
- 134- **Nithyanand P. and Pandian S. K.** Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral Acropora digitifera from the Gulf of Mannar. *FEMS Microbiol Ecol* 2009; **69**: 384-394.
- 135- Nuangmek W., Mckenzie E. H. C. and Lumyong S. Endophytic fungi from wild banana. (*Musa acuminata. Colla*) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae.* Rsearch Journal of Microbiology 2008; **3**: 386-374.
- 136- **Ogundare A. O., Adetuyi F. C. and Akinyosoye F. A.** Antimicrobial activities of *Vernonia tenoreana*. *African Journal of Biotechnology* 2006; **5**: 1663-1668.
- 137- Oliveira M. F. D., Silva M. G. D., Sueli T. and Sand V. D. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology* 2010; **161**: 565-572.
- 138- Ownley B. H., Griffin M. R., Klingeman W. E., Gwinn K. D., Moulton J. K. and Pereira R. M. Beauveria bassiana: endophytic colonization and plant disease control. *J Invertebr Pathol* 2008; **98**: 267-270.
- 139- Ownley B. H., Gwinn K. D. and Vega F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 2010; **55**: 113-128.
- 140- Pal K. K. and Gardener B. M. Biological control of plant pathogens. *The plant health Instructor* 2006; DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- 141- Pandey B., Ghimire P. and garwal V. P. Studies on theantibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. *J Biol Sci* 2004; **23**: 44-53.

142- Parthasarathi S., Kim C. J., Kim P. K., Sathya S., Manikandan M., Manikandan T. and Karuppaiya B. Taxonomic characterization and UV/VIS analysis of antagonistic marine actinomycete isolated from South West Coast of South Korea. *Int J Med Res* 2010; 1: 99-105.

- 143- Paul N. C., Kim W. K., Woo S. K., Park M. S. and Yu S. H. Diversity of Endophytic Fungi Associated with Taraxacum coreanum and Their Antifungal Activity. *Mycobiology* 2006; **34**: 185-190.
- 144- Paul N. C., Kim W. K., Woo S. K., Park M. S. and Yu S. H. Fungal Endophytes in Roots of Aralia Species and Their Antifungal Activity. *Plant Pathol J* 2007; 23: 287-294.
- 145- Paulus B. C., Kanowski J., Gadek P. A. and Hyde K. D. Diversity and distribution of saprobic microfungi in leaf litter of an Australian tropical rainforest. *Mycol Res* 2006; **110**: 1441-1454.
- 146- **Persoh D., Melcher M., Flessa F. and Rambold G.** First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. austriacum and its host *Pinus sylvestris. Fungal Biol* 2010; **114**: 585-596.
- 147- **Pertrini O.** Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (Eds.), Microbial Ecology of Leaves. *Springer-Verlag, New York, USA*, 1991; pp. 179-197.
- 148- **Pertrini O.** Taxonomy of endophytci gungi of aerial plant tissues. In: Fokkinna N. J. Van Den Heuvel J. (eds). *Microbiologye of the fylosphere*. Cambredge University Press, Cmabredge 1986; *pp.* 175-187.
- 149- **Petrini O., Sieber T. N., Toti L. and Viret O.** Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1992; **1**: 185-196.
- 150- Photita W., Lumyong S., Lumyong P. and Hyde K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 2001; **105**: 1508-1513.
- 151- Pimentel I. C., Glienke-Blanco C., Gabardo J., Stuart M. R. and Azevedo J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* L.) Merril) under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2006; **49**: 705-711.
- 152- Pimentel M. R., Molina G., Dioniýsio A. P., Junior M. R. M. and Pastore G. M. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. *Biotechnology Research International* 2010; doi:10.4061/2011/576286.
- 153- Pitt J. I. and Hocking A. D. Fungi and food spoilage. *Academic press Inc.* Sydney. Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montréal, Tokyo **1985.** pp. 414.
- 154- **Pointing S. B.** Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity* 1999; **2**: 17-33.
- 155- **Prapagdee B., Kuekulvong C. and Mongkolsuk S.** Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int J Biol Sci* 2008; **4**: 330-337.
- 156- Qin J. C., Zhang Y. M., Gao J. M., Bai M. S., Yang S. X., Laatsch H. and Zhang A. L. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from Ginkgo biloba. *Bioorg Med Chem Lett* 2009a; 19: 1572-1574.
- 157- Qin S., Li J., Chen H. H., Zhao G. Z., Zhu W. Y., Jiang C. L., Xu L. H. and Li W. J. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of

tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied And Environmental Microbiology* 2009b; **75**: 6176-6186.

- 158- Qin S., Xing K., Jiang J. H., Xu L. H. and Li W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; **89:** 457-473.
- 159- Quecine M. C., Araujo W. L., Marcon J., Gai C. S., Azevedo J. L. and Pizzirani-Kleiner A. A. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in Applied Microbiology* 2008; 47: 486-491.
- 160- Qui M., Xie R. S., Shi Y., Zhang H. and Chen H. M. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Ann Microbiol* 2010; **60**: 143-150.
- 161- Rabah F. L., Elshafei A., Saker M., Cheikh B. and Hocine H. Screening, Isolation and characterization of a novel antimicrobial producing actinomycete, Strain RAF10. *Biotechnology* 2007; **6**: 489-496.
- 162- **Redlin S. C. and Carris L. M.** Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants. APS Press, Minnesota 1996.
- 163- **Remya M. and Vijayakumar R.** Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of india. *Medicine and Biology* 2008; **15**: 13-19.
- 164- Roberts C. A., Benedict H. R., Hill N. S., Kjallenbach R. L. and Rottinghaus G. E. Determination of ergot alkaloid content in tall fescue by near-infected spectroscopy. *Corp Science* 2005; **45**: 778-783.
- 165- Roberts C. and Andrae J. Tall fescue toxicosis and management. *Online Corp Management* 2004; doi: 10: 1094/CM-2004-0427-01-MG.
- 166- Rocha R., Luz D. E. D., Engels C., Pileggi S. A. V., Filho D. S. J. F., Matiello R. R. and Pileggi M. selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* 1.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.). *Brazilian Journal of Microbiology* 2009; **40**: 73-78.
- 167- **Rodriguez K. F. and Samuels G. D.** Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research* 1990; **94**: 827-830.
- 168- **Rodriguez K. F.** Fungal endophytes of palms. In: Redlin, S.C., Carris, L.M. (Eds.), *Endophytic Fungi in Grass and Woody Plants: Systematics, Ecology, and Evolution.* APS Press, St Paul, Minnesota, USA, 1996; *pp.* 31-65.
- 169- Rodriguez R. J., White Jr J. F., Arnold A. E. and Redman R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 2008; **182**: 314-330.
- 170- **Rosenblueth M. and Martinez-Romero E.** Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant Microbe Interact* 2006; **19**: 827-837.
- 171- **Roy B. D., Deb B. and Sharma G. D.** Role of Acetic Acid Bacteria in Biological Nitrogen Fixation. *Biofrontiers* 2010; **1**: 47-57.
- 172- **Saffo M. B.** Mutualistic Symbioses. *Wiley Online Library: Book Abstract* 2001; **DOI:** 10.1038/npg.els.0003281.
- 173- Saha D. C., Johnson-Cicalese J. M., Halisky P. M., van Heemstra M. L. and Funk C. R. Occurrence and significance of endophytic fungi in fine fescues. *Plant Disease* 1987; **71**: 1021-1024.

174- Saithong P., Panthavee W., Stonsaovapak S. and Congfa L. Isolation and primary identification of endophytic fungi from *Cephalotaxus mannii* trees. *Maejo Int J Sci Technol 2010*, 2010; **4**: 446-453.

- 175- **Sampson K.** Further observations on the systemic infection of Lolium. *Transactions of the British Mycological Society* 1938; **21**: 84-97.
- 176- **17Saurav K. and Kannabiran K.** Diversity and Optimization of process parameters for the growth of *Streptomyces* VITSVK9 spp. isolated from Bay of Bengal, India. *Journal of Natural & Environmental Sciences* 2010; **1:** 56-65.
- 177- Schulz B. and Boyle C. The endophytic continuum. Mycol Res 2005; 109: 661-686.
- 178- Seifried H. E., Anderson D. E., Fisher E. I. and Milner J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007; **18**: 567-579.
- 179- **Sekar S. and Kandavel D.** Interaction of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) and endophytes with Medicinal plants new avenues for Phytochemicals. *Journal of Phytology* 2010; **2**: 91-100.
- 180- **Shirling E. B. and Gottlied D.** Methods for characterization of streptomyces species. *In ter n a t i o n a l Journal of Sy s t e m a t i c Bacteriology* 1966; **16**: 313-340.
- 181- Shrivastava S., D'Souza S. F. and Desai P. D. Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (Kitasatospora sp.) for soil applications. *Current Science* 2008; **94**: 1595-1604.
- 182- **Sieber T. N.** Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *fungal biology reviews* 2007; **21**: 75-89.
- 183- **Sieber T. N., Sieber-Canaversi F. and Dorworth C. E.** Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaved and twijes in british columbia. *Canadien Journal of Botany* 1991; **69**: 407-411.
- 184- Sieber T., Riesen T. K., Muller E. and Fried P. M. endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing inresistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ. = *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *J Phytopathology* 1988; **122**: 289-306.
- 185- Silva C. F., Azevedo R. S., Braga C., Sliva R. D., Dias E. S. and Schwan R. S. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *agaricus brasiliensis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2009; **40**: 590-600.
- 186- Slippers B. and Wingfield M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *fungal biology reviews* 2007; **21**: 90-106.
- 187- Soltani A. A., Khavazi K., Asadi-Rahmani H., Omidvari M., Dahaji P. A. and Mirhoseyni H. Plant growth promoting characteristics in some *Flavobacterium* spp. Isolated from Soils of Iran. *Journal of Agricultural Science* 2010; 2: 106-115.
- 188- **Song J. H.** What's new on the antimicrobial horizon? *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32** Suppl **4**: S207-S213.
- 189- Song Y. C., Huang W. Y., Sun C., Wang F. W. and Tan R. X. Characterization of graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biological and PharmaceuticalBulletin* 2005; **28**: 506-509.
- 190- Sousa C. D. S., Soars A. C. F. and Garrido M. D. S. Characterization of streptomycetes with potential to promot plant growth and biocontrol. *Sci Agric* 2008; **65**: 50-55.

191- **Spiering M. J., Moon C. D., Wilkinson H. H. and Schardl C. L.** Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics* 2005; **169**: 1403-1414.

- 192- Srinivasan K., Jagadish L. K., Shenbhagaraman R. and Muthumary J. Antioxidant activity of endophytic fungus phyllosticta sp. isolated from *guazuma tomentosa*. *Journal of Phytology* 2010; **2**: 37-41.
- 193- Strobel G. A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect* 2003; 5: 535-544.
- 194- Strobel G. A. Microbial gifts from rain forests. Can J Plant Pathol 2002; 24: 14-20.
- 195- **Strobel G. A**. Muscodor albus and its biological promise. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006; **33**: 514-522.
- 196- Strobel G. A., Ford E., Worapong J., Harper J. K., Arif A. M., Grant D. M., Fung P. C. W. and Chan K. Ispoestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 2002; **60**: 179-183.
- 197- **Strobel G. and Daisy B.** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; **67**: 491-502.
- 198- **Strobel G., Daisy B. and Castillo U.** The biological Promise of Microbial Endophytes and their Natural Products. *Plant Pathology Journal* 2005; 161-176.
- 199- **Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J.** Natural products from endophytic microorganisms. *J Nat Prod* 2004; **67**: 257-268.
- 200- Su Y. Y., Guo L. D. and Hyde K. D. Response of endophytic fungi of Stipa grandis to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe, China. *Fungal Diversity* 2010; **43**: 93-101.
- 201- Sun Y., Cheng Z. and Glick B. R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium Burkholderia phytofirmans PsJN. *FEMS Microbiol Lett* 2009; **296**: 131-136.
- 202- Suryanarayanan T. S. and Kumaresan V. Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. *Mycological Research* 2000; **104**: 1465-1467.
- 203- Suryanarayanan T. S., Kumaresan V. and Johnson J. A. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Can J Microbiol* 1998; 44: 1003-1006.
- 204- Suryanarayanan T. S., Venkatesan G. and Murali T. S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. *Current Science* 2003; **85**: 489-92.
- 205- Suryanarayanan T. S., Wittlinger S. K. and Faeth S. H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycol Res* 2005; **109**: 635-639.
- 206- Suthep W., Nongluksna S., Wattana P., Nuntawan T., Kannawat D. K., Nijsiri R. and Vithaya. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2004; 20: 265-272.
- 207- **Sutjaritvorakul T., Sihanonth P. and Roengsumran S.** Antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from plant leaves in Dipterocarpous forest at Viengsa district Nan province, Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 2011; 7: 115-121.

208- Sutjaritvorakul T., Whalley A. J. S., Sihanonth P. and Roengsumran S. Antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from plant leaves in Dipterocarpous forest at Viengsa district Nan province, Thailand . *Journal of Agricultural Technology* 2010; 6: 309-315.

- 209- Taddei A., Rodriguez M. J., Marquez-Vilchez E. and Castelli C. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: morphological and biochemical studies. I. *Microbiol Res* 2006; **161**: 222-231.
- 210- **Taechowisan T. and Lumyong S.** Activity of endophytic actinomycetes from roots of *Zingiber officinale* and *Alpinia galanga* against phytopathogenic fungi. *Annals of Microbiology* 2003; **53**: 291-298.
- 211- Taechowisan T., Chuaychot N., Chanaphat S., Wanbanjob A. and Shen A. Anti-oxidative and inhibitory activity on nitric oxide production of flavonoids from *Streptomyces* sp. Tc052. *Journal of Pharmacy Research* 2009; 2: 313-316.
- 212- **Taechowisan T., Lu C., Shen Y. and Lumyong S.** Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology* 2005; **151**: 1691-1695.
- 213- Tan R. X. and Zou W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 2001; **18**: 448-459.
- 214- Taskin E., Eltem R., Silva E. S. D. and Souza J. V. B. D. Screening of *Aspergillus* strains isolated from vineyards for pectinase production. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 2008; 6: 412-414.
- 215- Taskin E., Eltem R., Silva E. S. D. and Souza J. V. B. D. Screening of *Aspergillus* strains isolated from vineyards for pectinase production. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 2008; 6: 412-414.
- 216- **Taylor J. E., Hyde K. D. and Jones E. B. G.** Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei* within and outside its natural geographic range. *New Phytologist* 1999; **142**: 335-346.
- 217- **Tejesvi M. V., Kini K. R., Prakash H. S., Subbiad V. and Shetty H. S.** Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity* 2007; **24:** 37-54.
- 218- Tejesvi M. V., Nalini M. S., Mahesh B., Prakash H. S., Kini K. R., Shetty H. S. and Subbiah V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Bol Soc Quím Méx* 2007; 1: 19-26.
- 219- **Thongchai T., Asawin W., Pittaya T. and Liu J**. Anti-inflammatory activity of lansais from endophytic *Streptomyces* sp. SUC1 in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Food and agricultural immunology* 2009; **20**: 67-77.
- 220- Tian X. I., Cao L. X., Tan H. M., Zeng Q. G., Jia Y. Y., Han W. Q. and Zhou S. N. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2004; **20**: 303-309.
- 221- **Tomita F.** Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity* 2003; **14**: 187-204.
- 222- Ulrich K., Ulrich A. and Ewald D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 2008; **63**: 169-180.

223- Verma V. C., Gond S. K., Kumar A., Mishra A., Kharwar R. N. and Gange A. C. Endophytic actinomycetes from Azadirachta indica A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microb Ecol* 2009; 57: 749-756.

- 224- Vijayakuman R., murugesan S. and Panneerselvan A. Isolation, characterization and antimicrobial activity of actinobacteria from point calimere coastal region, east coast of India. *International Research Journal of Pharmacy* 2010; 1: 358-365.
- 225- Wang F. W., Jiao R. H., Cheng A. B., Tan S. H. and Song Y. C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J Microbiol Biotech* 2007; 23: 79-83.
- 226- Weber D., Sterner O., Anke T., Gorzalczancy S., Martino V. and Acevedo C. Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant Erythrina crista-galli. *J Antibiot (Tokyo)* 2004; **57**: 559-563.
- 227- White J. F., Morgan-Jones G. and Morrow A. C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agric Ecosyst Environ* 1993; 44: 13-37.
- 228- **Wilson A. D.** Rosources and testing of endophyte-infected germplasm in national grass repository ellections. In: Redlin S.C. and Carris L.M.(eds). *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*. APS Press, Minnesota 1996; *pp.*179-195.
- 229- **Wilson D.** Endophyte-the evolution of a term, a clarification of its use and definition. *Oikos* 2005; **73**: 274-276.
- 230- Wu C. H., Bernard S. M., Andersen G. L. and Chen W. Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microb Biotechnol 2009 Jul;* 2009; 2: 428-40.
- 231- Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P. and Qin L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* 2009; doi:10.1016/j.micres.2009.11.009.
- 232- Yuan Z. L., Zhang C. L., Lin F. C. and Kubicek C. P. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (Oryza granulate) from a nature reserve in Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 1642-1652.
- 233- **Zabalgogeazcoa I.** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2008; **6**: 138-146.
- 234- Zaitlin B., Watson S. B., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res J Can* 2003; **95**: 113-118.
- 235- Zamora P., Martinez-Ruiz C. and Diez J. J. Fungi in needles and twigs of pine plantations from northern Spain. *Fungal Diversity* 2008; **30**: 171-181.
- 236- Zhang H. W., Song Y. C. and Tan R. X. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep* 2006; **23**: 753-771.
- 237- Zhang Y., Mu J., Feng Y., Kang Y., Zhang J., Gu P. J., Wang Y., Ma L. F. and Zhu Y. H. Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy. *Mar Drugs* 2009; 7: 97-112.
- 238- Zhao J., Mou Y., Shan T., Li Y., Zhou L., Wang M. and Wang J. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from Paris polyphylla var. yunnanensis. *Molecules* 2010; **15**: 7961-7970.

239- Zhao K., Penttinen P., Guan T., Xiao J., Chen Q., Xu J., Lindström K., Zhang L., Zhang X. and Storbel G. A. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Curr Microbiol* 2011; **62**: 182-190.

- 240- **Zhou D. and Hyde K. D.** Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* 2001; **105**: 1449-1457.
- 241- Zin N. M., Sarmin N. I., Ghadin N., Basri D. F., Sidik N. M., Hess W. M. and Strobel G. A. Bioactive endophytic *streptomycetes* from the Malay Peninsula. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 274: 83-88.



الملحق (1) قائمة الأوساط

Yeast Extract-Malt Extract Ag	gar (YMA):
Yeast extract	3.0 g
Malt extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Glucose	10.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml
YeastExtract-Malt Extract Brown	oth (YMB):
Yeast extract	3.0 g
Malt extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Glucose	10.0 g
Distilled water	1000 ml
Glucose yeast extract peptone	
Glucose	1 g
Peptone	0.5 g
Yeast extract	0.1 g
Agar	16 g
Distilled water	1000 ml
PH	6
Casein Agar:	
Skimmilk powder	10 g
Distilled water	90 ml
Agar	3 g
Distilled water	97 ml
Cellulose Agar (CA): basal Ga	
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO4 .7H ₂ O	0.5 g
KNO_3	1 g
Nacl	0.5 g
FeSO ₄ 2H ₂ O	0.01 g
Agar	25 g
Carboxymethyl cellulose	1%
Distilled water	1000 ml
Cellulolysis basal medium (CB	
$C_4H_{12}N_2O_6$	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgS0 ₄ · 7H2O Yeast Extract	0.5 g
CaC1 ₂ .2H ₂ O	0.1 g
Distilled water	0.001 g 1000 ml
	1000 1111
<u>peptone agar:</u>	10 g
Peptone Nacl	10 g 5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.1g
Agar	0.1g 16g
Distilled water	1000 ml
Pikovskaya (PKV):	1000 1111
1 1110 1 311u 1 u (1 11 1)	

Glucose	10g
$(NH4)_2SO_4$	0.5g
Yeast extract	0.5g
KCL	0.2g
NaCl	0.2g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002g
MnSO ₄ . H ₂ O	0.002g
$Ca_3(PO4)_5$	5g
Distilled water	1000 ml
Potato Sucrose Agar (PSA):	
Potatoes	200 g
Sucrose	20 g
Agar	20 g
Distilled water	1000 ml
Potato Dextrose Broth(PDB):	
Potatoes	200 g
Glucose	10 g
Distilled water	1000 ml
Starch Casein Agar (SCA):	
Sooluble starch	10 g
Casien	0.3 g
KNO_3	2 g
NaCl	2 g
K_2HPO_4	2 g
$MgSO4.7H_2O$	0.05 g
$CaCO_3$	0.02 g
$FeSO_4.7H_2O$	0.01 g
Agar	18 g
Distilled water	1000 ml
PH	7.2
Potato Dextrose Agar (PDA):	
Potatoes	200 g
Glucose	10 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
Nutrient broth (NB):	10 ~
Peptone Veget extract	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl Distilled water	5 g
Distilled water	1000 ml
pH Nutrient agan (NA):	7,2
Nutrient agar (NA):	10 α
Peptone Vanat sytraat	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl Distilled water	5 g
	1000 ml
Agar	18 g
pH Malt Extract Agar(MEA)	7,2
Malt Extract Agar(MEA): Malt extract	20 α
iviait extract	20 g

D 4	1
Peptone	1 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Distilled water	1000 ml
czapek yeast agar (CYA):	
K ₂ HPO ₄	1 g
Czabek cincentrate	(الملحق 2) 10 ml
Yeast extract	5 g
Sucrose	30 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
Inorganic salts-starch agar (IS	
Soluble starch	
	10 g
K_2HPO_4	1 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
$(NH4)_2SO_4$	2 g
$CaCO_3$	2 g
Trace salts solution	(الملحق 2) 1 ml (
Distilled water	1000 ml
Agar	20 g
pН	7,0-7,4
Yeast extract-malt extract aga	<u> </u>
Yeast extract	4 g
Malt extract	10 g
Glucose	4 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000 ml
рН	7,3
Glycerol-asparagine agar (IPS	
L-asparagine	1 g
Glycerol	10 g
K ₂ HPO ₄ anhydrous	1 g
Distilled water	1000 ml
Trace salts solution	(الملحق 2 ml (2
Agar	20 g
рĤ	7,0-7,4
Tyrosine agar (IPS7):	
Glycerol	15 g
L-tyrosine	0.5 g
L- asparagine	1 g
K_2HPO_4 anhydrous	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01 g
Distilled water	1000 ml
Trace salts solution	(الملحق 2 1ml)
Agar	20 g
pН	7,2-7,4

Basal mineral salts agar (ISP9):	
$(NH4)_2SO_4$	2.64 g
KH ₂ PO ₄ anhydrous	2.38 g
$K_2HPO_4.3H_2O$	5.65 g
$MgSO_4$. $7H_2O$	1 g
Pridham and Cottliebtrace	(الملحق2 ml (2
salts	
Distilled water	1000 ml
Agar	15g
pН	6,8-7,0
Pridham and Cottlieb trace salt	<u>s :</u>
$CuSO_4$.5 H_2O	0.64g
$FeSO_4$. 7 H_2O	0.11g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.79g
$ZnSO_4.7H H_2O$	0.15 g
Distilled water	100 ml
Basal mineral:	
$(NH4)_2HPO_4$	1 g
KCl	0.2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml
Mannitol-Mobility (Guiraud, 19	<u>98):</u>
Peptone	20 g
Potassium nitrate	1 g
Mannitol	2 g
Phenol Red	40 mg
Distilled water	1000 ml
Agar	4 g
рĤ	8,1
Meat liver agar (MLA):	
Meat extract	10 g
Peptone	20 g
Yeast extract	10 g
Glucose	5 g
Distilled water	1000 ml
Agar	20 g
рĤ	7,6

الملحق (2) قائمة المحاليل

Czabek concentrate:

NaNO3	30 g
Kcl	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Water	100 ml

Trace salts solution:

FeS04. 7H ₂ O	0.1 g
$MnCl_2.4H_2$	0.1 g
$ZnSO_4.7H_2O$	0.1 g
Distilled water	100 ml

Pridham and Cottlieb trace salts:

CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.64g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0.11g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.79g
ZnSO ₄ .7H H ₂ O	0.15 g
Distilled water	100 ml

Carbol Fuchsin in Ziehl-Neelsen Staining:

(solution A)	10 ml
(solution B)	90 ml

(solution A):

Fuchsine basic 3 g

Ethyl alcohol 95 % until 100 ml

Dye was filtred before use.

Aqueous solution of phenol (solution B):

Phenol 5 g
Distilled water until 90 ml

phenol is liquefied in a vial by a gentle heating in a water bath.

Methylen bleu contertsain solution:

Methylen bleu 0,3 g
Distilled water until 100 ml

Decolouring solution of Ziehl-Neelson Stain:

Methylen bleu 10 g Absolute ethyl alcohol 300 ml Sulfuric acid 60° 200 ml Distilled water 500 ml

Decolouring solution Modified Ziehl-Neelsen Stain

HCl (35%) 3 ml Ethyl alcohol (95%) 97 ml

الملحق (3) الملحق المختلف العزلات الفطرية و البكتيرية المجدول 17: جدول تحليل تغيرات النشاطية المضادة للأكسدة

Source	Sum of Squares (SS)	DF	Mean Square(MS)	F Value(FV)
Corrected	28635.50700	38	• ` ` ` ` `	
Total				
Samples	27548.98431	12	2295.74869	54.94***
Error	1086.52269	26	41.78933	

DF: درجة الحرية.

*وجود فرق معنوي في النشاطية الإنزيمية بين مختلف العزلات (P<0.05)**)

الجدول 18: جدول تحليل تغيرات النشاطيات الإنزيمية لمختلف العزلات الفطرية و البكتيرية.

				Source	
Enzim	atic activity	Sum of Squares(SS)	DF	Mean Square(MS)	F Value(FV)
Esterase	Corrected Total	20.36847943	29		
(T80)	isolates	20.26147943	9	2.25127549	420.80***
	Error	0.10700000	20	0.00535000	
Lipase	Corrected Total	53.54864262	29		
(T20)	isolates	52.85610639	9	5.87290071	169.61***
	Error	0.69253623	20	0.03462681	
Amylase	Corrected Total	95.43955688	29		
(Strach)	isolates	90.76057172	9	10.08450797	43.11***
	Error	4.67898516	20	0.23394926	
Amylase	Corrected Total	50.04617430	29		
(Dextrine)	isolates	46.21363310	9	5.13484812	26.80***
	Error	3.83254120	20	0.19162706	
Protease	Corrected Total	14.90864498	8		
(Casein)	isolates	9.90300534	2	4.95150267	5.94*
	Error	5.00563964	6	0.83427327	
Protease	Corrected Total	7.60385901	20		
(Gelatin)	isolates	7.59599598	6	1.26599933	2254.09***
	Error	0.00786303	14	0.00056165	

DF: درجة الحرية.

وجود فرق معنوي في النشاطية الإنزيمية بين مختلف العزلات (P<0.05)، P<0.001***)

الجدول 16: نتائج تأثير مستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم على نمو مختلف البكتيريا و الفطريات الممرضة المختبرة.

Zone of inhibition (mm)(mean)

	Phytophtora infestans	Fusarium oxysporium F.sp .albidinis	Candida albicans	pseudomonas sp.	Citrobacter freundii	Stenotrophomonas maltophilia	klebsiella pneumoniae	Pseudomonas	Enterobacter agglomeran	Serratia marcescens	Escherichia coli	Salmonella typhimurium	Enterococcus faecalis	Staphylococcus aureus	Bcillus sp	a	Pathogenic Micro-organisms	
	8,0	7,0	20,7	9,3	1,7	0,0	12,0	6,0	2,3	14,3	18,3	14,3	11,7	12.0	11,7	Ethyle acétate	Altern	
	5,0	4,0	6,0	0,0	7,0	2,3	7,0	14,0	7,0	7,0	5,0	13,0	0,0	11.0	13,0	Chloro- forme	Alternaria sp.	
	10,0	0,0	15,0	9,0	1,0	12,0	9,7	0,0	11,0	10,7	16,0	12,3	10,3	10.7	10,7	Ethyle acétate	Cladosporium sp.	
	5,0	0,0	5,5	12,0	0,0	0,0	9,7	15,0	0,0	10,0	0,0	11,0	0,0	15.7	14,0	Chloro- forme	rium sp.	
	14,0	19,0	23,0	9,0	3,3	12,3	13,0	4,0	3,3	12,0	25,3	14,3	12,7	13.0	13,7	Ethyle acétate	Penicili	Extı
	7,0	12,0	6,0	12,0	7,0	5,0	10,0	16,0	9,0	13,0	8,0	17,0	0,0	15.5	17,0	Chloro- forme	Penicilium sp. 1	Extracts
	17,0	11,0	20,0	10,3	2,3	11,7	12,0	2,0	2,3	12,0	19,0	11,3	12,0	10.7	13,0	Ethyle acétate	Penicili	
كررات.	10,0	7,0	7,0	13,0	2,0	0,0	10,0	15,0	0,0	7,5	0,0	20,0	0,0	14.0	21,5	Chloro- forme	Penicilium sp.2	
ىدل ئالات ،	16,0	17,0	13,0	11,3	4,3	13,3	11,7	1,8	3,3	11,3	21,7	13,3	11,3	11.7	11,7	Ethyle acétate	Aspers	
(mean): معدل ثلاث مكررات	9,0	10,0	5,0	10,0	0,0	0,0	7,0	11,0	0,0	0,0	7,0	15,0	0,0	7.5	16,5	Chloro- Forme	Aspergillus sp.	

الجدول 16: نتائج تأثير مستخلصات الإيثيل أسيتات و الكلوروفورم على نمو مختلف البكتيريا و الفطريات الممرضة المختبرة (تابع).

				Zone	of inhibit exti	Zone of inhibition (mm)(mean)	(mean)			
Pathogenic Micro-organisms	Chaetor	Chaetomium sp.	Phon	Phoma sp.	Strepton	Streptomyces sp. 1	Streptom	Streptomyces sp. 2	Streptomyces sp. 3	0
MICTO-OT GAILSINS	Ethyle	Chloro-	Ethyle	Chloro-	Ethyle	Chloro-	Ethyle	Chloro-	Ethyle	
	acétate	forme	acétate	forme	acétate	forme	acétate	forme	acétate	()
Bcillus sp.	12,0	23,0	0,0	13,0	12,0	12,0	0,0	0,0	16,0	
Staphylococcus aureus	9,7	6,0	0,0	12,0	0,0	15,0	0,0	15,0	0,0	
Enterococcus faecalis	11,7	0,0	13,0	0,0	0,0	16,0	0,0	16,5	0,0	
Salmonella typhimurium	11,7	20,0	10,0	12,0	0,0	8,0	0,0	11,0	11,0	
Escherichia coli	20,0	0,0	15,0	0,0	24,5	15,5	13,0	16,5	15,3	
Serratia marcescens	10,7	9,0	11,0	8,0	17,0	15,0	13,0	16,0	14,0	
Enterobacter agglomeran	2,3	0,0	10,0	8,0	13,0	15,0	10,0	15,0	9,0	
Pseudomonas aerugenosa	0,0	13,0	4,0	13,0	0,0	16,0	0,0	15,0	17,0	
klebsiella pneumoniae	12,7	0,0	14,0	7,0	0,0	4,0	0,0	6,0	0,0	
Stenotrophomonas maltophilia	0,0	0,0	10,0	3,0	0,0	11,3	0,0	13,0	10,0	
Citrobacter freundii	1,7	0,0	4,7	5,0	0,0	5,0	0,0	6,5	0,0	
pseudomonas sp.	7,7	0,0	7,7	11,0	14,0	14,0	0,0	14,0	0,0	
Candida albicans	15,0	4,5	14,0	7,0	19,0	13,5	25,0	17,0	16,0	
Fusarium oxysporium F.sp .albidinis	10,0	6,0	15,0	7,0	12,0	10,0	15,0	12,0	0,0	
Phytophtora infestans snn.	10,0	7,0	0,0	0,0	16,0	14,0	14,0	13,0	15,3	

(mean): معدل ثلاث مكررات.

الملحق ____