عزل إنزيم البكتينيز المنتج بواسطة الفطر *Penicillium* spp. المسبب لمرض تعفن ثمار الحمضيات وتقييم كفاءة بعض مثبطاته للسيطرة على المرض

عوف عبد الرحمن أحمد الجبوري*، خلف عطيه محمد وصالح محمد إسماعيل

قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تكريت، العراق.

*البريد الالكتروني للباحث المراسل: Awfabd91@tu.edu.iq

الملخص

الجبوري، عوف عبد الرحمن أحمد، خلف عطية محمد وصالح محمد إسماعيل. 2023. عزل إنزيم البكتينيز المنتج بواسطة الفطر *Penicillium* spp. المسبب لمرض تعفن ثمار الحمضيات وتقييم كفاءة بعض مثبطاته للسيطرة على المرض. مجلة وقاية النبات العربية، 41(2): 190–196.
https://doi.org/10.22268/AJPP-41.2.190196

أجريت هذه الدراسة خلال الفترة 2021–2022 لمعرفة تأثير بعض المواد الكيميائية في تثبيط إنزيم البكتينيز المنتج من قبل الفطر *Penecillium* spp. بينت النتائج أن أقل فعالية إنزيمية كانت في المعاملة التي استُخدِمت فيها جميع المواد المثبطة للإنزيم بنصف التركيز 2.5%، حيث بلغت الفعالية الإنزيمية 0.01 وحدة/مل مقارنةً بـ 0.2 وحدة/مل في معاملة الإنزيم الخام. عند استخدام المثبطات المختلفة إفرادياً، تفوّقت معاملة كلوريد الكالسيوم عند التركيز 5% وأعطت فعالية إنزيمية بمقدار 0.03 وحدة/مل، أما في ما يخص الفعالية المتبقية فقد بيّنت النتائج أن أقل فعالية متبقية كانت في المعاملة التي استُخدِمت فيها جميع المواد المثبطة للإنزيم بنصف التركيز 2.5%، حيث بلغت الفعالية المتبقية 5% مقارنة بـ 100% في معاملة الإنزيم الخام، مما يدلّ على فقدان 95% من فعالية الإنزيم المنتَج. أما فيما يخصّ المعاملات المفردة للمثبطات، فقد تفوّقت معاملة كلوريد الكالسيوم عند استخدامها بتركيز 5% وأعطت فعالية متبقية مقدارها 15%، وهذه دلالة على فقدان الإنزيم لـ 85% من فعاليته الإنزيمية، وفيما يخصّ تأثير المثبطات المختلفة، فقد تفوق كلوريد الكالسيوم أيضاً عند التركيز 5% على بقية المعاملات من خلال تحقيقه لأقلّ نموّ قطري للفطر الممرض والذي بلغ 0 سم مقارنة بـ 9 سم في معاملة الشاهد. كما حقّقت معاملة كلوريد الكالسيوم تثبيطاً في نسبة وشدة إصابة ثمار الحمضيات بمعدل 30 و 59%، على التوالي، في حالة تخديش الثمار بينما انخفضت إلى 10 و 22% في حالة كون الثمار غير مخدشة. كما انخفضت نسبة وشدة الإصابة عند استخدام جميع المثبطات بأنصاف التراكيز 2.5% إلى 20 و 26.6% في حالة تخديش الثمار وإلى 0 و 0 في حالة عدم تخديش الثمار.

كلمات مفتاحية: فطر البنسليوم، تعفن ثمار الحمضيات، إنزيم البكتينيز، الحمضيات.

المقدمة

يعدّ البرتقال (*Citrus sinensis*) من أهم المحاصيل الزراعية وذلك لقيمته الغذائية العالية (خفتة، 2019)، ويبلغ الإنتاج العالمي للحمضيات 123 مليون طن سنوياً. تتصدّر الصين دول العالم في إنتاج الحمضيات (Palou *et al.*, 2015). وفي العراق، بلغ الإنتاج السنوي للبرتقال 142,717 طناً والليمون الحامض 5,375 طن بينما الليمون الحلو 1,388 طن كذلك بلغ إنتاج اللالنكي (اليوسفي) 4,494 طن فيما بلغ إنتاج النارنج 22,143 طن من إجمالي إنتاج الحمضيات (الجهاز المركزي للإحصاء، 2020). يواجه هذا المحصول مشاكل عدة أثناء الجني والنقل والتخزين، ومن أهمّها الإصابات الفطرية، حيث ينضج ويجنى المحصول في ظروف بيئية ملائمة لنمو العديد من المسببات المرضية الفطرية (خفتة، 2019). تصاب ثمار الحمضيات في الحقل وبعد قطافها وأثناء تخزينها في ظروف غير ملائمة بعدّة مسببات مرضية، ويعدّ الجنس *Penicillium* الأكثر انتشاراً وشيوعاً، وتصاب الحمضيات بأربعة أنواع من هذا الجنس والتي تختلف في نسبة إصابتها للثمار؛ إلاّ أن أكثرها إحداثاً للضرر هما النوعين *Penicillium digitatum* و *Penicillium italicum* (Boubaker *et al.*, 2009؛ Louw & Korsten, 2015). يفرز الفطر *Penicillium* spp. عدّة أنواع من السموم يطلق عليها yellowtoxins، citriovirdin، citrinin، Cyclochlortin و Luteoskyrin مسببة أمراضاً مختلفة أهمها تلف الكبد واضطرابات الجهاز العصبي وجهاز الدوران وغيرها (Agrios, 2005). يستخدم هذا الفطر الجروح الطبيعية الناتجة أثناء القطاف والنقل والتخزين كمدخل لإحداث الإصابة، كما ينتج هذا الفطر إنزيمات البكتينيز عند مهاجمة النسيج النباتي الحاوي على البكتين والذي هو عبارة عن سكريات متعددة حمضية عالية الوزن الجزيئي، تركيبها الأساسي هو جزيئات

https://doi.org/10.22268/AJPP-41.2.190196
© 2023 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

D-galacturonic acid مرتبطة مع بعضها برابطة من نوع α 1-4 (Venugopal *et al.*, 2007)، حيث تعمل إنزيمات البكتينز على كسر الرابطة الجلايكوسيدية لسلسلة الكربون الطويلة محولةً إيّاها إلى وحدات مفردة من حمض الجالكتورونك (Dalvi & Anthappan, 2006؛ Natalia *et al.*, 2004)؛ ونتيجةً لما سبق توجه الباحثون في السنوات الأخيرة نحو دراسة عوامل إمراضية المسببات المرضية محاولين تثبيط تلك العوامل من أجل إيقاف نمو المسبب المرضي وتقليل قدرته على إحداث الإصابة. لذلك هدفت هذه الدراسة إلى معرفة تأثير بعض العوامل الكيميائية في تثبيط إنزيم البكتينز المنتج بواسطة فطر الـ *Penicillium* وبالتالي تقليل قدرته على النمو وإحداث الإصابة.

مواد البحث وطرائقه

تحضير الوسط الزرعي

تمّ جمع عينات من البرتقال المصابة بفطر البنسيليوم (*Penicillium* spp.) إذ حُضر الوسط الزرعي من خلال أخذ 39 غ من الوسط الزرعي Potato Dextrose Agar، ثم أضيف إليه الماء المقطر بحجم لتر واحد، وتمّت إذابة الوسط بواسطة جهاز التحريك المغناطيسي حتى تمام الذوبان. قُسّم المحلول على أربعة دوارق سعة كلّ منها 500 مل وبمعدل 250 مل لكل دورق، ثم أغلقت فوهاتها بإحكام بإستخدام سدادات قطنية وأدخلت للتعقيم في جهاز المؤصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121°س وضغط 1.5 كغ/سم^2 ولمدة خمس عشرة دقيقة. بعد انتهاء فترة التعقيم تمّ إخراج الدوارق وتركت عند حرارة المختبر لتبرد، ثم تمّت إضافة المضاد الحيوي Chloramphinicol إلى الوسط الزرعي قبل تصلبه بمقدار 250 ملغ/لتر، وصُبّ الوسط في أطباق بتري قطر 9 سم، وبعد تصلب الوسط حُفظت الأطباق لحين الاستخدام.

عزل الفطر الممرض *Penecillium* spp.

أجريت عملية العزل من خلال أخذ مسحات وقطع أجزاء من قشور ثمار الحمضيات (البرتقال) المصابة بالفطر الممرض، ثم تمّت زراعتها في أطباق بتري قطر9 سم والحاوية على الوسط الزرعي PDA. بعد ذلك أدخلت الاطباق إلى الحاضنة عند درجة حرارة 25±2°س ولمدة 7 أيام، ومن ثمّ تمّت تنقية العزلة الفطرية بأخذ جزء من طرف المستعمرة الفطرية وزراعته في أطباق بتري جديدة وإدخالها إلى الحاضنة أيضاً عند حرارة 25±2°س ولمدة 7 أيام للحصول على مزرعة فطرية نقية، وتمّ تشخيصها وفق المفاتيح التشخيصية بدلالة لون المستعمرة وطبيعة النمو وشكل وتفرعات الحامل الكونيدي (Pitt, 1979؛ Sgroi *et al.*, 2015).

تقدير نشاط إنزيم البكتينيز

تنمية الفطر *Penicillium* spp. على الوسط تشابك دوكس المدعَّم بالبكتين

قُدر إنزيم البكتينيز المنتج من عزلة الفطر *Penicillium* spp. المعزول من ثمار الحمضيات المصابة، إذ استخدم الوسط السائل تشابك دوكس (CD) والمحضر حسب طريقة Lakshmikanth *et al.* (2006)، وذلك بإذابة 0.02 غ من كبريتات الحديد ($FeSO_4$) و0.5 غ من كبريتات المغنسيوم ($MgSO_4$) و0.5 غ من كلوريد البوتاسيوم (KCl) و 1غ من فوسفات البوتاسيوم أُحادية الهيدروجين (K_2HPO_4) و 5 غ من كلوريد الصوديوم (NaCl) و 1 غ من كبريتات الأمونيوم في 1 ليتر ماء مقطر. تمّ تدعيم الوسط بـ 5 غ من البكتين النقي كمصدر وحيد للكربون، وقُسم الوسط بمعدل 200 مل لكل دورق وبواقع 5 دوارق سعة 250 مل، أدخلت للتعقيم بالمؤصدة (Autoclave) حسب الظروف القياسية عند درجة حرارة 121°س وضغط 1.5 كغ/سم^2 ولمدة 15 دقيقة. بعد إنتهاء مدة التعقيم بُرّد الوسط، ولُقّحت الدوارق بعدها بقطعة (1 سم^2) من مستعمرة الفطر النشطة والتي لا يتجاوز عمرها 3 أيام. أدخلت الدوارق المُلقّحة في الحاضنة عند حرارة 25±2 °س ولمدة 15 يوم مع مراعاة التحريك الدائم للوسط لنحصل على نمو فطري متجانس (Hitha & Girija, 2012).

الحصول على إنزيم البكتينيز الخام

تمّ الحصول على إنزيم البكتينيز الخام بعد ترشيح وسط تشابك دوكس بإستخدام ورق الترشيح المعروف بـ Whattman No.1 من خلال وضع الوسط في قمع بخنر موصول بجهاز تفريغ كهربائي ومن ثم جمع راشح الوسط الحاوي على الإنزيم في دورق خاص. بعد ذلك أُجريت عملية النبذ للراشح بسرعة 5000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق. تم اهمال الراسب الذي يمثل الشوائب الموجودة في الوسط، وجُمع الرائق الذي يمثل إنزيم البكتينيز الخام الذي تمّ الإحتفاظ به في الثلاجة عند حرارة 4°س لحين الإستخدام.

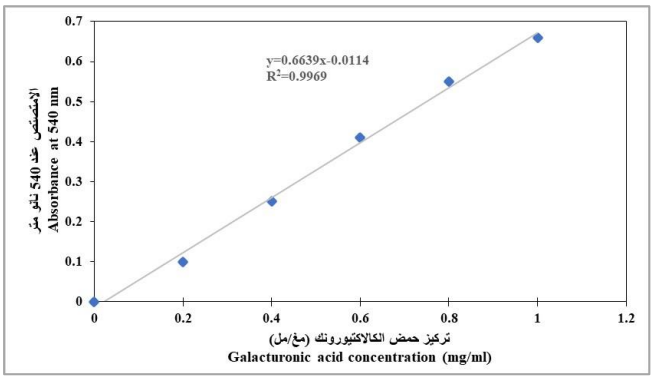
قياس فعالية إنزيم البكتينيز

قيست الفعالية الإنزيمية للبكتينيز باتباع الطريقة الموصوفة من قبل Tweddell *et al.* (1994)، حيث أضيف 1 مل من محلول الفوسفات المنظم بدرجة حموضة 6 مغ 1 مل من الراشح الإنزيمي الخام للبكتينيز مع 1 مل من محلول البكتين النقي لتكوين مزيج التفاعل؛ وبعدها، تمّ تحضين المزيج عند حرارة 30°س ولمدة ساعة، ثمّ أضيف إليه 1 مل من محلول DNS (المحضر من إذابة 5 غ من Di-Nitro Salicylic acid في 100 مل ماء مقطر)، وأدخل للتحضين مرةً أخرى في الحمام المائي المغلي لمدة 5 دقائق. بُرّدت أنابيب الإختبار

بإستخدام ماء الحنفية، وتمّ قياس الامتصاصية عند طول موجة 540 نانومتراً باستعمال جهاز المطياف الضوئي، وتمّ الاعتماد بعد ذلك على منحنى حمض الجالكتورونك القياسي في تقدير الفعالية الإنزيمية للبكتينيز، وهي كمية الإنزيم اللازمة لتحرير 1 ميكرومول من حمض الجالكتورونك في الدقيقة الواحدة وحسب ظروف التجربة المستخدمة.

منحنى حمض الجالكتيورونك القياسي

حُضّرت التراكيز 0، 0.2، 0.4، 0.6، 0.8 و 1.0 مغ/مل من حمض الجالكتورونك، ثم أضيف لكلّ تركيز منها 1 مل من محلول DNS، وأدخلت في حمام مائي مغلي عند حرارة 100°س لمدة 5 دقائق، ثم أخرجت أنابيب الاختبار الزُجاجية وبرّدت وقِيست إمتصاصيتها في جهاز قياس المطياف الضوئي عند طول موجة 540 نانومتراً، ثمّ سجّلت قيم إمتصاصيتها ورُسمت وأعطت شكل المنحنى من خلال مقاطعتها مع تراكيز حمض الجالكتورونك (شكل 1).



شكل 1. رسم بياني قياسي يحدد العلاقة بين كثافة امتصاص الأشعة عند موجة 540 نانومتر وتركيز حمض الجالكتورونيك (مغ/مل).

Figure 1. Standard curve identifying the relationship between light absorbance at 540 nm wavelength and concentration of galacturonic acid (mg/ml).

تثبيط أنزيم البكتينز المنتج بواسطة الفطر بنسيلوم بواسطة بعض المواد الكيميائية

تمّ تحضير تركيزين (2.5% و 5.0%) لكلٍّ من المواد المثبطة التالية: شمع البرافين، وكلوريد الكالسيوم، وبيروكسيد الهيدروجين، وهيبوكلوريت الصوديوم، أما المعاملة التاسعة فاحتوت على مزيجٍ من جميع المثبطات بتركيز 2.5%، وتركت المعاملة العاشرة بدون اضافات كشاهد. أحضرت 10 أنابيب اختبار وأضيف لكل أنبوبة منها 0.5 مل من الراشح الإنزيمي و0.5 مل من محلول البكتين و0.5 مل من كلّ تركيز من المثبطات أعلاه، وحضّنت لمدة ساعة واحدة عند حرارة 37°س، وبعد ذلك أضيف لكلّ إنبوبة إختبار 0.5 مل من محلول DNS ووضعت العينات في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق، ثمّ برّدت الأنابيب وقيست امتصاصيتها بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 540 نانومتراً. حُسبت الفعالية الإنزيمية وفق المعادلات الموصوفة من قبل (Copper, 1977).

$$\text{الفعالية الإنزيمية للبكتينيز (وحدة/مل)} = \frac{\text{تركيز حمض الجالكتورونك مغ/مل} \times 1000/1 \times \text{الوزن الجزيئي}}{\text{زمن التحضين (دقيقة)} \times \text{حجم المحلول (مل)}}$$

$$\text{الفعالية المتبقية للإنزيم (\%)} = \frac{\text{الفعالية الإنزيمية بالمعاملة (وحدة/مل)}}{\text{الفعالية الإنزيمية بالشاهد (وحدة/مل)}} \times 100$$

تثبيط المسبب المرضي على الوسط الزرعي PDA

تمّ تحضير تركيزين من المثبطات هي 2.5% و 5.0% لكلٍّ من شمع البرافين، وكلوريد الكالسيوم، وبيروكسيد الهيدروجين، وهيبوكلوريت الصوديوم، إذ تمّ وضع كلّ تركيز من المثبطات المذكورة آنفاً في دورقٍ خاص يحتوي على الوسط الزرعي PDA المحضر مسبقاً بحيث يصبح حجمه الكلي مع المثبط 100 مل، مع مراعاة ترك أحد الدوارق بدون أي إضافة كشاهد. بعد تصلب الوسط لقّحت الأطباق بقطعة (0.5 سم^2) من مستعمرة الفطر النشطة والتي لايتجاوز عمرها 3 أيام. أُدخلت الدوارق الملقحة في الحاضنة عند درجة حرارة 25±2°س، وسجلت القراءات بعد اكتمال نمو الفطر في معاملة الشاهد.

اختبار مدى تأثير المثبطات في نمو الفطر الممرض على ثمار البرتقال

تمّ تقييم المعاملات التالية: (أ) شمع البارافين + ثمار مصابة ومخدشة، (ب) شمع البارافين + ثمار مصابة وغير مخدشة، (جـ) كلوريد الكالسيوم + ثمار مصابة ومخدشة، (د) كلوريد الكالسيوم + ثمار مصابة وغير مخدشة، (هـ) بيروكسيد الهيدروجين + ثمار مصابة ومخدشة، (و) بيروكسيد الهيدروجين + ثمار مصابة وغير مخدشة، (ز) هيبوكلوريت الصوديوم + ثمار مصابة ومخدشة، (حـ) هيبوكلورايت الصوديوم + ثمار مصابة وغير مخدشة، (ي) جميع المعاملات + ثمار مصابة ومخدشة، (ك) جميع المعاملات + ثمار مصابة وغير مخدشة، (ل) ثمار مصابة وغير معاملة مخدشة (شاهد 1)، (م) ثمار مصابة وغير معاملة وغير مخدشة (شاهد 2)، (ن) ثمار سليمة. وتمّت معاملة ثمار الحمضيات (البرتقال) في كل معاملة من المعاملات أعلاه بتغطيس 5 ثمرات من كل معاملة لمدة ساعتين، وكرّرت كل معاملة 3 مرات، وتمّ تغطيس الثمار بالمعلّق البوغي (الكونيدي) لمدة ساعتين لجميع المعاملات أعلاه (Brown, 1995).

تمّ حساب نسبة الإصابة حسب المعادلة التالية:

$$\text{نسبة الإصابة (\%)} = \frac{\text{عدد الثمار المصابة}}{\text{العدد الكلي للثمار}} \times 100$$

وقدّرت شدة الإصابة على الثمار المجموعة، وذلك من خلال وضع سلّم افتراضي لتقدير شدّة الإصابة مكوَّن من خمس درجات (0–5) حسب ما نشر سابقاً (Embaby *et al.*, 2013): 0=لا يوجد تعفن، 1= ظهور التعفن بقطر 0.5 سم دون وجود تبوّغ، 2= ظهور التعفن على الثمرة بقطر 0.5–1 سم مع وجود تبوّغ، = ظهور منطقة التعفن بقطر من 1–2.5 سم، 4= ظهور منطقة التعفن بقطر من 2.5–4 سم، = الثمرة متعفنة بالكامل ومغطاة بالغزل الفطري بشكل كثيف. ولقياس معامل الإصابة (Disease index) بالمرض استخدمت المعادلة التالية:

$$\text{معامل الإصابة} = \frac{\text{مجموع (عدد الثمار المصابة في الدرجة 0×0 + عدد الثمار المصابة في الدرجة 5× 5)}}{\text{أعلى درجة في الدليل المرضي × عدد الكلي للنباتات}} \times 100$$

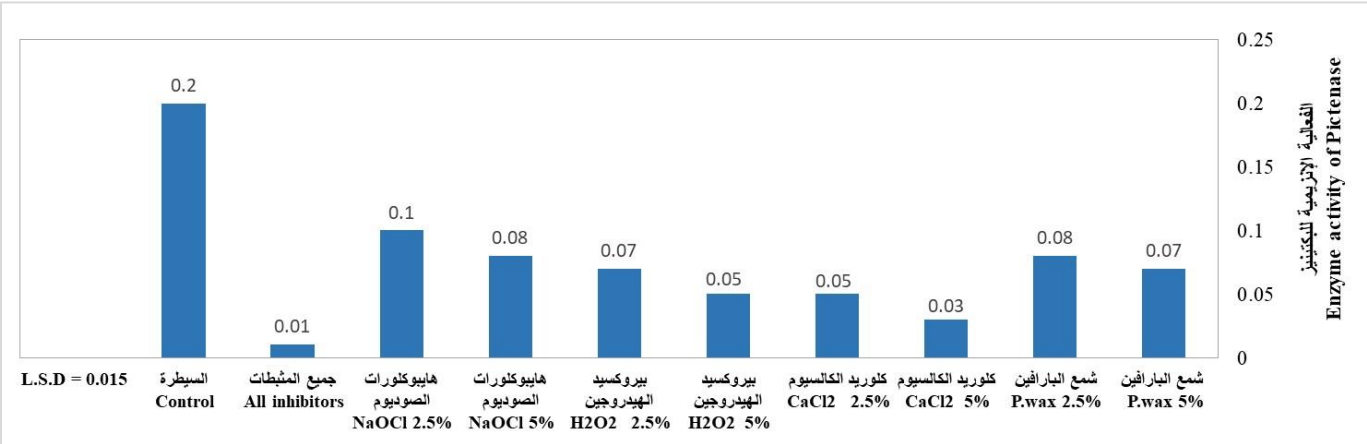
النتائج والمناقشة

تأثير المعاملات المختلفة على الفعالية الإنزيمية للبكتينز

أوضحت النتائج (شكل 2) أن أقلّ فعالية إنزيمية كانت في المعاملة التي ضمّت جميع المثبطات بأنصاف التراكيز، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 0.01 وحدة/مل مقارنة بـ 0.2 وحدة/مل في معاملة الشاهد. أمّا فيما يخصّ المعاملات المفردة للمثبطات، فقد تفوّقت معاملة كلوريد الكالسيوم عند التركيز 5% وأعطت فعاليةً إنزيمية قدرها 0.03 وحدة/مل، مقارنة بـ 0.05 وحدة/مل للمثبط نفسه عند التركيز 2.5% ، كما ويبين الشكل نفسه وجود تفوّق لجميع المثبطات عند التركيز 5% مقارنةً بالتركيز 2.5% ، وقد يعود سبب تفوق معاملة كلوريد الكالسيوم إلى قدرة أيونات هذا الملح على الارتباط بالمركز الفعال للإنزيم وإعاقة ارتباط الإنزيم بالمادة الأساس، مما يؤدي إلى تثبيط فعالية إنزيم البكتينيز المنتج بواسطة الفطر وبالتالي تقليل قدرته على تحليل وسط البكتين.

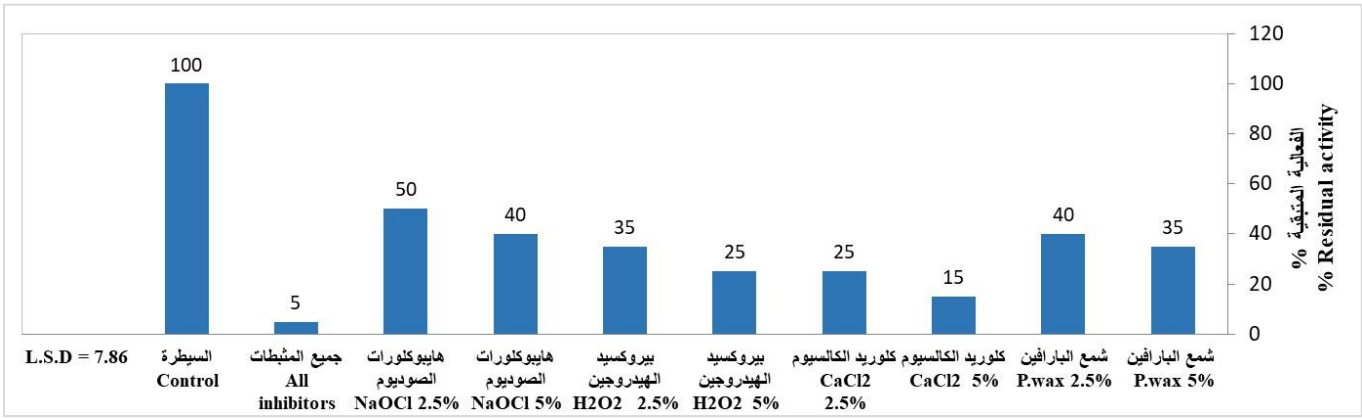
أشار الاحبابي (2018) إلى أن كلوريد الكالسيوم قد حقق إختزالاً في إنزيم البروتيز بنسبة 23.03% الأمر الذي قد ينعكس على انخفاض قدرة بكتيريا التعفن الطري في البطاطا/البطاطس على إحداث الإصابة، أما بخصوص تأثير شمع البارافين فقد يعزى إلى ارتباطه مع المادة الأساس وتكوينه لمعقّدٍ جيلاتيني يصعب تحليله بواسطة الإنزيم، كما أن بيروكسيد الهيدروجين يعمل على تراكم الجذور الحرة للهيدروجين والأوكسجين والتي قد ترتبط مع الإنزيم بروابط هيدروجينية وتغير شكل الإنزيم وبالتالي تنخفض فاعليته، أما دور هيبوكلوريت الصوديوم فقد يعمل على التأثير على الرقم الهيدروجيني مما يؤدي إلى دنترة البروتين الإنزيمي وبالتالي فقدان فاعليته (Iriti & Faoro, 2003).

أوضحت النتائج (شكل 3) أن أقل فعالية متبقية كانت في المعاملة التاسعة، والمتضمنة استخدام جميع المواد المثبطة للإنزيم بنصف التركيز (2.5%) حيث بلغت الفعالية المتبقية 5% مقارنة بـ 100% في معاملة الإنزيم الخام، مما يدلّ على فقدان 95% من فعالية الإنزيم المنتج، ويعزى ذلك إلى التأثير التآزري بين تلك المثبطات التي تعمل على مسخ ودنترة البروتين الإنزيمي وتجميعه وترسيبه وكذلك منافسة الشمع وإرتباطه بالموقع الحساس للمادة الأساس التي يعمل عليها الإنزيم، أو ارتباطه بالمركز الفعال للإنزيم مما يؤدي إلى إعاقة التفاعل الإنزيمي، وبالتالي عدم تحوّل وتحلّل البكتين إلى نواتج إنزيمية مما يؤدي إلى تقليل الفعالية المتبقية للبكتينيز إلى حدّها الأدنى. أما فيما يخصّ المعاملات المفردة للمثبطات، فقد تفوقت معاملة ملح كلوريد الكالسيوم عند التركيز 5% على بقية المعاملات المفردة وأعطت فعالية متبقية بمقدار 15%، وهذا دلالة على فقدان الإنزيم لـ 85% من فعاليته الإنزيمية، ويعود سبب ذلك إلى تأثير هذا النوع من الأملاح على البروتين الإنزيمي فيؤدي إلى تجميعه وترسيبه (Cooper, 1977).



شكل 2. تأثير المعاملات المختلفة على الفعالية الإنزيمية للبكتينز.

Figure 2. Effect of different treatments on pectinase enzyme activity.



شكل 3. تأثير المعاملات المختلفة على الفعالية المتبقية من إنزيم البكتينز.

Figure 3. Effect of different treatments on residual pectinase enzyme activity**.**

تأثير بعض المعاملات الكيميائية على النمو القطري لفطر *Penecillium* spp.

أوضحت النتائج (جدول 1) تفوق معاملة كلوريد الكالسيوم عند التركيز 5% على بقية المعاملات إذ بلغ النمو القطري عند هذه المعاملة 0 سم مقارنة بـ 9 سم نمو قطري للفطر الممرض في معاملة الشاهد.

جدول 1. تأثير بعض المعاملات الكيميائية على النمو القطري للفطر *Penecillium* spp.

Table 1. Effect of different treatments on the diameter growth of the fungus *Penicillium* spp.

المعاملات	تركيز المثبط (%) Inhibitor conc. (%)	النمو القطري (سم) Diameter growth (cm)
شمع البارافين Paraffin wax	5.0	4.7
	2.5	6.3
كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$	5.0	0.0
	2.5	1.5
بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2	5.0	4.3
	2.5	7.0
هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl	5.0	1.0
	2.5	3.1
الشاهد Control	0.0	9.0
أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 5% = 1.16		$LSD_{0.05}$=1.16

كما ثبّطت المعاملات الأخرى مثل هيبوكلوريت الصوديوم وبيروكسيد الهيدروجين وشمع البارافين من نمو الفطر عند استخدامها بتركيز 5%، إذ بلغ النمو القطري فيها 1، 4.3 و 4.7 سم، على التوالي، بينما كانت أقلّ نسبة تثبيط في معاملة شمع البارافين عند التركيز 2.5% والتي بلغ عندها معدل النمو القطري 6.3 سم، ويعود سبب تفوق كلوريد الكالسيوم إلى كون هذا النوع من الأملاح لا يعدّ مناسباً كغذاء للفطر. كذلك الأمر بالنسبة لمادة هيبوكلوريت الصوديوم التي تعدّ من مواد التعقيم السطحي والتي تثبّط نمو الفطر. أمّا ما يفسر عدم تأثر نمو الفطر في الوسط الحاوي على شمع البارافين، فقد ذكر سابقاً أن لجنس الـ *Penicillium* المقدرة على إنتاج إنزيمات اللايبيز القادرة على تحليل الدهون والشموع (Alexsandra *et al.*, 2017).

تأثير بعض المعاملات الكيميائية على نسبة وشدّة إصابة ثمار الحمضيات بفطر *Penicillium* spp.

أوضحت النتائج (جدول 2) أنّه في المعاملات الكيميائية المفردة تفوقت معاملة تغطيس ثمار البرتقال في محلول كلوريد الكالسيوم مما أدى إلى حمايتها من الإصابة بالفطر الممرض، حيث انخفضت نسبة الإصابة ومعامل الإصابة من 90 و 86.6%، على التوالي، في معاملة الشاهد المخدشة إلى 10 و 22% في معاملة محلول كلوريد الكالسيوم في حالة الثمار غير المخدشة، أما عند تخديش الثمار في المعاملة نفسها فأعطى ذلك نسبة ومعامل إصابة قدرت بـ30 و 50%، على التوالي، مما يشير إلى أهمية الاعتناء بالثمار في ظروف القطاف والنقل والتخزين بعدم احداث جروح ميكانيكية والتي من الممكن أن يستغلها الفطر الممرض كوسيلة لتحقيق الاختراق غير المباشر.

بينت دراسة سابقة أن نسبة إصابة ثمار الحمضيات يمكن أن تزيد عن 50% في حالة إصابتها بفطر البنسيليوم أثناء وجود الجروح والخدوش على الثمار المنقولة أو المخزنة. أمّا عن تفوق كلوريد الكالسيوم في خفض نسبة ومعامل الإصابة على ثمار الحمضيات، فيمكن أن يعزى ذلك إلى قدرة هذا المركب على تثبيت إنزيم البكتينيز المسؤول عن تحليل البكتين في قشرة الثمرة وبالتالي تكشف الأعراض المرضية.

أما عند تغطيس ثمار البرتقال غير المخدشة في محلول يحتوي على جميع المواد الكيميائية بتركيز 2.5% فقد إنخفضت فيه نسبة ومعامل الإصابة إلى 0% لكل منهما. وفي حالة تخديش الثمار لإحداث جروح على قشرة الثمرة فقد بلغت نسبة ومعامل الإصابة 20 و 26.6%، على

التوالي، عند استخدام جميع المثبطات، وقد يعزى ذلك إلى التأثير التآزري بين المثبطات ضدّ المسبب المرضي، مما يؤدي إلى تقليل قدرته على الإختراق وتثبيط إنزيماته المرضية، وبالتالي تحجيم قدرته على إحداث المرض.

جدول 2. تأثير بعض المعاملات الكيميائية على نسبة ومعامل إصابة ثمار الحمضيات بفطر *Penicillium* spp.

Table 2. Effect of different treatments on disease infection rate and disease index of citrus fruits infection with *Penicillium* spp.

معامل الإصابة Infection index (%)	نسبة الإصابة Infection rate (%)	Treatments	المعاملات
76.6	60	Paraffin wax +I.S.F*	شمع البارافين + ثمار مصابة ومخدشة
60.0	40	Paraffin wax +I.N.S.F	شمع البارافين + ثمار مصابة وغير مخدشة
50.0	30	$CaCl_2$ + I.S.F	كلوريد الكالسيوم + ثمار مصابة ومخدشة
22.0	10	$CaCl_2$ + I.N.S.F	كلوريد الكالسيوم + ثمار مصابة وغير مخدشة
73.3	60	H_2O_2 + I.S.F	بيروكسيد الهيدروجين+ ثمار مصابة ومخدشة
33.3	30	H_2O_2 + I.N.S.F	بيروكسيد الهيدروجين+ ثمار مصابة وغير مخدشة
60.0	50	NaOCl + I.S.F	هيبوكلوريت الصوديوم+ ثمار مصابة ومخدشة
36.6	20	NaOCl + I.N.S.F	هيبوكلوريت الصوديوم+ ثمار مصابة وغير مخدشة
26.6	20	All treatments+ I.S.F	جميع المعاملات + ثمار مصابة ومخدشة
00.0	0	All treatments+ I.N.S.F	جميع المعاملات + ثمار مصابة وغير مخدشة
86.6	90	Control 1+ I.S.F	ثمار مصابة وغير معاملة ومخدشة (شاهد 1)
81.3	80	Control 2+ I.N.S.F	ثمار مصابة وغير معاملة وغير مخدشة (شاهد 2)
00.0	0	Non Infected Fruits	ثمار سليمة
10.2	16.6	$LSD_{0.05}$	أقل فرق معنوي عند احتمال 5%

* I.S.F= ثمار مصابة ومخدشة، I.N.S.F = ثمار مصابة وغير مخدشة.

*I.S.F = Infected and scratched fruits, I.N.S.F = Infected and non-scratched fruits.

Abstract

Al-Jbory, A.A.A., K.A. Mohammed and S.M. Ismaeel. 2023. Isolation of the Pectinase Enzyme Produced by the Fungus *Penicillium* spp. that Causes Citrus Fruit Rot Disease and Evaluation of the Inhibitors Efficacy for its Control. Arab Journal of Plant Protection, 41(2): 190-196. https://doi.org/10.22268/AJPP-41.2.190196

This study was conducted during the period 2021-2022 to evaluate the effect of some chemicals in inhibiting the pectinase enzyme produced by the fungus *Penecillium* spp. When enzyme preparation concentration of 2.5% was used, the enzymatic activity was 0.01 units/ml compared to 0.2 units/ml in the crude enzyme preparation. When chemical inhibitors were used singly, the calcium chloride treatment was superior at the 5% concentration, which gave an enzymatic activity of 0.03 units/ml. Results obtained showed that the lowest residual enzymatic activity was in the treatment that included the use of all enzyme-inhibiting substances at 2.5% concentration, where the residual effect was 5% compared to 100% in the crude enzyme treatment. This indicates a loss of 95% of the enzyme's activity. The treatment with calcium chloride was superior when used at a concentration of 5% and gave a residual activity of 15%, which is an indication that the enzyme lost 85% of its enzymatic activity. This treatment was superior to all other treatments by achieving the lowest diagonal growth of the pathogenic fungus, which was 0 cm compared to 9 cm in the control treatment. In addition, the calcium chloride treatment achieved an infection rate and disease index of 30 and 59%, respectively, in the scratched fruits treatment, whereas these two parameters were reduced to 10 and 22% in the case of non-scratched fruits treatment. The severity of infection when using all inhibitors combined at 2.5% concentration infection rate and disease index were reduced to 20 and 26.6% in the scratched fruits treatment, and to 0 and 0 in the non-scratched fruits treatment, respectively.

Keywords: *Penecillium* spp., citrus fruit rot, pectinase enzyme, citrus.

Affiliation of authors: *A.A.A. Al-Jbory*, K.A. Mohammed and S.M. Ismaeel, Plant Protection Department, College of Agriculture, Tikrit University, Iraq. *Email address of corresponding author: Awfabd91@tu.edu.iq*

المراجع

الاحبابي، وسام بدر صالح. 2018. تنقية وتوصيف إنزيم البروتيز المنتج من قبل البكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا وتقييم بعض عوامل مقاومة المرض. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة تكريت، العراق. 100 صفحة.

***[El-Ahbabi, W.B.S.** 2018. Purification and charachterization of protease enzyme produced by the bacteria which causes potato soft rot and evaluation of disease resistance factors. M.Sc. thesis, Faculty of Agriculture, University of Tikrit, Iraq. 100 pp. (In: Arabic)]*

الجهاز المركزي للإحصاء. 2020. انتاج الحمضيات في العراق. تقرير دوري. وزارة التخطيط. جمهورية العراق. 10 صفحات.

References

Iriti, M. and F. Faoro. 2003. Benzothiadiazole (BTH) induce cell–death independent resistance in *P. vulgaris* against *Uromyces appendiculatus.* Journal of Phytopathology, 151:171–180.

Lakshmikanth, M., S. Manohar, Y. Souche and J. Lalitha. 2006. Extracellular β-agarase LSL-1 producing neoagrobiose from a newly isolated agar-liquefying soil bacterium, Acinetobacter sp. AG LSL-1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(10):1087-1094. http://dx.doi.org/10.1007/s11274-006-9147-z

Louw, J.P. and L. Korsten. 2015. Pathogenicity and host susceptibility of *Penicillium* spp. on citrus, Plant Disease, 99(1):21-30. https://doi.org/10.1094/pdis-02-14-0122-re

Natalia, M., R. Simone, D. Roberto and G. Eleni. 2004. Pectinase production by fungal strains in solid–state fermentation using agro-industrial bioproducts. Brazilian Archives of Biology and Technology, 47(5):813-819. https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500018

Palou, L., S. Valencia and M.P. Gago. 2015. Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit. Coatings, 5(4):962-986. https://doi.org/10.3390/coatings5040962

Pitt, J.l. 1979. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces.* Academic Press, London, UK. 634 pp.

Sgroi, F., M.C. Annamoria, T. Nariofodera and R. Squatrito. 2015. Economic and essential comparison between organic and conventional farming in Sicilian lemon orchards. Sustainability, 7(1):947-961. https://doi.org/10.3390/su7010947

Tweddell, R.J., S.H. Jabaji-Hare and P.M. Charest. 1994. Production of chitinase and β-1,3glucanase by *Stachybortys eleyans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani.* Applied Environmental Microbiology, 60(2):489-495. https://doi.org/10.1128/aem.60.2.489-495.1994

Venugopal, T., T. Jayachandra and K.A. Anu Appaiah. 2007. Effect of aeration on production of endo-pectinase from coffee pulp by a novel thermophilic Fungi *Mycotypha* sp. strain No. AKM 1801. Biotechnology, 6(2):245-250. https://doi.org/10.3923/biotech.2007.245.250

***[Central Statistical Organization**. 2020. Citrus production in Iraq. Periodic report. Ministry of Planning. Republic of Iraq.10 pp. (In: Arabic)]*

خفتة، عبد الرحمن. 2019 . دراسة انتشار أعفان جنس البنسيليوم *Penicillium* spp. على ثمار أصناف الحمضيات بعد القطاف والتخزين المبرد وتقييم أضراره في محافظة اللاذقية. المجلة السورية للبحوث الزراعية، 6(4):474-483.

***[Khafta, A.R.** 2019. Study of the prevalence of molds of the genus Penecillium spp. on citrus fruits after harvesting and cold storage and evaluation of its damage in Lattakia Governorate. Syrian Journal of Agricultural Research, 6(4): 474-483. (In: Arabic)]*

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition Academic Press. 635 pp.

Alexsandra, N.F., D.S.R. Dhiessica, A.S. Romario, C.S.F. Antonio, D.G.A. Lisandro, D.O.L. Edeltrudes, S.D.F. Janaina, L.V.J. Gildomar and F. Marcelo. 2017. Production of lipase from *Penecillium* sp.using waste oils and *Nopalea cochenilLifera*. Chemical Engineering Communications, 204(10):1167-1173. https://doi.org/10.1080/00986445.2017.1347567

Boubaker, H., B. Saadi, E.H. Boudyach and A.A. Benaoumar. 2009. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to imazalil and thiabendazole in Morocco. Plant Pathology Journal, 8(4):152-158. https://doi.org/10.3923/ppj.2009.152.158

Brown, G.E. 1995. Citrus diseases-postharvest. Florida Department of Citrus. Lake Alfred. 1995 report. 145-152 pp.

Cooper, C. 1977. The Tools of Biochemistry. John Wily and Sons Inc. USA. 423 pp.

Dalvi, P. and P. Anthappan. 2006. Amylase and pectinase from single source for simultaneous desizing and scouring. Indian Journal of Fibre and Textile Research, 32(4):459-465.

Embaby, E.H.L, M. Hazaa, L.F. Hagag, T.E. Ibrahim and F.S. Abd El-Azem. 2013. Decay of some citrus fruit quality caused by fungi and their control: III-control blue and green mould decay by using some alternative fungicides. Journal of Applied Science Research, 9(8):5920-4929.

Hitha, P.K. and D. Girija. 2012. Isolation and screening of native microbial isolates for pectinase activity. International Journal of Science and Research, 3(5):632-634.

Received: August 8, 2022; Accepted: October 28, 2022

تاريخ الاستلام: 2022/8/8؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2022/10/28