التنوع الميكروبي الداخلي في نبات الطلح في شعيب رماح في منطقة الرياض-المملكة العربية السعودية وتقييم كفاءتها في إنتاج التوكسولات

إعداد

محمد نجاء عبدان العتيبي

المركز الوطني لبحوث الزراعة والثروة الحيوانية – وزارة البيئة والمياة والزراعة

الخلاصة :

تعتبر الميكروبات الداخلية النامية داخل أوراق وسيقان وجذور النباتات واحدا من أهم مصادر التنوع الحيوي الميكروبي. ودلت كثيرا من الأبحاث على أهميتها البالغة من حيث فوائدها المرجوة للنبات وقدرتها على إنتاج مركبات حيوية فعالة تستخدم كمضادات بكتيرية أو فطرية أو فيروسية أو مضادات للأورام والخلايا السرطانية. وتشير بعض الدراسات إلى أهميتها في التعرف على مصادر النبات نفسه وطبيعة البيئة التي ينمو فيها. يعتبر نبات الطلح من النباتات الواسعة الانتشار في البيئة الصحراوية للمملكة العربية السعودية. إن دراسة التنوع الحيوي الميكروبي في هذا النبات مهم جدا وبالذات في المناطق البرية ومن المحتمل عزل كائنات دقيقة ذات أهمية صناعية مثل الفطريات الداخلية التي لها القدرة على إنتاج التوكسولات ذات الفعالية الكبيرة ضد الخلايا السرطانية. وقد تم في هذه الدراسة جمع عينات من أوراق وسيقان نبات الطلح من شعيب رماح بمنطقة الرياض وعزل الكائنات الداخلية بعد تعقيم السطح الخارجي تماما واستخدام بيئات ميكروبية صناعية متعددة لعزل أكبر عدد ممكن من البكتيريا والخمائر والأعفان الداخلية. نقيت الميكروبات ودراسة خصائصها المزرعية والمجهرية وتم تعريفها تعريفا أوليا بالإعتماد على تلك الخصائص. وقد تم انتخاب فطرة *Alternaria alternata* لدراسة كفاءتها في إنتاج مركبات التكسول في بيئات صناعية وطبيعية مختلفة. وقد خلصت هذه الدراسة أن الكائنات الدقيقة الداخلية المعزولة من الأنسجة الداخلية لنبات الطلح لها القدرة على إنتاج مركبات التكسول ذات الأهمية الطبية والتجارية في بيئات طبيعة رخيصة الثمن.

المقدمة :

تحظى المملكة العربية السعودية بغطاء نباتي متنوع إذ تضم فلورا المملكة ٢٢٤٣ نوعاً نباتياً ينمو طبيعياً في بيئات مختلفة (Collentte, 1998). من إجمالي ٣٤١٨ نوعاً نباتياً تتواجد في الجزيرة العربية (باوزير،٢٠٠٤؛ الخرساني،٢٠٠٥). تتميز المملكة العربية السعودية بموقع جغرافي يتوسط قارتي آسيا وأفريقيا وبتكوين جيولوجي متباين واختلاف في مظاهر سطحها ومناخها من منطقة إلى أخرى، الأمر الذي أدى إلى وجود العديد من البيئات الطبيعية تتباين مكونات غطائها النباتي من مكان لأخر من حيث التنوع والكثافة والتوزيع. إن مجمل الغطاء النباتي في المملكة خليط من نباتات قارتي أفريقيا وآسيا مع وجود أكثر من ٤٠ نوعاً متوطنا. ما زالت البيئة الداخلية للنباتات مصدرا خاما لدراسة التنوع الحيوي الميكروبي، ويعتبر كل جزء من النبات هدفاً لمثل تلك الدراسات. فقد تمكن الباحثون من عزل كائنات دقيقة من الجذور والسيقان والأوراق والأزهار والثمار ووجدوا تنوعاً واختلافاً بين هذه الأجزاء في النبات الواحد فضلا عن التنوع الحاصل بين نفس النباتات نتيجة لاختلاف البيئة. اما عن أهميتها فقد أكدت الدراسات أنها تشمل منافع تكافلية ومنافع تبادلية وتعايش غذائي، كما أكدت بعضاً من الدراسات على أن بعض الكائنات الدقيقة الداخلية تسبب أمراضا لبعض النباتات. وقد لخص Ryan et al., (2008) أهم الفوائد المرجوة من الكائنات الداخلية في النقاط التالية: -

- تعمل على تعزيز نمو النبات.
- تعتبر عوامل مكافحة حيوية.
- تستطيع إنتاج مجموعة من المنتجات الطبيعية ذات الفوائد الطبية أو الزراعية أو الصناعية.
- لها القدرة على إزالة الملوثات من التربة.
- تلعب دورا في خصوبة التربة من خلال إذابة الفوسفات وتثبيت النيتروجين.

يتصاعد الاهتمام في مجال التقانة الحيوية المعتمدة على الكائنات الدقيقة الداخلية لتحسين وقاية النبات ضد الأمراض والأوبئة المختلفة وفي عمليات الإنتاج المستدام للمحاصيل غير غذائية وإنتاج الكتلة الحيوية والوقود الحيوي.

هناك ندرة في دراسة الكائنات الدقيقة الداخلية التي تستوطن النباتات الصحراوية السليمة في بيئة المملكة العربية السعودية، علاوةً على تقييم كفاءتها في إنتاج المركبات الحيوية ذات الفوائد الصحية أو التصنيعية أو التطبيقات الأخرى.

ولهذا السبب فقد تم تقديم هذا المقترح لعمل مسح للكائنات الدقيقة في واحد من أهم نباتات المملكة العربية السعودية وهو الطلح وفي واحدة من المناطق المميزة بتنوعها البيئي وهي منطقة رماح.

ونقلا عن النسخة الألكترونية لصحيفة الرياض (٢٠١٣) فإن محافظة رماح تقع في الجزء الشمالي الشرقي لمنطقة الرياض، وتبعد مدينة رماح حوالي ١٢٠ كم عن مدينة الرياض، وهي تقع في منطقة صحراوية تعرف باسم (العرمة). وسبب تسميتها رماح نسبة إلى نقاء في الصحراء الرملية الحمراء المعروفة بصحراء الدهناء، حيث كان يراه الرائي من بعيد على شكل رماح. يتبع محافظة رماح ٢١ مركز إداري. وتتمتع المحافظة بمناطق ربيعية خضراء رائعة الجمال تجتذب السياح إليها منها روضة خريم وروضة التنهاة وفياض الصمان إضافة إلى وادي رماح و كسر المزيرع وشعيب الثمامة، وتمتلئ هذه الأودية بالمياه في فصل الشتاء مما يؤدي إلى تواجد مناطق خضراء رائعة الجمال.

تقع رماح في جزء من صحراء الدهناء والتي تخترقها بعض ما يعرف بالعروق المعترضة وهي مناطق رملية وعرة تمتد من شمال غرب المملكة إلى جنوبها وأشهر هذه العروق (أبا الثمام و الحمراني وعمر والسرو). يحدها من الشمال المنطقة الشرقية و من الجنوب مدينة الرياض و من الشرق المنطقة الشرقية و من الغرب محافظة المجمعة و محافظة ثادق ومحافظة حريملاء، تبلغ مساحتها ١٥٩٠٠ كلم٢، و يبلغ عدد سكانها ٢٨٠٥٥ نسمة. كانت محافظة رماح في الماضي مركز جمارك للقادمين من دولة الكويت والشام و كانت موردا للماء.

الدراسات السابقة

تعرف الكائنات الدقيقة الداخلية endophytic microorganisms بأنها عبارة عن الميكروبات القادرة على النمو والتكاثر في داخل الأنسجة النباتية سواءً أكانت جذور أو سيقان أو أوراق، ولا تسبب لها أي أعراض مرضية حسب معظم المراجع العلمية، بل تشير معظم الدراسات إلى أهميتها البالغة للنبات. وقد لوحظت الفطريات الداخلية التابعة للفطر *Clavicipitace* في الحشائش لأول مره من قبل الباحثين الأوربيين في نهايات القرن التاسع عشر في بذور *Lolium temulentum* و *L. arvense* و*L. linicolm* و *L. remontum* (الشهري، ٢٠١٣).

وجد Zabalgogeazco, (2008) أن الفطريات الداخلية التي تصيب النباتات بعضها تسبب أعراضاً ممرضة لتلك النباتات، والبعض عكس ذلك فتكون نافعة لتلك النباتات من حيث مساعدتها على مقاومة مسببات الأمراض والفطريات

والحشرات. كما لاحظ أن هناك فطريات داخلية متخصصة في الإصابة وفطريات داخلية ذات مجموعة واسعة من ناحية النباتات التي تصيبها. قام Gangadevi and Muthumary (2008) بعزل الفطر الداخلي *Collettotrichum gloesporioides* من النبتة الطبية *Justicia gendarussa* وقد وجد أن ذلك الفطر له القدرة على إنتاج مركبات مضادة للسرطان تستخدم في علاج أنواع من السرطانات. كذلك وجد Nicoletti et al., (2008) أن الكائنات الحية الدقيقة قادرة على إنتاج منتجات أيضية ومواد خلوية يكون لها دور في إنتاج مواد مقاومة للأورام وخاصة أنواع فطر *Penicillium* والذي يمثل مصدر حيوي لمنتجات حيوية نشطة من الممكن أن تقارب في تأثيرها الإيجابي العلاج الكيميائي للأورام. لاحظ Rodriguez et al., (2009) أن للفطريات الداخلية تأثيرات عميقة على المجتمعات النباتية من ناحية زيادة حيويتها ، وتحملها للإجهاد ، وزيادة الكتلة الحيوية ، وخفض استهلاك تلك النباتات للمياه. وقد وجد Gao et al., (2009) أن المواد الأيضية الثانوية المنتجة من الفطر الداخلي *Penicillium chrysogenum* كان لها نشاطا تثبيطياً ضد فطر *Alternaria brassicae*. وقد إستخلص Gao et al., (2010) أربعه مركبات حيوية مشتقة من المركب الكيميائي Perylene المنتجه بواسطة فطر *Alternaria alternate* والذي تم عزله من أحد أنواع الجنس الطحلبي *Laurencia* وقاموا باختبار فعاليتها على بكتيريا *Staphylococcus aureus* ، وبكتيريا *Escherichia coli* ، وفطر *Aspergillus niger* ، وقد أظهرت نتيجة سلبية وغير مثبطة لنموها. قام Fernandes et al. (2009) باختبار وزراعة ٢٢ مستخلص خام من فطر *Alternaria alternate* والذي تم عزله من نبات Coffea Arabica وقامو باختبار فعاليتها على بكتيريا *Staphylococcus aureus* ، وبتكيريا *Escherichia coli* ، وفطر *Candida albicans* ، وقد أظهرت النتيجة تثبيطاً لنمو النوعين البكتيريين فقط.

التكسول عبارة عن مركبات ثنائية التربين ذات وظائف بيولوجية عالية كونها ذات تأثيرات واسعة مضادة ضد العديد من الأورام في الإنسان تشمل سرطانات الثدي والرئة، وتستخلص في الغالب من اللحاء الداخلي لنبات الطقسوسTaxus. وقد ثبت قدرة فطر الترناريا الترناتا المعزول من الانسجة الداخلية للنباتات على إنتاج مركبات التكسول وأثبتت بعض الدراسات أن إضافة مستخلص نبات الطقسوس يزيد أو يضاعف من الإنتاج ٣٠ ضعف مقارنة بالبيئة

القياسية التي تستخدم لتمنية الفطرة المنتجة للتكسول (Kumaran et al., 2009; Soliman et al. 2013).

المواد وطرائق العمل

المواد Materials:

بيئة آجار دكستروز البطاطس Potato dextrose agar (PDA)، بيئة الإجار المغذي Nutrient Agar ، بيئة M9 Minimal Medium ، بيئة الأرز Rice agar ، فول الصويا –شعير.

طرائق العمل

مكان جمع العينات:

وتم اختيار عدد من المواقع لجمع عينات النبات بطريقة عشوائية تامة حيث تم أخذ عينات من غصينات غضه مع مراعاة أن تكون خالية من الجروح والإصفرار أو أي علامات مرضية أخرى. تم جمع ١٠ عينات نباتية من الطلح. وضعت كل عينة في كيس وبعد ترقيمها تم حفظها في حافظة ثلجية أثناء الجمع. ونقلت جميع العينات بنفس اليوم إلى مختبر الأحياء الدقيقة بقسم النبات والأحياء الدقيقة، جامعة الملك سعود. وتم تعريف العينات النباتية في المعشبة التابعة للقسم.

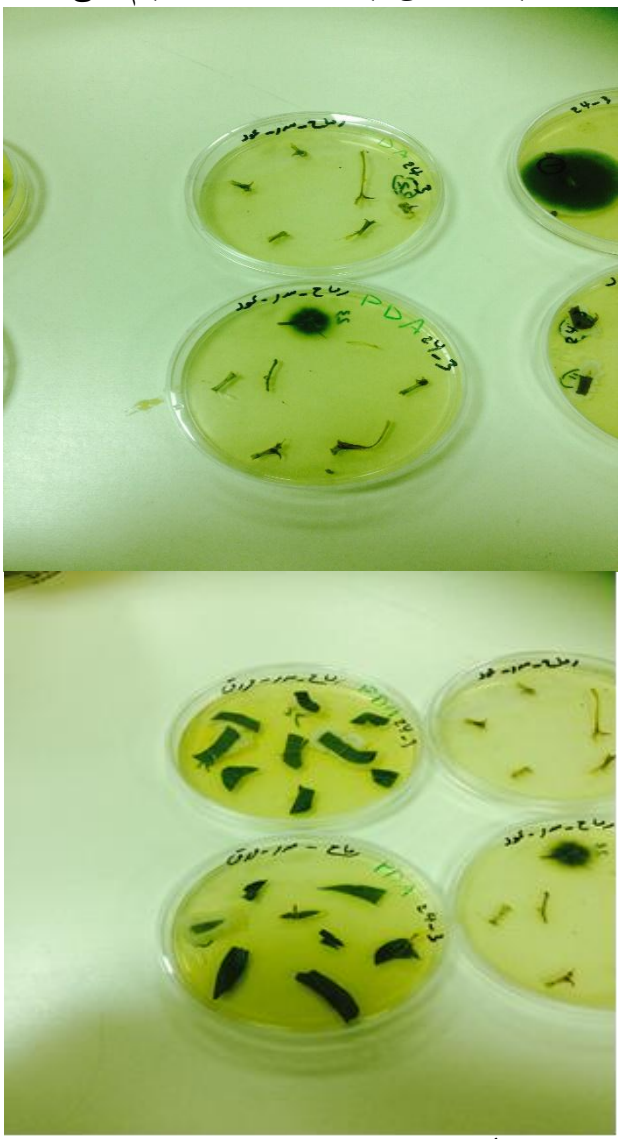
معاملة العينات وحفظها

تمت عملية تعقيم السطح الخارجي لأجزاء النبات بواسطة الغسل الأولي بتيار من ماء الحنفية العادي، ثم الغسل بواسطة محلول فسيولوجي معقم. وأُنجز التعقيم النهائي بواسطة كحول الإيثانول المركز عن طريق مسح الأسطح الخارجية لأجزاء النبات (أوراق أو حوامل تفرعات الأوراق)، ثم معاملتها عن طريق الغمر في محلول ٧٠ % إيثانول ثم غسلها ثلاث مرات متتالية بمحلول فسيولوجي معقم لضمان إزالة آثار الكحول وتأكيد تعقيم السطح.

عزل وتنمية الميكروبات الداخلية:

تم تجهيز عدة أطباق بتري من بيئة potato dextrose agar (PDA) و malt extract agar (MEA) وNutrient Agar (NA) بوزن الكمية المطلوبة من البيئة وإضافة الحجم المناسب من الماء المقطر وبعد الإذابة التامة تم تعقيمها بجهاز الأوتوكليف عند درجة ١٢١°م لمدة ٢٠ دقيقة، حسب إرشادات الشركة المنتجة (Oxoid, UK). تم تعقيم المشارط بالكحول والتخلص منه باللهب، ثم تم عمل قطع صغيرة من أوراق وسيقان النبات ثم وضعها في البيئات المناسبة المجهزة سابقا، بحيث يحتوي كل طبق مابين خمس إلى ثمان قطع. ثم

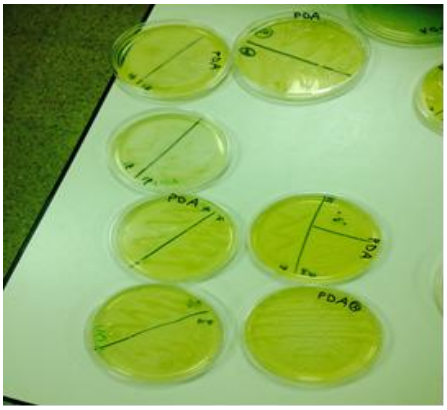
التحضين حسب الكائن الدقيق المستهدف، بحيث تحضن بيئة NA على ٣٧ ° م لمدة ٤٨ ساعة بينما تحضن بيئة PDA لمدة ٧ أيام على ٢٥ ° م.

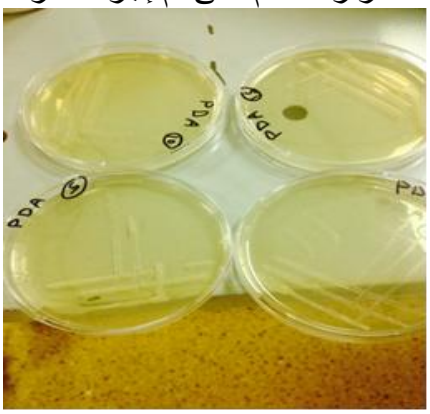


صورة (١) توزيع أجزاء النباتات التي عقم سطحها الخارجي على أسطح بيئات النمو الصلبة في أطباق بتري.

تنقية العزلات الميكروبية:

تم متابعة نمو الكائنات الدقيقة بشكل يومي ونقل كل نمو إلى بيئة جديدة ثم تكرار عملية الإكثار في بيئة جديدة أخرى، وإستمرت العملية حتى تم الحصول على المزارع النقية المفردة من كل ميكروب إعتمادا على خصائصها المزرعية. ثم تم تنميتها على الأجار المائل للبيئات المغذية المناسبة لكل ميكروب عند درجة حرارة ٢٤° م حتى تم إجراء الدراسات اللاحقة.





صورة (٢). العزلات البكتيرية والمنقاة على أسطح البيئات المغذية الصلبة

تعريف وتشخيص العزلات الميكروبية:

عرفت العزلات الميكروبية النقية تعريفا أوليا من خلال خصائصها المزرعية على بيئات النمو وكذلك من خلال دراسة خصائصها المجهرية بواسطة التصبيغ بالصبغات المناسبة واستخدام المجهر الضوئي. تم إنجاز التعريف الأولي للعزلات الفطرية النقية من خلال خصائصها المزرعية والمجهرية والكيموحيوية طبقا لـ Alcamo (2001) و Tortora (2007). وتم التأكد من تعريف العزلات الفطرية بواسطة جهاز البصمة الأيضية المتوفر في وزارة الزراعة قسم وقاية النبات.

وتم انتخاب بعض العزلات الفطرية لدراسة كفاءتها في إنتاج مركبات التكسول في بيئات صناعية وطبيعية مختلفة.

تقييم كفاءة *Alternaria* spp. في إنتاج التوكسولات في البيئات الطبيعية والصناعية:

تم استخدام بذور الكتان والأرز والشعير كبيئات طبيعية، جمعت من السوق المحلية في منطقة الرياض ونقلت مباشرة إلى المعمل. كما تم استخدام بيئة PDA كبيئة صناعية وتم تحضير بيئة إنتاج التكسول القياسية المستخدمة لإنتاج التكسول بواسطة فطر *Alternaria alternara* والتي تتكون من Na_2HPO_4.$7H_2O$ (١٢,٨جم/لتر) و KH_2PO_4 (٦ جم /لتر) و NaCl (٣ جم /لتر) و NH_4Cl (١ جم/لتر) وقد تم إضافة ١ جم/ لتر من soytone. تم تجهيز عدد خمس دوارق سعة ٥٠٠ مل خصص ثلاثة منها للبيئات الطبيعية مع تحضير محلولا مكونا من النشاء (١٪). بعد تجهيز البيئات تم التعقيم بجهاز الأوتوكليف عند درجة ١٢١° م لمدة ١٥ دقيقة. تم ترطيب البيئات الطبيعية بمحلول النشاء المعقم ثم تمت عملية التلقيح بإضافة ١٠ مل من معلق أبواغ الفطر، ثم التحضين عند ٢٥ °م لمدة ١٨ يوم.

الكشف عن قدرة الفطر على إنتاج التكسول في البيئات المختلفة.

طبقا لـ Kumaran and Muthumary (2008) ، فقد تمت عملية الاستخلاص بواسطة ١٠ مل من Dichloromethane وبعد المزج جيداً يؤخذ السائل الرائق فقط وينقل لدورق نظيف وجاف، ثم يرشح بورق ترشيح، ويجفف بواسطة المجفف الدوار تحت التفريغ عند ٣٥°م. وبغرض الحصول على أعلى تركيز تمت إذابة الناتج من عملية التجفيف في ٥٠٠ ميكوليتر من نفس المذيب السابق.

الفصل الكروماتوغرافي والتشخيص:

تمت عملية الفصل في عمود الكرموتوكرافي المتكون من السليكا جل (٤٠ ميكروميتر) وتم إستخدام أطوار متحركة من أنظمة مذيبات متعددة شملت ١٠٠ ٪ من dichloromethane ثم مزيج من methylenechloride و ethylacetate بالنسب التالية ٢٠ إلى ١ و ١٠ إلى ١ و ٦ إلى ١ و ٣ إلى ١ ثم ١ إلى ١. تم جمع الأجزاء المفصولة مع بعضها بغرض تشخيص وجود التكسول في الخطوات اللاحقة.

تمت عملية الفصل بطريقة طبقة الكرموتوجرافي الرقيقة بإستخدام شريحة مغطاة بالسليكا جل وأنظمة متعددة من المذيبات العضوية شملت:

النظام الأول: chloroform:methanol, (7:1, v/v)

النظام الثاني: chloroform:acetonitrile (7:3, v/v)
النظام الثالث: ethylacetate:2-propanol (95:5, v/v)
النظام الرابع: methylenechloride:tetrahydrofuran (6:2, v/v)
النظام الخامس: methylenechloride:methanol:dimethylformamide (90:9:1, v/v/v) ، بعد عملية التجفيف والتسخين الهادئ تمت علمية الصبغ بواسطة صبغة الفانيل المذابة في حام الكبريتيك بسبة ١٪ وزنا إلى حجم. تعتبر النتيجة الأولية موجبة إذا ظهرت بقع زرقاء تتحول إلى بنية غامقة بعد ٢٤ ساعة.

النتائج والمناقشة :

تم جمع ١٠ عينات عشوائية من مناطق الدراسة ثم تم إيداع العينات في معشبة قسم النبات والأحياء الدقيقة – كلية العلوم – جامعة الملك سعود. تم تعريفها على مستوى الجنس والنوع والجدول١ يوضح الاسم العلمي للنباتين تحت الدراسة شاملا الجنس والنوع.

جدول (١): الاسم العلمي الاسم المحلي للنبات تحت الدراسة الذي تم جمعه من شعيب رماح، محافظة رماح، منطقة الرياض.

الاسم العلمي	الاسم المحلي
Acacia gerrardii	نبات الطلح النجدي

نبات الطلح النجدي فيتراوح ارتفاعه من ٥-١٠ م وتشبه كثيرا الطلح العراقي لكن يميزها قرونها الطويلة الملتفة وفروعها المتجهة إلى الأعلى. الاشواك كبيرة تصل إلى ٦ سم مبيضة اللون وأزهارها متجمعة في نورة كروية قطرها ١ سم والقرون طويلة ١٨ سم، وينتشر في المنطقة الوسطى بكثرة وتقل كلما اتجهنا شمالا وشرقا ولا توجد في الغرب والجنوب.

تمت عملية التعقيم للسطح الخارجي بكفاءة عالية، حيث أستخدم فيها مراحل من التطهير الأولي ثم التعقيم بالكحول، وأخيرا التطهير بمحلول فسيولوجي معقم وذلك لضمان أن العزلات التي نمت تتبع الكائنات الدقيقة الداخلية. بعد التأكد من نقاوة العزلات، درست الخصائص المزرعية والمجهرية، وبعض الأنشطة الحيوية والإنزيمية للوصول إلى تعريف أولي للعزلات الميكروبية التي نقيت. دلت نتائج الخصائص المزرعية والمجهرية أن جميع العزلات التي نقيت تتبع جنسين من البكتيريا وجنس واحد من الأعفان. ظهرت بعض العزلات الميكروبية عصوية منتظمة ومكونة للأبواغ الداخلية وهوائية إجبارية إلى اختيارية التهوية. وعند اختبار نشط إنزيم الكاتليز في الظروف

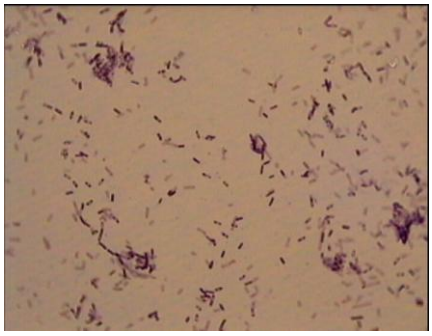
الهوائية كانت موجبة. وقد أقترح لهذه العزلات تعريفا أولياً باعتبارها أحد أنواع جنس *Bacillus*، وهذه الخصائص تتطابق مع ما ذكره Xu and Cote (2003). أظهرت العزلات البكتيرية النقية الأخرى خصائص ترجح أنها تابعة لجنس *Lactobacillus*، حيث ظهرت عصوية وموجبة لصبغة جرام وشحيحة الاحتياج للتهوية وسالبة للكاتليز، منتجة لحامض اللبن من السكر، وهذه تعتبر من الخصائص الأساسية لهذا الجنس كما ذكر Dacre and Sharpe (1956).

عزل الفطر الداخلي *Alternaria alternata* من الأنسجة الداخلية لنبات الطلح، يعتبر هذا الفطرة من الفطريات الأسكية ويظهر غزله الفطري في طوره الناقص مقسم بجدر عرضية، ويتكاثر لا جنسياً بواسطة جراثيم كونيدية ذات أشكال مختلفة. تتكون الجراثيم الكونيدية على حامل في نهاية الميسليوم (الهيفا) تتجه الى الأعلى وتسمى الحامل الكونيدي. تمتاز الحوامل الكونيدية بلونها البني الشاحب، وأبعادها ما بين ٢٥ إلى ٦٠ ميكورميتر طولا و ٤ إلى ٤,٥ ميكروميتر عرضا. أما الكونيدات فتبدوه بنية لامعة إلى بينة شاحبة ذات شكل كمثري ذو عنق ضيق وسطح أملس. تظهر الخصائص المجهرية في الصورة ٦ وهذه الخصائص تتطابق مع ما ذكره Andrew and Peever (2009). وقد دلت النتائج في جدول ٢ أن الفطر سريع النمو أن معدل نموه يتراوح ما بين ٠,٤ إلى ٠,٦ مم لكل يوم.

تم تأكيد عملية التعريف الأولي للفطر بإرسال عينة من الفطر إلى وزارة الزراعة قسم وقاية النبات، بواسطة جهاز البصمة الأيضية.

تعتبر مركبات التاكسول مركبات حيوية فعالة ضد مجموعة واسعة من الأورام البشرية. إن اكتشاف بعض الفطريات الداخلية من البيئة المحلية القادرة على إنتاج التاكسول قد يؤدي إلى احتمال إكتشاف مصدر حيوي متجدد لإنتاج مركياتالتكسول ذات الأهمية التجارية والطبية البالغة. على مدى السنوات الخمس عشرة الماضية، كان هناك قدر كبير من الاهتمام في البحث الفطريات التي تنمو داخل النبات، وهناك مركبات جديدة من النباتات غير مستكشفة وهي بحاجة إلى المزيد من الأبحاث. تعتبر البيئة الصحروايا الجافة وبالذات المناطق والشعاب البعيدة عن الملوثات البيئة والكيميائية، والمبيدات والأسمدة مصدر مهما للكائنات الدقيقة الداخلية التي تتكافل مع النباتات. أكدت هذه الدراسة أن فطرة الـ *Alternaria alternate* قادرة على أنتاج مركبات التكسول في البيئة القياسية، والأهم من ذلك أن هذه الدراسة قد عزلت لأول مرة سلالة تابعة للفطرة السابقة

قادرة على إنتاج التكسول في بيئات طبيعية رخيصة الثمن مثل بذور الكتان والأرز والشعير. يبين الجدول ٦ أن الفطر قد أنتج التكسول في البيئات السابقة، حيث ظهرت التكسولات بنية إلى سوداء اللون بعد تصبيغ الشريحة الزجاجية المغطاة بالسليكا وبعد عمليات فصل متكررة بواسطة أنظمة متعددة من المذيبات.



صورة (٥): الخصائص المجهرية للعزلات البكتيرية النقية المعزولة من الأنسجة الداخلية لأوراق نبات الطلح.

صورة رقم (٦) الخصائص المزرعية لفطر *Alternaria alternate* (أعلى) الجراثيم الكونيدية في سلاسل وذات لون بني شاحب ومتعددة الخلايا وشكل كمثري ذو عنق ضيق.

جدول (٢): معدل نمو العزلات الفطرية المنماة بيئة بطاطس الدكستروز الصلبة عند ٢٥ °م لمدة عشرة أيام.

	قطر المستعمرات الفطرية (مم)		
اليوم	**العزلة الأولى**	**العزلة الثانية**	**العزلة الثالثة**
اليوم الأول	٠,٨ مم	٠،٦ مم	٠،٦ مم
اليوم الثاني	١,٦ مم	١,٣ مم	١,٥ مم
اليوم الثالث	٢,٤ مم	١,٩ مم	٢,١ مم
اليوم الرابع	٣,١ مم	٢,٥ مم	٢,٨ مم
اليوم الخامس	٣,٧ مم	٢,٩ مم	٣,١ مم
اليوم السادس	٤,٥ مم	٣,٣ مم	٣,٦ مم
اليوم السابع	٥,٣ مم	٣,٩ مم	٣,٧ مم
اليوم الثامن	٦,٣ مم	٤,٢ مم	٣,٨ مم
اليوم التاسع	٧ مم	٥,٤ مم	٣,٩ مم
اليوم العاشر	٧,٤ مم	٦,٤ مم	٤,٠ مم
معدل النمو (مم / يوم)	٠,٦ مم	٠,٥ مم	٠,٤ مم

جدول (٣) إنتاج مركبات التكسول في البيئات الصناعية القياسية المحتوية على المغذيات المحدودة و١٪ من soytone، وبيئة طبيعية مرطبة بمحلول ١٪ من النشاء.

إنتاج مركبات التكسول في البيئات الصناعية القياسية والطبيعية*			
البيئة القياسية	حبوب الكتان	حبوب الأرز	حبوب فول الصويا
+++	+++	+++	++++

*تم التشخيص بعد الفصل الكرموتوكرافي على شريحة مغطاة بالسليكا والفصل بعدة أنظمة من المذيبات العضوية ثم التصبيغ بصبغة الفانيل المذابة في حامض الكبريتيك.

الاستنتاجات والتوصيات:

خلصت هذه الدراسة إلى أن الكائنات الدقيقة الداخلية في أنسجة نبات السدر والطلح في شعيب رماح –محافظة رماح- منطقة الرياض – المملكة العربية السعودية شملت أجناس بكتيرية وفطرية وأن التعريف الأولي لها أكد أنها

تتبع جنس الـ *Bacillus* و *Lactobacillus* و *Alternaria* . وأن الفطرة المعزولة تملك قدرة على أنتاج التكسولات ذات الأهمية الطبية والتجارية. كما خلصت الدراسة إلى أن الفطرة قد أنتجت التكسولات في بيئة طبيعية رخيصة الثمن ومتوفرة في الأسواق.

توصي هذه الدراسة بإجراء تعريف دقيق للعزلات البكتيرية والفطرية وتقييم قدرتها جميعاً في إنتاج منتجات حيوية على بيئات محلية رخيصة الثمن. ثم دراسة فعالية تلك المنتجات الحيوية كمضادات ميكروبية ومضادات للأورام الخبيثة ومضادات أكسدة. كما توصي بالتعمق في دراسة قدرة الفطرة المعزولة في هذه الدراسة على إنتاج التكسولات بحيث يتم تقدير الظروف المثالية للإنتاج ومقدار الريع من المنتج وتأسيس وحدات إنتاجية على المستوى المعملي تمهيدا لنقلها إلى المستوى التجاري.

المراجع

قائمة المراجع العربية:

الخرساني، محمد عبدالواسع (٢٠٠٥م). دليل المناخ الزراعي في اليمن. ١٨٨١-٢٠٠٤

باوزير، عبدالعزيز أحمد . (٢٠٠٤م). التباين الحيوي في الموارد الوراثية لمحاصيل الحبوب المزروعة بالمناطق الجنوبية من اليمن. المجلة اليمنية للبحوث والدراسات الزراعية. ٢٣-١١٩.

الرياض (٢٠١٣) لمحة تاريخية عن رماح. النسخة الإلكترونية من صحيفة الرياض اليومية الصادرة من مؤسسة اليمامة الصحفية. العدد ١٦٤٠٠.

الشهري، عبدالله بن عامر(٢٠١٣). تقييم فعالية المستخلصات الكحولية للفطريات الداخلية في بعض نباتات روضة خريم. رسالة ماجستير – جامعة الملك سعود. الرياض. ص ٨.

قائمة المراجع الأجنبية

Alcamo, E. (2001)Fundamentals of Microbiology. Jones and Bartlett Publishers, Inc.Pp(88-468).

Allen, S.E., Grimshaw, H.M., Parkinson, J.H., Quarmby, C., (1974) Chemical Analysis of Ecological Materials. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

Azam A., Bonkoungou, Bowe, dekock, Godara, Williams. (2006) Ber. International Centre for Underutilised Crops, Southampton, UK.

Andrew M., Peever T.L. (2009). An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored Alternaria species complex. Mycologia, 101(1):95–109.

Bhandari, M.M. , Bhansali, A.K. (2000). Rhamnaceae. In: Singh et al. (eds), Flora of India. Vol. 5.Botanical Survey of India, Calcutta, pp. 1-577.

Collentte S. (1998). An illustrated guide to the flowers of Saudi Arabia. Scorpion Publish.Ltd.London.

Dacre J., Sharpe M.E. (1956). Catalase Production by Lactobacilli. Nature. 178,700.doi:10.1038/178700a0.

Fernandes M.R.V, Silva A.C, Pfenning Ludwig Heinrich, Costa-Neto Claudio Miguel da, Heinrich Tassiela Andrea, Alencar Severino Matias de, Lima Marisa Aparecida de, Ikegaki Masaharu,(2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus Alternata isolated from coffea Arabica L. 45(4): 677-685.

Gangadevi V., Muthumary J., (2008). Isolation of Colletotrichum gloeosporioides, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of medicinal plant, justicia gendarussa. 5:1-4.

Gao S.S,Li XM, Wang B.G.(2009). Perylene derivatives produced by Alternaria alternate , an endophytic fungus isolated from Laurencia species. Nat Prod Commun. 4(11):1477-1480.

Gao SS, Li XM, Du Feng-Yu, Li SS, Proksch P, Wang BG (2011). Secondary Metabolites from a Marine derived Endophytic Fungus Penicillium chrysogenum QEN-24s. Mar Drugs. 27;9(1):59-70.

Kumaran R.S., Muthumary J., Hur B.K. (2008) Production of Taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp., Eng. Life Sci. 8(4) 438-446.

Magurran A.E., 1988. Ecological Diversity and its Management Princeton University Press, Princeton, NJ. 113–125

Nicoletti R, Ciavatta M.L, Buommino E., Tufano MA.(2008) . Antitumer Extrolites Produced By Penicillium species. Intern. J. Biomed. Pharmac. Scie. 2(1):1-23.

publish. Ltd. London.

Rodriguez, R. J., White Jr J. F., Arnold A. E. and Redman R. s. (2009) Fungal endophytes : diversity and functional roles. New Phytologist. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.

Ryan, RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. (2008).Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters. 278 (1): 1-9.

Soliman, S.S, Raizada M.N. (2013) Interactions between Co-Habitating fungi Elicit Synthesis of Taxol from an Endophytic Fungus in Host Taxus Plants. Front Microbiol. 22;4:3. doi: 10.3389/fmicb.2013.00003.

Tortora, G.j.,Funke B.R.,Case C.L. (2007)Microbiology an introduction. Pearson Education (US). Pp312-382.

Xu, D.; Cote, J.C. (2003). "Phylogenetic relationships between Bacillus species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53 (3): 695–704.

Zabalgogeazcoa, I (2008). Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens, Spanish journal of Agricultural Research , 6 (special issue),138-146.