الفطريات المستنبتة في نبات الآس (*Myrtus communis*) Myrtle وفعاليتها الأنزيمية الخارج خلوية

بتول زينل علي
هدى محمد كاظم
قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم)/ جامعة بغداد

استلم البحث في :15 / ايلول/2014 , قبل البحث في 24/تشرين الثاني /2014

الخلاصة

استهدفت هذه الدراسة عزل وتشخيص الفطريات المستنبتة في أوراق نبات الآس Myrtle (*Myrutus communis*) ودراسة فعاليتها الأنزيمية الخارج خلوية. أظهرت نتائج عزل الفطريات المستنبتة في 500 قطعة أوراق الحصول على 99 فطراً مستنبتاً وبنسبة استيطان كلية 20.4%. تعود هذه الفطريات إلى 23 نوعاً أو عزلة سادت فيها أنواع جنس *Aspergillus* (11) نوعاً بنسبة استيطان 14%، وساد النوعان *A. niger*، *A. flavus* على هذه الأنواع، كما عزلت فطريات أخرى تعود للأجناس *Penicillium* spp.، *Cladosporium* spp.، *Cunninghamella* sp.، *Drechslera* sp.، *Alternaria* sp.، *Paecilomyces* sp. وفطريات عقيمة.
أما فعالية هذه الفطريات في إفراز الأنزيمات الخارج خلوية، فقد أظهرت النتائج تباين هذه الفطريات في إفراز الأنزيمات في الوسط الصلب نوعاً وفعالية، وأظهرت نسبة 91.3% من هذه الفطريات قابلية لإفراز أنزيم الاميليز ونسبة 69.5% منها لإفراز لايبيز كذلك 86.9% لإفراز البكتينيز، وأظهرت نسبة 82.6% و73.9% و13% قابلية لإفراز السليوليز، البروتييز واللاكيز على التوالي. وقد أظهرت بعض العزلات فعالية عالية لإفراز بعض هذه الأنزيمات مما يعطي إشارة إلى إمكانية استغلال أنزيمات هذه الفطريات في تطبيقات عديدة بعد فصلها وتوصيفها.

الكلمات مفتاحية: الفطريات المستنبتة والفعالية الانزيمية ونبات الآس Myrtle.

المقدمة

الفطريات المستنبتة هي الفطريات التي تغزو الأنسجة الحية للنبات من دون إحداث أي ظاهرة مرضية لها، وتتواجد إما داخل أو بين الخلايا بعلاقة تكافلية متوازنة بين الفطر والنبات العائل [1، 2]. وقد أشير إلى أن جميع النباتات الموجودة على سطح الكرة الأرضية التي تقدر بما يزيد على 300.000 نبات تحوي ما لا يقل عن مليون فطر مستنبت [3].

لقيت الفطريات المستنبتة حديثاً الكثير من الاهتمام وذلك لأن أغلبيتها تتصف بإنتاجها للعديد من المركبات الفعالة احيائياً التي تكسب النبات العائل دفاعات اتجاه الممرضات المختلفة فضلاً عن جعلها تتكيف وتقاوم الظروف البيئة المتطرفة [4، 5]. وقد وجد أن أغلب هذه المركبات التي تنتجها الفطريات المستنبتة تكون مشابهة لما هي عليه في نباتاتها العائلة وذلك نتيجة تطورها ومعيشتها المتبادلة معاً بحيث تؤدي إلى انتقال الجينات بينهما [6، 7]. لذلك أشار العلماء إلى أن الفطريات المستنبتة قد تكون مصدراً يعتمد عليه في لإنتاج مركبات لها فعالية دوائية أو صناعية أو تدخل في الزراعة كبدائل للمركبات والمضادات الصناعية التي تزداد مقاومة الأحياء لها بمرور الزمن [8]. وبالرغم من أن أغلب الدراسات عن الفطريات المستنبتة ركزت على فعاليتها المضادة للأحياء المجهرية واستعمالها كمصادر لأغراض طبية، إلا أن القليل من هذه الدراسات اهتمت بالتطبيقات الزراعية والصناعية لاسيما إنتاج الأنزيمات. في هذا المجال ذكر [9] أن إنتاج الأنزيمات بواسطة الفطريات المستنبتة للأغراض الصناعية يعد من المجالات غير المكتشفة ويمثل مصدراً حديثاً للحصول على أنزيمات لها فعاليات مختلفة، ومن المعروف أن الفطريات بصورة عامة تعد مصادر للعديد من الأنزيمات التي تدخل في الصناعات الغذائية والمشروبات وصناعة الجلود، والأنسجة، الورق، وغيرها من الصناعات، كما تعد أنزيمات الفطريات أكثر ثباتاً مقارنة بمصادر الأنزيمات الأخرى (حيوانية، أو نباتية أو بكتيرية) [9]. وأشار عدد من الدراسات أن بإمكان الفطريات المستنبتة إنتاج العديد من الأنزيمات الخارج خلوية كميكانيكية لمقاومة الممرضات فضلاً عن الحصول على الغذاء من العائل، ومن هذه الأنزيمات هي الاميليز، والبكتينيز، والسليوليز، واللاكيز والبروتييز [10، 11]. فضلاً عن ذلك فإن عمليات التحول الحيوي باعتماد نظام أنزيمات الأحياء المجهرية ومنها الفطريات المستنبتة لقيت اهتماماً كبيراً من الباحثين في الوقت الحاضر مما يعطي إشارة إلى إمكانية استعمال هذه الفطريات في إزالة السمية مثلاً أو في عمليات التحول الحيوي Bioremediation للمخلفات الصناعية والزراعية وغيرها من المركبات الملوثة للبيئة [11].

استعملت اوراق نبات الآس في هذه الدراسة لما لهذا النبات من أهمية طبية وسعة انتشار، إذ يستخلص منه زيت طيار يدخل في صناعة العطور، كما يستعمل مستخلص الأوراق كمعقم ومضاد للالتهابات في الطب الشعبي، كما يحوي المستخلص على بعض المركبات التي أظهرت فعالية مضادة للأكسدة، ومضادة للخلايا السرطانية. كما يستعمل مستخلص الأوراق والثمار والزيت الطيار في علاج العديد من الحالات المرضية منها قرحة المعدة، والإسهال الديزانتري، والروماتزم وغيرها من الاستعمالات الطبية [12].

المواد وطرائق العمل

- **عينات نبات الآس:** تم جمع أوراق نبات الآس سليمة وخالية من أي تبقعات أو أعراض مرضية من مناطق متفرقة من بغداد خلال المدة تشرين الثاني- كانون الأول 2013. جمعت الأوراق في أكياس بلاستيكية نظيفة ونقلت إلى المختبر لعزل الفطريات المستنبتة فيها التي تمت في يوم الجمع نفسه.
- **عزل الفطريات المستنبتة في أوراق الآس:** اتبعت في ذلك طريقة [13]، إذ تم غسل الأوراق بكمية كبيرة من ماء الحنفية لإزالة الأتربة والغبار، ثم قطعت الأوراق إلى قطع صغيرة بأبعاد 0.5-1 سم، بعدها عقمت سطحياً بالكحول الاثيلي 75% أولاً لمدة دقيقة واحدة، ثم غمرت بعد ذلك في محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2.5% لمدة 4 دقائق، بعدها اعيد غمرها بالكحول الاثيلي بتركيز 75% لمدة 30 ثانية، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات، وجففت القطع بأوراق ترشيح معقمة، ثم زرعت القطع في أطباق بتري حاوية على وسط PDA المضاف إليه صبغة الروزبنكال (50 ملغم/ لتر) قبل التعقيم ومضاد الكلورامفنيكول (0.5 غم/ لتر) الذي أضيف إلى الوسط بعد التعقيم، ووزعت قطع الأوراق بعدد 5 لكل طبق بأبعاد متجانسة، غلفت الأطباق بشريط شمعي Parafilm وحضنت بدرجة حرارة 25±2°م لمدة 3-4 أسابيع مع مراقبة نمو المستعمرات يومياً. عزلت المستعمرات النامية من قطع النسيج النباتي لتشخيصها بالاعتماد على الصفات المزرعية والمظهرية الدقيقة بالاعتماد على المصادر التصنيفية [14، 15، 16، 17]، وتم حساب النسبة المئوية للاستيطان بالاعتماد على:

$$100 \times \frac{\text{عدد مستعمرات النوع أوالجنس}}{\text{عدد القطع الكلية}} = \%\mathbf{C.F.}\ (\mathbf{Colonization\ Frequency})$$

- **الكشف عن فعالية الفطريات المعزولة في إنتاج الأنزيمات الخارج خلوية:** تم الكشف عن قابلية الفطريات المستنبتة المعزولة لإنتاج الأنزيمات الخارج خلوية على الوسط الصلب بوجود مواد الأساس الخاصة بكل أنزيم. ضمت الأنزيمات:

1- **الاميليز**: اتبعت طريقة [9]، إذ نميت الفطريات على الوسط GYP (كلوكوز 1غم، ومستخلص خميرة 0.1غم، وببتون 0.5غم، وآكار 16غم، وماء مقطر لتر)، أضيف إليه 0.2% نشأ ذائب وضبط الآس الهيدروجيني إلى pH=6. زرعت الأطباق بعد تعقيمها وتصلبها بأقراص مأخوذة من حافة مزارع الفطريات النامية على وسط PDA بعمر 7 أيام، بعدد 3 أقراص في كل طبق بمسافة متجانسة وعدت كمكررات. حضنت الأطباق بدرجة 27°م لمدة 3-5 أيام، بعدها أخرجت الأطباق من الحاضنة وغمرت بمحلول اليود لمدة 15-20 دقيقة، ثم سكب المحلول الزائد، إن ظهور هالة شفافة حول المستعمرة النامية دليل على إنتاج أنزيم الاميليز. تم قياس قطر المستعمرة الفطرية وحدها، كما قيس قطر المستعمرة مع منطقة التحلل لتحديد النسبة المئوية للتحلل عن طريق المعادلة:

$$\text{النسبة المئوية للتحلل} = \frac{\text{قطر المستعمرة الفطرية لوحدها(ملم)}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية + منطقة التحلل}}$$

إذا كانت القيمة 1 فيعني أن العزلات غير قادرة على إفراز الأنزيم، وإذا كانت أقل من 1 وأكبر من 0.69 فتكون العزلات منخفضة الإنتاج لهذا الأنزيم، أما إذا كانت القيمة أقل من 0.69 وأكبر من 0.3 فيعني أنها جيدة للإنتاج، وإذا كانت القيمة أقل من 0.3 فتكون القابلية عالية جداً [18].

2- **أنزيم اللابيز**: اتبعت طريقة [3] في ذلك، إذ نميت عزلات الفطريات بصورة أقراص مقلوبة حاوية على النمو الفطري بالطريقة نفسها للأنزيم السابق على وسط البيتون آكار (ببتون 10غم، كلوريد الصوديوم NaCl 5 غم، وآكار 16غم، ولتر ماء مقطر) الذي أضيف إليه Tween 20 كمصدر للدهن الذي عقم وحده، وتم تعديل قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط إلى pH=6. حضنت الأطباق بالطريقة السابقة نفسها، بعد الحضانة النتيجة الموجبة لإفراز الأنزيم تظهر بصورة هالة من ترسبات ملحية محيطة بالمستعمرة بصورة ترسبات بلورية تمثل أملاح الكالسيوم لحامض Lauric acid [19]. حسبت نسبة التحلل بالاعتماد على المعادلة السابقة نفسها آخذين بالحسبان الأمور نفسها في الأنزيم السابق.

3- **أنزيم البكتينيز:** اتبعت طريقة [9]، إذ نميت العزلات بصورة أقراص على وسط البكتين (بكتين 5 غم، مستخلص خميرة 1 غم، وآكار 6 غم، وماء مقطر لتر) بعدها تم ضبط الرقم الهيدروجيني إلى pH=5، بعد مدة الحضانة غمرت الأطباق بالمحلول المائي Hexadecyl trimethyl ammonium bromide لمدة 20-30 دقيقة ثم سكب الفائض في المحلول. يدل ظهور هالة شفافة حول المستعمرات النامية على إيجابية إفراز هذا الأنزيم التي قدرت نسبة التحلل كما ذكر آنفاً.

4- **أنزيم اللاكيز Laccase:** اتبعت طريقة [9]، إذ نميت أقراص الفطريات على وسط GYP المضاف اليه 5% من مادة L-naphthol، وعدل الرقم الهيدروجيني إلى pH=6. بعد مدة الحضانة فحصت الأطباق. تدل إيجابية إفراز هذا الأنزيم على ظهور منطقة تحيط بالمستعمرة بلون أزرق بنفسجي نتيجة أكسدة النافثول بواسطة هذا الأنزيم.

5- **أنزيم السليوليز:** اتبعت طريقة [3]، إذ نميت العزلات على وسط GYP المضاف اليه 0.5% من مركب Carboxy methyl cellulose (CMC) كمصدر للسليليوز، وبعد مدة الحضانة 3-5 أيام غمرت الأطباق الحاوية على المستعمرات بمحلول أحمر الكونكو Cango red (0.2%) لعدة دقائق، ثم سكب المحلول، وغمرت الأطباق مرة ثانية بمحلول كلوريد الصوديوم NaCl (1M) لعدة دقائق ثم سكب المحلول الزائد. إن ظهور هالة شفافة بلون أخضر فاتح حول المستعمرات النامية مقارنة باللون الوردي للوسط الزرعي دلالة على فعالية الأنزيم المفرز.

6- **أنزيم البروتييز:** اتبعت طريقة [3] إذ نميت العزلات الفطرية على وسط GYP الحاوي على 0.4% جيلاتين كمصدر للبروتين الذي عقم وحده في المؤصدة، وعدل الرقم الهيدروجيني للوسط إلى pH=6، وبعد مدة الحضانة للفطريات النامية (3-5 أيام) غمرت الأطباق بمحلول مشبع من كبريتات الأمونيوم لمدة 15-30 دقيقة، ثم سكب الفائض، دل ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات النامية على إيجابية إفراز الأنزيم بواسطة الفطر.

النتائج والمناقشة

- **عزل الفطريات المستنبتة في أوراق نبات الآس وتشخيصها:** أشارت العديد من الدراسات إلى أهمية التحري عان الفطريات المستنبتة في النباتات الطبية التي تعد مصادر مهمة لهذه الفطريات، إذ يمكن أن تنتج مركبات فعالة مشابهة لتلك الموجودة في عائلاتها النباتية، ويمكن أن تكون بديلة عنها. أظهرت نتائج عزل الفطريات المستنبتة في أوراق نبات الآس ومن مجموع 500 قطعة أوراق، الحصول على عدد كلي للعزلات بواقع 99 فطراً مستنبتاً وبنسبة استيطان كلية بلغت 20.4%، تنتمي هذه الفطريات إلى 23 نوعاً او عزلة (جدول1) سادت فيها أنواع جنس *Aspergillus* (11 نوعاً) بشدة استيطان كلية لأنواع هذا الجنس بلغت 14% وساد فيها النوعان *A. niger*، *A.*

flavus بشدة استيطان 7.4% و 3% للنوعين على التوالي، وظهرت بقية الأنواع بنسب تراوحت بين 0.2% - 1.6%. كما أمكن الحصول على عدة عزلات من جنس *Penicillium* ونوع واحد أو أكثر لكل من *Cladosporium*، *Cunninghamella*، *Drechslera*، *Alternaria*، *Paecilomyces* بنسب استيطان تراوحت بين 0.2 – 2%، بصورة عامة تعد شدة الاستيطان العامة منخفضة نسبياً لكنها تتفق مع نتائج دراسات أخرى عن الفطريات المستنبتة في نباتات أخرى [20، 21، 22] قد تعزى إلى عدد من العوامل منها احتواء النبات على مركبات مضادة للفطريات، كما يتأثر تنوع وكثافة الفطريات المستنبتة بطبيعة الغطاء النباتي القريب منها فضلاً عن توافر الرطوبة وأن عمر النبات له دور فعال في ذلك، إذ إن الأجزاء القديمة من النبات تحوي مجاميع أكثر من الفطريات مقارنة بالأجزاء الفتية كما أن لتلوث الهواء تأثيراً سلبياً في وجود هذه الفطريات [23]. إن أغلب الفطريات المعزولة في هذه الدراسة ومنها أنواع جنس *Aspegillus* قد تم عزلها في دراسات أخرى كفطريات مستنبتة في نباتات طبيبة اخرى [20، 24، 25، 26].

- **الأنزيمات المفرزة بواسطة الفطريات المعزولة في الوسط الصلب:** أظهرت نتائج الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة لإفراز الأنزيمات الخارج خلوية التي ضمت أنزيمات الاميليز، واللايبيز، والبكتينيز، واللاكيز، والسليوليز والبروتييز (جدول 2). إن نسبة 91.3% من هذه الفطريات أفرزت أنزيم الاميليز ونسبة 69.3% منها أفرزت أنزيم اللايبيز كذلك 86.9% أفرزت أنزيم البكتنيز و82.6% أنزيم السليوليز ونسبة 73.9% أنزيم البروتييز، كما اظهرت نسبة 13% فقط قابلية لإنتاج أنزيم اللاكيز. يلاحظ من الجدول (2) كذلك الفعالية الضعيفة للفطر *D. australiensis* في إنتاج الأنزيمات كافة تحت الاختبار بالمقابل الفعالية العالية لبعض هذه الفطريات ومنها *A. niger*، *A. glaucus*، *Pen.* sp.2، Mycelia sterilia hyaline في إنتاج اغلب الأنزيمات، أما الفطر *A. terreus* فقد تميز في إفراز أنزيم اللايبيز بكفاءة عالية.

وبالرجوع إلى النسب المئوية لتحليل هذه الأنزيمات وفعالية كل أنزيم التي تؤكد تباين الفطريات في نسب تحليلها لمواد الأساس الخاصة بكل أنزيم (الأشكال 1-6)، فقد تراوحت نسبة التحلل لأنزيم الاميليز الكلية للفطريات بين أضعفها قابلية (النسبة المئوية للتحلل 0.97%) إلى أعلاها فعالية (النسبة المئوية للتحلل 0.44%) (شكل 1 أ، صورة 1 أ)، وأظهرت العزلات *Pen.* sp.2 ، *A.candidus*، *A.wentii* قابلية جيدة لإفراز هذا الأنزيم (نسبة التحلل < 0.69 > 0.3%)، وقد ذكر [9] أن فعالية أنزيم الاميليز للفطريات المستنبتة تساعد على تحطيم النشأ الموجود في النبات العائل عند الشيخوخة .

أما أنزيم اللايبيز (شكل 1 ب، صورة 1 ب) فقد تراوحت النسبة المئوية للتحلل الكلية له من قبل جميع الفطريات المنتجة بين أقلها فاعلية (نسبة التحلل 0.98%) إلى أعلاها فاعلية (نسبة التحلل 0.27%) والتي مثلتها عزلة الفطر *A. terreus*، وهذا يشير إلى قابلية هذا الفطر لاستعمال الدهون كمصادر طاقة [21]. أما أنزيم البكتينيز [شكل 1 ج، صورة 1 ج] فقد أظهرت النتائج كذلك اختلاف العزلات في إنتاجها لهذا الأنزيم، وتراوح معدل نسب التحلل للفطريات اجمعها بين أوطئها نسبة تحلل 0.96% وأعلاها نسبة 0.41% أظهرها الفطر *C. cladosporoides*، وقد ذكر [9] أن فعالية أنزيم البكتنيز يعد مهماً للعملية الإمراضية للفطريات اتجاه النباتات كذلك في عملية التكافل بين النباتات والأحياء المجهرية، فضلاً عن أهميته في تحليل مخلفات النباتات الميتة، وذكر العالم [27] أنه في حالة أن الفطر المستنبت ثبتت قابليته على إنتاج هذا الأنزيم؛ يدل على أن هذا الفطر يمكن أن يكون ممرضاً كامناً.

أما أنزيم اللاكيز (جدول 2) فأظهرت 3 عزلات فقط من مجموع 23 (13%) قابلية ضعيفة لإنتاجه تمثلت بالأنواع *D. austraiensis*، *P. variotii*، Mycelia sterilia ولم تنمُ بقية الفطريات على الوسط الغذائي الخاص بهذا الأنزيم. وتتفق هذه النتيجة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى أن الفطريات بطبيعتها تكون فاقدة لهذا الأنزيم إذ أنه يمكن أن يضر ويؤدي إلى هلاك النبات العائل [9، 28].

أما أنزيم السليوليز (شكل 1 د، صورة 1 د) فقد ظهرت نسبة التحلل الكلية للفطريات بين أضعفها قابلية (نسبة التحلل 0.94%) إلى أعلاها فاعلية (نسبة التحلل 0.42%) التي أظهرتها عزلة الفطر العقيم الشفاف كذلك أظهرت العزلة *A. terreus* قابلية جيدة لإفراز هذا الأنزيم (نسبة التحلل 0.45%). وقد أشير إلى أن الفطر المستنبت الذي له قدرة جيدة لإفراز هذا الأنزيم مع أنزيم البكتنيز يدل على أن الفطر له القدرة الجيدة على اختراق خلايا العائل الحية فضلاً عن قابليته على تحليل المكونات الميتة [9].

أما أنزيم البروتييز (شكل 1 هـ، صورة 1 هـ) فأظهرت نسبة 52% من الفطريات المختبرة فعالية ضعيفة إلى متوسطة لإفراز هذا الأنزيم (نسبة التحلل < 1 > 0.69%) بالمقابل أظهرت نسبة 21.8% من هذه الفطريات فعالية جيدة لإفراز الأنزيم (نسبة التحلل < 0.69 > 0.3%) وضمت العزلات *Pen.* sp.4 و *Alternaria raphani*، *Pen* sp.1، *P. variotii*، *A. niger*. تؤدي أنزيمات البروتييز دوراً فعالاً في إمراضية الفطريات، إذ تعمل على تحليل البروتينات الموجودة في الأنسجة الحية كما تساعد الفطريات المستنبتة في التغلغل داخل أنسجة العائل وذلك بتحطيم الكلايكوبروتين الليفي Fibrous glycoprotein في الجدار الخلوي.

تشير نتائج الكشف عن الأنزيمات المفرزة من الفطريات المستنبتة في أوراق الآس إلى الفعالية العالية لبعض هذه الفطريات في إفراز أنزيمات لها أهمية اقتصادية يمكن أن تستغل في تطبيقات عديدة بعد فصلها وتوصيفها.

المصادر

1-Kogle, K. H.; Franken, P. & Hückelhoven, R. (2006). Endophyte or paratsite -what decides? Current opinion in plant biology., 9(4): 358-363.
2-Li, E.; Tian, R.; Liu, S.; Chen, X.; Guo, L. & Che, Y. (2008). Pestalothelos A-D, Bioactive metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis theae.* J. Nat. Prod., 71(4): 644-668.
3-Amirita, A.; Sindhu, P.; Swetha, J.; Vasanthi, N. S. & Kannan, K. P. (2012). Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. World. J. Sci. & Technol., 2(2): 13-19.
4-Yu, H.; Zhang, L.; Li, L.; Zheng, C.; Guo, L.; Li, W.; Sun, P. & Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. Microbiol. Res., 165(6): 437-449
5-Ramesha, A. & Srinivas, C. (2014). Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts of endophytic fungi isolates from *Plumeria acuminta* L. and *Plumeria obtusifolia* L. Eurp. J. Experental. Biol., 4(2): 35-43.
6-Prabavathy, D. & Nachiyar ,V. (2013). Cytotoxic potential and phytochemical analysis of *Justucia bedomei* and its endophytic *Aspergillus* sp. Asian J. pharma & Clinic. Res., 6(5): 159-161.
7-Selvi, K. B.; & Balagengatharathilagam, P. (2014). Isolation and screening of endophytic fungi from medicinal plants of virudhunagar district for antimicrobial activity. Inter. J. Sci. & Nat., 5(1): 147-155.
8-Sadrati, N.; Daoud, H.; Zerroug, A.; Dahamna, S. & Bouharati, S. (2013). Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat *Triticum durum*. J. plant. Port. Res., 53(2): 128-136.
9-Sunitha, V. H.; Nirmala, D. & Srinivas, C. (2013). Extracellular Enzymatic Activity of endophtic fungi strains isolated from medicinal plants. World J. Agric. Sci., 9(1): 1-9.
10-Selim, K. A.; El-Beih, A. A.; Abdel-Rahman, T. M. & El-Diwany, A. I. (2012). Biology of endophytic Fungi. Curr. Res. Environ. & Appl. Mycol., 2(1): 31-82.
11-Sathish, L.; Pavithra, N. & Ananda, K. (2012). Antimicrobial activity and biodegrading enzymes of endophytic fungi from *Eucolyptus.* Inter. J. Pharmac. Sci. & Res., 3(8): 2574-2583.
12-Sumbul, S.; Ahmed, M. A.; Asif, M.; & Akhtar, M. (2011). *Myrtus communis* Linn. a review. Ind. J. Nat. Prod. & Resorc., 2(4): 395-402.
13-Al-Mahi, I. M.; Al-Tahir, I. & Idris, E. (2013). Antibacterial activity of endophytic fungi extracts from medicinal plant *Kigelia africana* Egypt. Acad. J. Biol. Sci., 5(1): 1-9.
14-Raper, K. B. & Fennel, D. I. (1965). The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wikins.
15-Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1970). Illustrated genera of imperfect fungi: 3rd ed., Burgess. Publ. Co. Minnesota.
16-Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous hyphomycites. Comman wealth Mycological institute, England.
17-Samson, R. A.; Noonim, P.; Merjer, M.; Houbraken, J.; Frisvad, J. C. & Varga, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergillai. Stud. Mycol., 59:129-145.
18-Price, M. F.; Wilkinson, I. D. & Gentry, L. (1982). Plate method for detection of phospher lipase activity in *Candida albican.* Sabouraudia., 20: 7-14.
19-Maria, G. L.; Sridhar, K. R. & Raviraja, N. S. (2005). Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. J. Agric. Technol., 1: 67-80.
20-Khan, R.; Shahzad, S.; Choudhary, M. I.; Khan, S. A. & Ahmed, A. (2010). Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera.* Pak. J. Bot., 42(2): 1281-1287.

21-Anitha, D.; Vijaya, T.; Pragathi, D.; Reddy, N. V.; Mouli, K. C.; Venkateswarulu, N. & Bhargav, D. S. (2013). Isolation and characterization of endophytic fungi from endemic medicinal plants of *Tirnmala hills*. Int. J. Life Sci. Bt. & Pharm. Res. 2(3): 367-373.
22-Selvanathan, S.; Indrakumar, I. M. & Johnpaw. (2011). Biodiversity of endophytic fungi isolated from *Calotropis gigantea* (L.). Rec. Res. Sci & Tchenol., 3(4) : 94-100.
23-Arnold, A. E.; Mejia, L. C.; Kyllo, D.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Robbins, N. & E. A. Herre (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proc. Nat. Acad. Sci., 100(26): 15649-15654.
24-Pharamat, T.; Palaga, T.; Piapukiew, J.; Whalley, A. J. S. & Sihanonth, P. (2013). Antimicrobial and anticancer activities of endophytic fungi from *Mitrajyna javanica***.** Koord & Val. Afr. J. Microbiol. Res., 7(49): 5565-5572.
25-Darbha, N. S.; & Tikole, S. S. (2013). Studies on endophytic fungi of ayurvedic medicinal plant *Gymnema sylvestre***.** Int. J. Curr. Sci., 7: 118-127.
26-Goveas, S. W.; Madtha, R.; Nivas, S. K. & Souza, L. D. (2011). Isolation of endophytic fungi from a red listed endangered medicinal plant. Eur. Asian J. Biosci. 5: 48-53.
27-Choi, Y. W.; Hodgkiss, I. J. & Hyde, K. D. (2005). Enzyme production by endephytes of *Brucea javanica*. J. Agric. Technol., 1: 55-66.
28-Devi, N. N; Prabakaran, J. J. & Wahab, F. (2012). Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2(3): 1280-1284.

جدول رقم (1): الفطريات المستنبتة المعزولة من أوراق نبات الآس *M. communis* والنسب المئوية لاستيطانها

الفطريات المستنبتة	عدد المستعمرات	النسبة المئوية للاستيطان C.F%
Alternaria raphani	1	0.2
Aspergillus spp.	70	14
A. candidus	2	0.4
A. clavatus	1	0.2
A. flavus	15	3
A. glaucus	1	0.2
A. niger	37	7.4
A. ornatus	1	0.2
A. parvulus	8	1.6
A. raperi	1	0.2
A. sclerotioniger	1	0.2
A. terreus	1	0.2
A. wentii	1	0.2
Cladosporium sp.	10	2
Cladosporium cladosporoides	2	0.4
Cunnighamella sp.	1	0.2
Drechslera australiensis	1	0.2
Paecilomyces variotii	3	0.6
Penicillium spp.	8	1.6
Pen 1	2	0.4
Pen 2	2	0.4
Pen 3	2	0.4
Pen 4	2	0.4
Mycelia sterilia	3	0.6
Mycelia sterilia (hyaline)	1	0.2
Mycalia sterilia (white)	2	0.4
العدد الكلي	99	20.4
قيمة مربع كاي		**6.226
(P ≤ 0.01)**		

جدول رقم (2): الفعالية الأنزيمية للفطريات المستنبتة على الوسط الصلب.

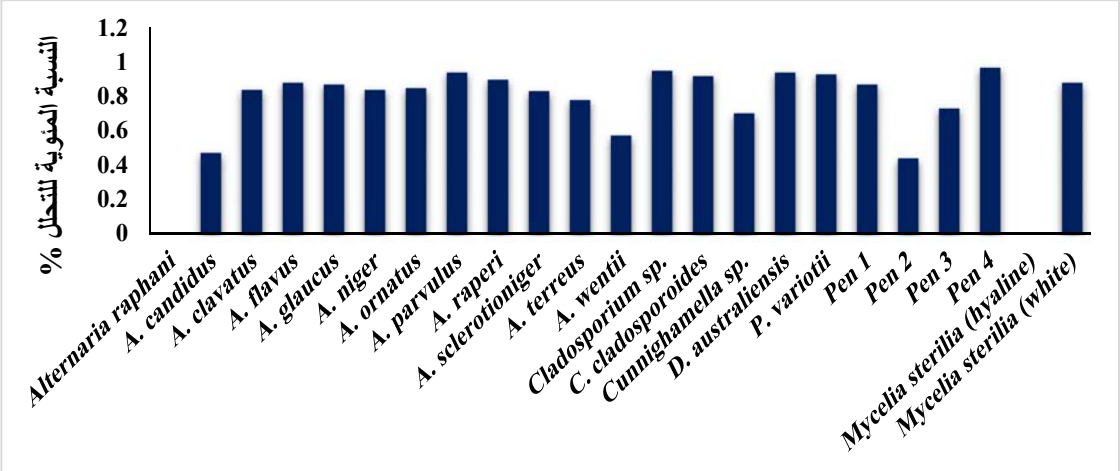
الفطريات المستنبتة	الإميليز	اللابيز	بكتيز	اللاكيز	السليوليز	البروتييز
Alternaria raphani	-	-	+	-	++	++
Aspergillus candidus	++	-	+	-	-	+
A. clavatus	+	++	+	-	-	+
A. flavus	+	+	+	-	-	-
A. glaucus	+	++	+	-	+	+
A. niger	+	++	+	-	+	++
A. ornatus	+	+	+	-	++	+
A. parvulus	+	-	+	-	+	+
A. raperi	+	+	+	-	+	+
A. sclerotioniger	+	++	+	-	+	+
A. terreus	+	+++	+	-	++	-
A. wentii	++	++	++	-	++	-
***Cladosporium* sp.**	+	+	-	-	++	-
C. cladosporoides	+	++	++	-	+	-
***Cunnighamella* sp.**	+	+	+	-	+	-
D. australiensis	+	-	-	+	-	+
P. variotii	+	+	-	-+	++	++
***Pen* 1**	+	+	+	-	+	++
***Pen* 2**	++	+	+	-	++	+
***Pen* 3**	+	+	+	-	+	+
***Pen* 4**	+	-	++	-	+	++
Mycelia sterilia (hyaline)	-	+	++	+	++	+
Mycelia sterilia (white)	+	-	+	-	++	+
النسبة المئوية	%91.3	%69.5	%86.9	%13	%82.6	%73.91

+ = ضعيف إلى متوسط

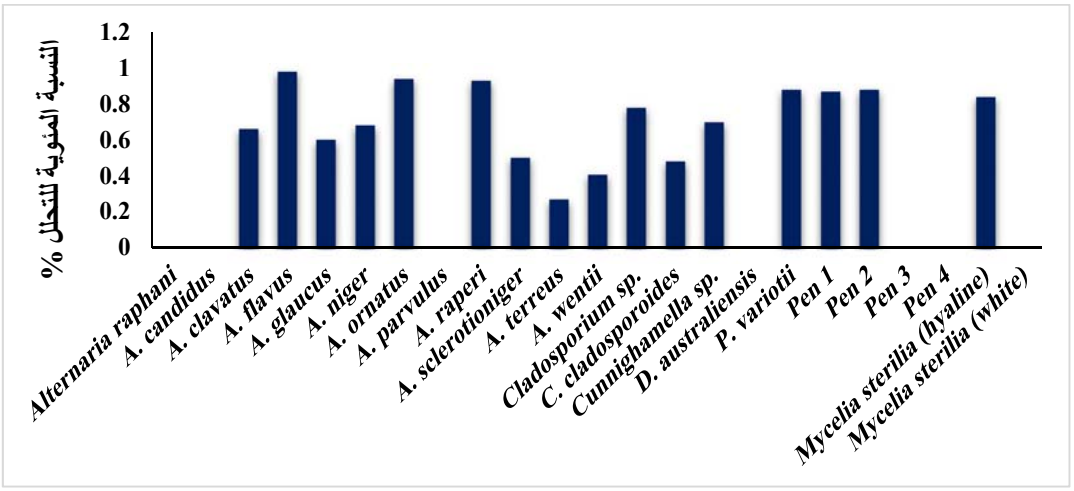
++ = جيد

+++ = عالٍ

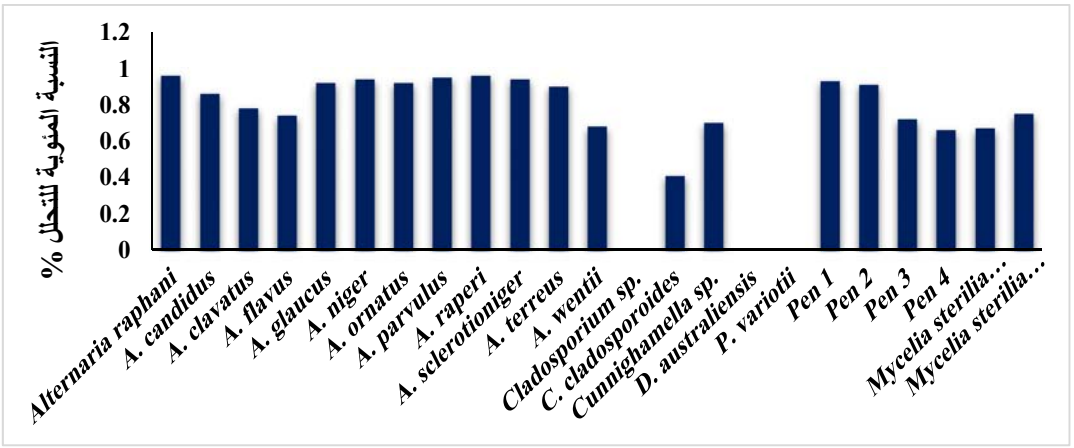
– = غير قادر على الإنتاج



أ

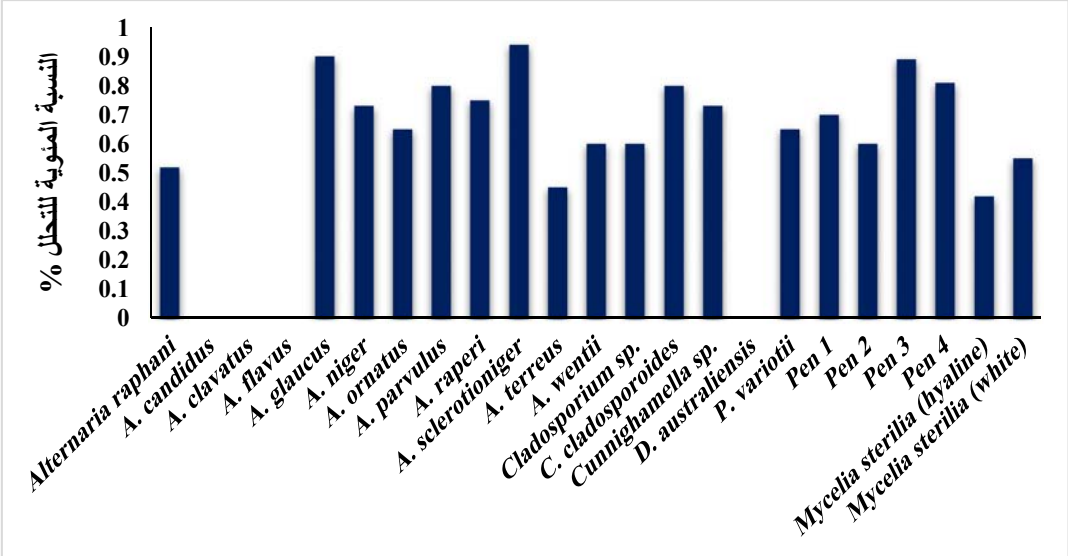


ب

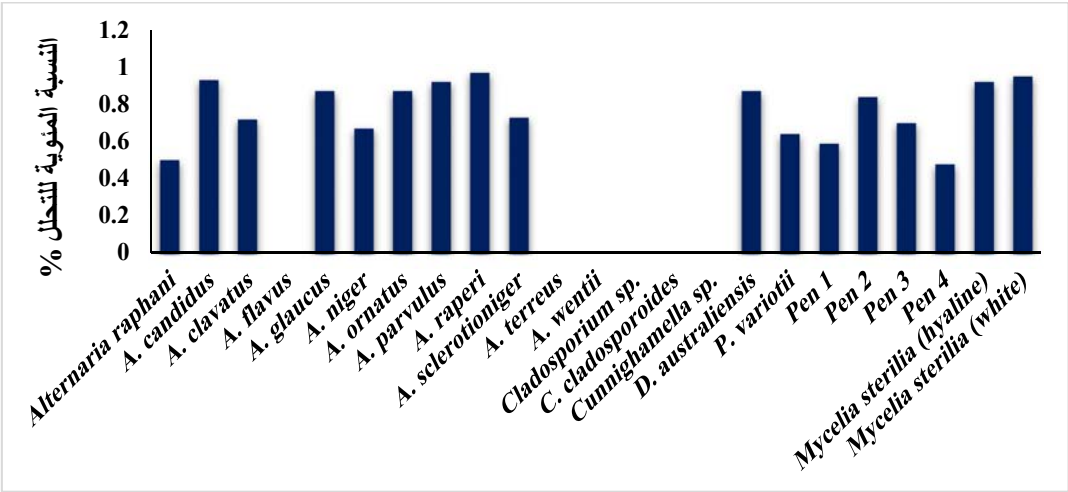


ج

شكل رقم (1): الفعالية الانزيمية الخارج خلوية للفطريات المستنبتة المعزولة من أوراق نبات الآس على الوسط الصلب

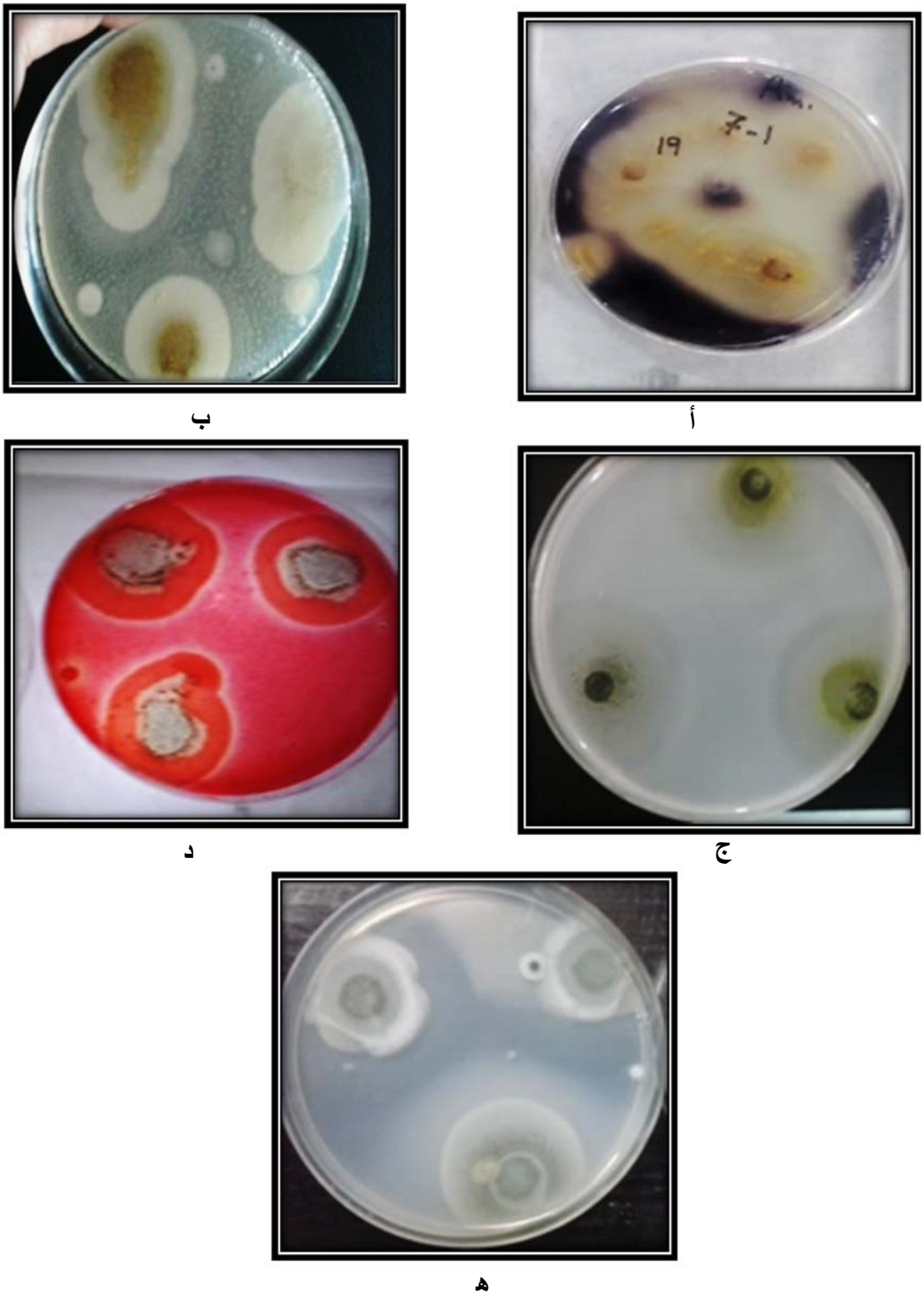


د



هـ

شكل رقم(2): الفعالية الانزيمية الخارج خلوية للفطريات المستنبتة المعزولة من أوراق نبات الآس على الوسط الصلب
د- انزيم السليوليز
هـ- انزيم البروتيز



أ- صورة (1): الفعالية الانزيمية الخارج خلوية للفطريات المستنبتة المعزولة من أوراق نبات الآس على الوسط الصلب أ-انزيم الاميليز، ب- انزيم اللاييبز، جـ انزيم البكتينيز، د- انزيم السليوليز هـ انزيم البروتيز.

Endophytic Fungi of Myrtle (*Myrtus communis)* and their Extracellular Enzyme Activity

Batool Z. Ali
Huda M. Kadhoam
Dpet. of Biology/ College of Education for Pure Science (Ibn Al-Haitham)/ University of Baghdad.

Receivd in:15/September/2014, Accepted in :24/November/2014

Abstract

The study was aimed to isolate and identify endophytic fungi from myrtle (*Mrtus communis)* leaves and study their extracellular enzymes activity. Results revealed isolation of 99 species or ioslated of endophytic fungi obtained from 500 leaves fragment, which represented colonization frequency (CF) of 20.4%. Those fungi were related to 23 species or isolates, Aspergilli were dominated over all species (11 species) with CF 14%. Moreover *A. niger* and *A. flavus* showed the higtest CF values over all. Other isolated fungi were related to the genera: *Penicillium* spp., *Cladosporium* sp., *Cunninghamella* sp., *Derchslera* sp., *Alternaria* sp. *Paecilomyces* sp. and sterile fungi (mycelia sterilia). Extracelluar enzymes activity showed varation in type and activity of secreting these enzymes in solid media. The percentage of 91.3% of these fungi were able to secrete anylase, while 69.5% produced lipase and 86.9% produced pectinase, as well as 82.6%, 73.9% and 13% were able to secrete cellulase, protease and laccase respectively. Some isolated showed a high affinity to secret some of tested enzymes which give indication of the possibility of using these enzymes in many applications after isolation and characterization .

Key words: Endophytic fungi, Enzyme activity, myrtle.