Muthanna journal of Agriculture Science
VOL.(7), NO.(1), 2019
Print ISSN: 2226-4086, Online ISSN: 2572-5149, Received Date :7/12/2017 , Accepted Date :11/2/2018
DOI:10.18081/MJAS/2019-7/71-82

The effect of Bioagent fungus Trichoderma harzianum on growth, sporulation and pathogenicity of Fusarium oxysporum f.sp lycopersic

[1]Ahmed A. Alnuaimy, [2]Jawad K. Aljanabi, and [1] Mustafa A. manshod
[1]College of Agriculture, Al-Muthanna, [2] College of Science, University of Babylon

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effect of Trichoderma harzianum on sporulation, viability and pathogenicity of Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici (FOL). The results indicated that five isolates were identified as FOL (FOL1, FOL2, FOL3, FOL4 and FOL5), these isolates were varied in their pathogenicity, colonies color and growth averages in PDA. The exudates of FOL isolates (FOL2, FOL3 and FOl4) induced yellow to brown spots on tomato leaves after 7 days of inoculation. These symptoms didn't appear on leaves had combined treatment (FOL +T. harzianum). The results revealed that T harzianum exudates was completely inhibited the germination of macroconidia for all FOL isolates, while their germination without combination with bioagent were 78, 70, 66, 55 and 53% in FOL1, FOL4, FOL2, FOL5 and FOL3 respectively. The germination ability of microconidia produced from FOL isolates (FOL1, FOL2, FOL3, FOL4 and FOL5) treated with T. harzianum exudates were sharply reduced to 16, 8, 8, 2 and 11% compared with percentage germination of microconidia that grown alone 77, 83, 71, 92 and 85% respectively.The production of macroconidia by all FOL isolates were entirely inhibited by T. harzianum exudates compared with that in isolates grown without bioagent, since the sporulation increased to 28 $x10^4$ and 48 x 10^4 in FOL3 and FOL4 respectively and to 8 $x10^4$, 12 $x10^4$ and 16 $x10^4$ in FOL1, FOL2 and FOL5 respectively. Microconidia proceeded differently, as there production reduced to about 50% by the addition of bioagent to pathogenic fungal isolates (FOL). The sporulation of microconidia reached to 6 $x10^4$ and 13 $x10^4$ in FOL4 and FOL5 respectively compared with untreated one 36x104 and 24 x 104 respectively. Then to 12x104, 8 x104 and 8 x104 in FOL1, FOL2 and FOL3 respectively compared with that in untreated isolates (28x104, 24 x104 and 28 x104) respectively. The present study concluded that culture filtrates of T. harzianum has severely effect on growth and sporulation of F. oxysporum f. sp. lycopersici

Keyword's: Trichoderma harzianum ،Fusarium oxysporum f.sp lycopersici

تأثير عامل المقاومة Trichoderma harzianum في ونمو وتجرثم أمراضية عزلات الفطر Fusarium oxysporum f.sp lycopersici

احمد اياد النعيمي1 وجواد كاظم الجنابي2 مصطفى عبد منشود1
كلية الزراعة/جامعة المثنى1 كلية العلوم/جامعة بابل 2

المستخلص :
نفذت التجربة في مختبر كلية الزراعة / جامعة المثنى للعام 2015 لدراسة تأثير الفطر*Trichoderma harzianum* على تجرثم وحيوية وامراضية الفطر الممرض *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). اظهرت النتائج وجود خمس عزلات للفطر FOL (FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5) اختلفت فيما بينها بلون مستعمراتها وفي معدلات نموها وفي امراضيتها. وسببت رواشح عزلات الفطر الممرض (FOL4, FOL3, FOL2) تركيز25% بقعا صفراء الى بنية على اوراق الطماطة بعد 7 ايام من تلقيحا بالفطر الممرض، في حين لم تظهر هذه الأعراض عند اضافة راشح فطر التضاد *T. harzianum* مع لقاح عزلات الفطر الممرض. اوضحت النتائج ان الفطر *T. harzianum* قد ثبط بالكامل انبات الأبواغ الكبيرة لعزلات الفطر FOL في حين كانت نسبة الانبات في المعاملات (بدون مضاد حيوي) FOL4 وFOL1 وFOL2 وFOL5 وFOL3 هي78 و70 و66 و55% و53 على التوالي. أما بالنسبة للأبواغ الصغيرة للعزلات (FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5) فقد انخفضت فيها نسبة الانبات بوجود المضاد الحيوي الى 16 و8 و8 و2 و11% على التوالي مقارنة بمعاملات السيطرة (نمو ابواغ الفطر بدون مضاد حيوي) التي وصلت فيها نسبة الانبات الى 77 و83 و71 و92 و85% على التوالي.ان إنتاج الأبواغ الكبيرة لعزلات الفطر FOL قد ثبط تماما بوجود عامل المقاومة الحيوية ، أما عند نمو عزلات الفطرFOl لوحدها فقد وصل التجرثم الى ذروته في العزلتين FOL3 وFOL4 (48×10^4 و28×10^4) على التوالي، تلتها باقي العزلات (FOL1 وFOL2 وFOL5) التي كانت فيها اعداد الأبواغ الكبيرة (8×10^4 و12×10^4 و16×10^4) على التوالي. في حين انخفضت اعداد الأبواغ الصغيرة الى النصف تقريبا مقارنة مع معاملة السيطرة ، حيث بلغت في المعاملين T×FOL4 وT×FOL5 (16×10^4 و13×10^4) على التوالي مقارنة بنظيراتها بمعاملة السيطرة (36×10^4 و24×10^4) ، تلتها المعاملات T×FOL1 وT×FOL2 وT×FOL3 (12×10^4 و8×10^4 و8×10^4) على التوالي مقارنة بمعاملات المقارنة للعزلات المناظرة (28×10^4 و24×10^4 و28×10^4) على التوالي. نستنتج من الدراسة الحالية ان الراشح الأيضى لفطر التضاد *T.* harzianum له تأثير تثبيطي كبير على حيوية الأبواغ وتجرثم الفطر الممرض *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

المقدمة

شخص الجنس *Fusarium* لأول مرة من قبل العالم Link عام 1809 اذ يعد أحد اهم الاجناس الفطرية المهمة صحياً واقتصاديا حيث يضم العديد من الانواع الممرضة للإنسان والحيوان والنبات ، ولبعض انواعه القدرة على انتاج العديد من السموم الفطرية مثل Zearalenone وMoniliformin وFusaproliferrrin (Logrieco *et al.*,1998).

يتواجد فطر *Fusarium* مترمماً في التربة او في البقايا النباتية او متطفلاً داخل الانسجة النباتية (Summerell *et al.*, 2010). اذ تشكل العديد من انواع جنس *Fusarium* مسببات لمختلف الامراض النباتية في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية والمناطق الدافئة والمعتدلة (Leslie & Summerell 2006). يعتقد الباحثين أن الفطر *F.oxysporum f.sp lycopersici* Synder and hand (Sace) من المسببات المرضية المؤثرة اقتصادياً ضمن انواع هذا الجنس كمرض موت البادرات Seeding damping-off disease ومرض الذبول الفيوزارمي والتي يتعرض لها محصول الطماطة في معظم مناطق زراعته مسبباً هلاك هذا المحصول في الحقول والبيوت المحمية خاصة في المناطق الدافئة من العالم (Rai *et al.*,2011 ; Borrero *et al.*, 2004) اذ يعد عامل محدد لإنتاج محصول الطماطة خاصة على الاصناف الحساسة (Mandal *et al.*, 2009).

على الرغم من توفر اصناف مقاومة لهذا الممرض لكن هذه المقاومة قد تفشل عند ظهور سلالات جديدة من الممرض (Larkin & Fravel, 1998) ومن طرق مكافحة المسبب هي استخدام المقاومة الحيوية ضد الممرض (Monte, 2001) كأستعمال الفطريات والبكتريا للسيطرة على الامراض التي يسببها انواع الفطر *Fusarium* على مختلف انواع المحاصيل Bacon (*et al.*,2001)، بما في ذلك السلالات غير الممرضة من الفطر *Fusarium* فقد استعمل الفطر *Trichoderma* spp. الذي يضم انواعاً تعيش مترممة في التربة وغير ممرضة للنبات او تعايشية معه (Harman *et al.*, 2004)في المقاومة البايلوجية ضد سلالات الفطريات *Fusarium* و*Pythium* و*Rhizoctonia* منها النوع *T. harzianum* الذي يتميز بسهولة عزله وسرعة تكاثره وعدم احتياجه الى متطلبات غذائية خاصة وتأثيره الايجابي في كبح نمو الكثير من المسببات المرضية للنبات وبأليات مختلفة (Kuguk وKivang، 2002)، ومن هذه الاليات هي المنافسة على الغذاء والتضاد الحياتي وافراز العديد من الانزيمات المحللة لجدران خلايا العائل الممرض وتحفيز مقاومة العائل النباتي ضد المسبب المرضي. لكن الدراسات التي تتناول التأثير المباشر للفطر *T.harzianum* على الوحدات التكاثرية للفطر FOL مازالت محدودة. لذلك هدف البحث الى تقييم التأثير التثبيطي لفطر *T.harzianum* على نمو وتجرثم الفطر *F.o.f.* sp. *lycopersici* تحت الظروف المختبرية.

المواد وطرق العمل

زراعة شتلات الطماطة

نقعت البذور بالماء المعقم لمدة يومين ثم نقلت الى صندوق بلاستيكي حاوي على البيتموس والرمل المعقم بنسبة (1:1)، وبعد ريه جيداً تم تغطيته بغطاء بلاستيكي شفاف يحتوي على فتحه من الاعلى، ترك الصندوق بدرجة حرارة الغرفة وبعد ظهور البادرات رفع الغطاء ووضع الصندوق في غرفة النمو على درجة حرارة 30 م ولحين وبعد ظهور الورقة الحقيقية الثانية (شهر واحد) . نقلت النباتات الى أصص بلاستيكية قطرها 12 سم وبعمق 15 سم تحتوي ايضاً على خليط من الرمل والبيتموس بنسبة (1:1) معقمة بجهاز الموصدة وبواقع نبات واحد لكل أصيص ثم نقلت الظلة الخشبية.

جمع العينات وعزل الفطر الممرض

جمعت عينات من نباتات الطماطة من المزارع القريبة من ناحية المجد ومنطقة الصياغ والتي ظهرت عليها اعراض الاصابة بمرض الذبول الوعائي، غسلت جيداً بماء الحنفية. اخذت قطع صغيرة (0.5) سم من منطقة التاج والجذور وعقمت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز 3% لمدة 2 دقيقة. غسلت الاجزاء النباتية بالماء المقطر ثلاث مرات، نشفت من الماء بواسطة ورق الترشيح. بعدها زرعت العينات في اطباق بتري (9) سم يحتوي على الوسط الغذائي المعقم (PDA) بواقع خمسة قطع من الاجزاء النباتية للطبق الواحد ، حضنت الاطباق في درجة حرارة 25±2 م° لمدة 3 ايام، بعد ظهور المستعمرات أجريت عملية عزل لمستعمراتها على اطباق تحتوي على وسط أكار البطاطا والدكستروز (PDA) للحصول على مستعمرات نقية لتلك العزلات.

مصدر عزلات الفطر *Trichoderma harzianum*

تم الحصول على العزلة الفطرية *T. harzianum* من مختبر الفطريات المتقدم في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل.

الخصائص التشخيصية المظهرية والمجهرية لعزلات الفطر FOL

لدراسة الخصائص المظهرية والمجهرية لعزلات الفطر *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* اعتمدت طريقة (Summerell *et al.*, 2003). نميت عزلات الفطرFOL كلاً على حدة على الوسط الغذائي PDA المضاف اليه المضاد الحيوي وذلك بنقل قرص من حافة مزرعة فطرية حديثة (1) سم لكل من عزلات الفطر FOLالى منتصف اطباق البتري. حضنت الاطباق على درجة حرارة 25±2 °م لمدة خمسة ايام بعدها فحصت التغايرات المظهرية على المزارع الفطرية خاصة لون المزرعة وحوافها وتطور الصبغة، سجلت الخصائص المجهرية باستعمال المجهر الضوئي وبقوى تكبير مختلفة خاصة وجود الابواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة والابواغ الحرشفية والحامل الكونيدي والفايلايد ، كما سجل الاختلاف في نمو العزلات الفطرية الخمس بعد 2و 4 و6 يوم وتم ايقاف القراءات حال اكتمال النمو في الطبق لاحد العزلات حيث قدر معدل نمو العزلات وذلك بأخذ قطرين متعامدين يمران بنقطة من ظهر المستعمرة الفطرية ، اذ سجلت خمس عزلات متباينة للفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) واعطيت الرموز الاتية (FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5).

ولغرض حفظ عزلات الفطر FOL وفطر المكافحة الاحيائي *T. harzianum* تم صب 20 مل من الوسط PDA المعقم في أنابيب اختبار حجم 50مل ، ثم تركت الأنابيب مائلة حتى تصلب الوسط الغذائي ثم لقحت كل منها بقرص قطره 0.5 سم أخذت من حافة مستعمرات عزلات الفطر FOL النامية على الوسط الغذائي PDA بعمر 4 أيام بينما لقحت انابيب أخرى بالفطر *T. harzianum* النامي على الوسط PDA وبعمر ثلاثة أيام بنفس الطريقة ، حضنت الأنابيب بدرجة 25±2 م لمدة 4 أيام بعدها حفظت في الثلاجة بدرجة 4 م لحين الاستعمال.

امراضية عزلات الفطر FOL في نسبة انبات بذور الطماطة

لفحص القابلية المرضية لعزلات الفطر FOL اعتمدت طريق (Carling *et al.*, 1987) إذ تم زرع بذور الطماطة صنف Marira المعقمة سطحياً بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 3% لمدة 2 دقيقة ثم غسلت جيداً بالماء المقطر المعقم ووضعت في أطباق بتري قطر 9 سم حاوية على الوسط الغذائي المعقم PDA بمعدل (10 بذرة/طبق) وبشكل دائري بعد يومين من تلقيح مركز الطبق بقرص قطره (1) سم مأخوذ من حافة مستعمرات حديثة للعزلات (FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5) النامية على الوسط PDA وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة مع الأخذ بنظر الاعتبار إجراء معاملة مقارنة بزراعة بذور الطماطة على الوسط الغذائي بالطريقة نفسها وبدون معاملة بالفطر الممرض. تم حساب نسبة إنبات بذور الطماطة بعد مرور 6 أيام من الحضن بدرجة حرارة 25±2 م.

تأثير رواشح عزلات الفطر FOL على اوراق نبات الطماطة

حضرت دوارق حجم 100مل تحتوي كل منها على 50 مل من الوسط الغذائي المعقم P.D.B لقح كل منها بثلاثة أقراص قطر (0.5) سم ولكل من العزلات FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5 فضلاً عن الفطر*T. harzianum* النامية على الوسط P.D.A بعمر5 أيام كلا" على انفراد كذلك لقحت دوارق اخرى بالفطر الممرض FOL وفطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* كلاً عل حدة وبنفس الطريقة السابقة ثم اغلقت الدوارق بأحكام ولفت بالشريط اللاصق منعا" للتلوث، حضنت الدوارق تحت درجة حرارة 25±2 م° لمدة 18 يوم أخذين بالحسبان رج الدوارق من يوم واخر، وبعد انتهاء فترة التحضين تم ترشيح مزارع الفطريات بواسطة فلتر Millipore (0.22)موضوع في قمع بخنر. حضرت مجموعة من الاوراق الحقيقية الثانية من نبات الطماطة بعمر شهر واحد قطعت من منطقة اتصال العنق بالساق وغسلت جيدا بالماء الجاري للتخلص من الاتربة العالقة بها ثم غسلت بالماء المقطر ولف عنق كل وريقة بالقطن الطبي الذي رطب بالماء المقطر المعقم ووضعت في اطباق بتري قطر 9 سم نظيفة ومعقمة ، ثم وضع في منتصف كل وريقة 0.25 مل من رواشح فطر FOL وللعزلات الخمس تركيز 50% فضلاً عن رواشح التداخل مع فطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* بنفس التركيز مع ترك ثلاث اطباق

للمقارنة حيث اضيف الى الاوراق الماء المعقم فقط وكلاً على حدة وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25±2 ولمدة 8 ايام.

الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد عزلات الفطر FOL

نفذت تجربة مختبرية لتقدير الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد العزلات الخمس لفطر الفيوزاريم (FOL1 وFOL2وFOL3 وFOL4 وFOL5) بأعتماد طريقة الزرع المزدوج (Ligocka *et al.*, 2002) حضر الوسط الغذائيPDA المعقم وصب في أطباق بتري ، لقح مركز النصف الأول من الطبق بقرص قطره 0.5 سم من الفطر *T. harzianum* النامي على الوسط PDA وبعمر ثلاثة أيام أما مركز النصف الآخر من الطبق فقد لقح بقرص مماثل من عزلات الفطر FOL النامية على الوسط PDA وبعمر أربعة أيام كل على حدة وأجريت معاملة مقارنة وذلك بتلقيح مركز أحد نصفي الطبق بالفطر الممرض وبواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة، حضنت الأطباق على درجة حرارة 25±2 م ولمدة اربع أيام ، بعدها قدرت درجة التضاد حسب مقياس (Bell *et al.*, 1982) والمكون من خمس درجات .

1- الفطر المضاد يغطي الطبق بكامله.
2- الفطر المضاد يغطي 4/3 مساحة الطبق.
3- الفطر المضاد والفطر الممرض كل منهما يغطي نصف مساحة الطبق.
4- الفطر الممرض يغطي 4/3 مساحة الطبق.
5- الفطر الممرض يغطي الطبق بكامله.

تأثير الراشح الايضي للفطر *T. harzianum* في نمو وتجرثم عزلات الفطر FOL على :

حيوية الكونيدات الكبيرة والصغيرة لعزلات الفطر FOL

حضر الراشح الايضي للفطر *T. harzianum* بنفس طريقة تحضير رواشح عزلات الفطر FOL ، أذ اعتمدت تقنية الوسط السام poisoned technique (Culture Medium) وذلك بصب الاكار المائي (W.A) حسب طريقة (Daniel *et al.*,2014) تركيز 2% الذي اضيف اليه تركيز 25% من المستخلص الايضي للفطر *T. harzianum* ، ترك لمدة 24 ساعة لغرض تمازج المستخلص مع الوسط الغذائي ، ثم اضيف الى الاطباق معلق عزلات الفطر FOL تركيز 1×10^6 بوغ كونيدي بواقع واحد مل ولكل من العزلات الخمس كلاً على انفراد. تم توزيع العالق بعناية بواسطة Glass rod، حفظت الاطباق على درجة حرارة 28±2م في الظلام وpH الوسط 7 قيست نسبة الانبات مباشرة تحت المجهر بعد 24 ساعة من الحضن باستخدام المجهر المركب ، اذ تم عد عشر أبواغ كونيدية بصوره عشوائية لكل حقل ميكروسكوبي ولكلا الأبواغ الكبيرة والصغيرة وبواقع خمس حقول لكل مكرر. عدت الأبواغ نابتة اذا ظهر طول انبوب الانبات مساوي او اكبر من طول الكونيديا ولكلاً من الأبواغ الصغيرة والكبيرة.

انتاج الكونيدات الكبيرة والصغيرة لعزلات الفطر FOL

لدراسة تأثير الراشح الايضي لفطر *T. harzianum* على قدرة عزلات الفطر FOL على انتاج الكونيديا الكبيرة والصغيرة . صب الوسط الغذائي PDA المعقم الراشح الايضي للفطر *T. harzianum* تركيز 25% في اطباق بتري 9 سم حركت الاطباق بهدوء لغرض التمازج وبثلاث مكررات مع ترك ثلاث اطباق بدون معاملة بالراشح الايضي وكما في المعامله 9-أ . تم تنمية عزلات الفطر FOL بنفس الخطوات السابقة وحضنت الاطباق على درجة حرارة 28±2م ولمدة سبعة ايام بعدها أضيف 10 مل من الماء المقطر المعقم لكل طبق لغرض جمع أبواغ العزلات الفطرية بأستخدام Glass rod وتم نقل العالق الفطري الي انابيب ، ثم رج العالق بعناية لضمان انتشاره. نقلت قطرة من العالق شريحة العد Haemocytometer وعدت الأبواغ الكبيرة والصغيرة (Daniel *et al.*,2014).

التحليل الاحصائي

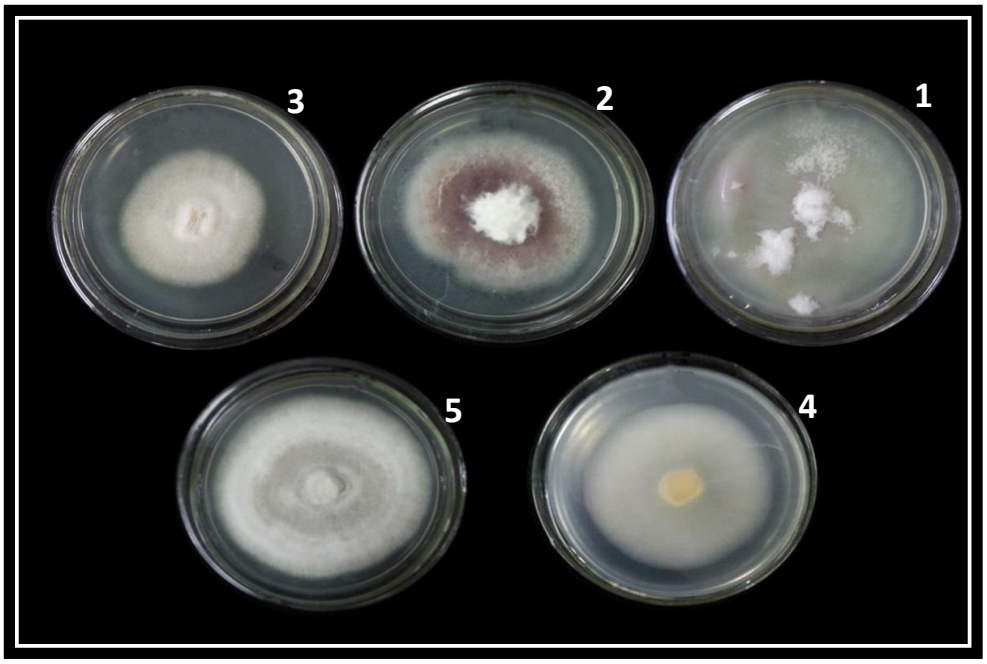
نفذت جميع المعاملات باستخدام التصميم التام التعشية CRD وبثلاث مكررات لكل معاملة وحللت حسب جدول تحليل التباين وتحت مستوى احتمال 0.05 (الراوي وخلف الله ، 2000).

النتائج والمناقشة

الخصائص المظهرية والمجهرية لعزلات الفطر FOL

اظهرت النتائج وجود خمس عزلات للفطر FOL أعتماداً على خصائصها المظهرية والمجهرية هي (FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5) أذ تباينت هذه العزلات في كثافة

الغزل الفطري وفي الوان المستعمرات التي تراوحت من الابيض الى الوردي والبنفسجي ، كذلك لون المستعمرات من الجهة الخلفية للمستعمرات التي تراوحت من الوردي او البنفسجي الى البني (صورة1)، أما الصفات المجهرية للعزلات الفطرية فقد تمثلت بأنتاج الكونيديا الكبيرة Macro conidia الهلالية الشكل والكونيديا الصغيرة Micro conidia ذات الشكل البيضوي الى الكروي وانتاج الكونيديا الحرشفية التي تنتج بشكل مفرد أو تجمعات او سلاسل صغيرة، ومن الملاحظ أن انتاج الكونيديا الصغيرة كان مميزاً في جميع العزلات ، وجميعها لها القدرة على انتاج كونيديا صغيرة لكن انتاجها للكونيديا الكبيرة وكذلك الوسائد sporodochium كان متبايناً، كما بينت نتائج (جدول1) اختلاف عزلات الفطر FOL في معدلات النمو أذ تفوقت العزلة FOL1 معنوياً طيلة مدة التجربة مقارنة بنمو العزلات الاربع الاخرى أذ وصل نمو هذه العزلة الى 3.1 سم بعد 2 يوم من التلقيح ، 5.4 سم بعد اربع ايام وصل النمو الى 100% من مساحة الطبق بعد 6 ايام من التلقيح تلتها العزلة FOL5 (2.7 و5 و8.3سم) بعد (2 و4 و6 يوم) على التوالي في حين كانت معدلات النمو للعزلة FOL3 هي الاقل معنوياً بعد اليوم الثاني 1.6 سم واليوم السادس 5.7 سم من التجربة. أما العزلتين (FOL4 وFOL2) فلم تختلفا معنوياً بعد اليوم الثاني من التجربة 2.2 و2.3 سم) على التوالي كذلك بعد اليوم السادس (7.1 و7 سم) على التوالي.



صورة (1). مستعمرات عزلات الفطر *F*. oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5) النامية على الوسط الغذائي PDA بدرجة حرارة 25 ±2 ولمدة 6 ايام

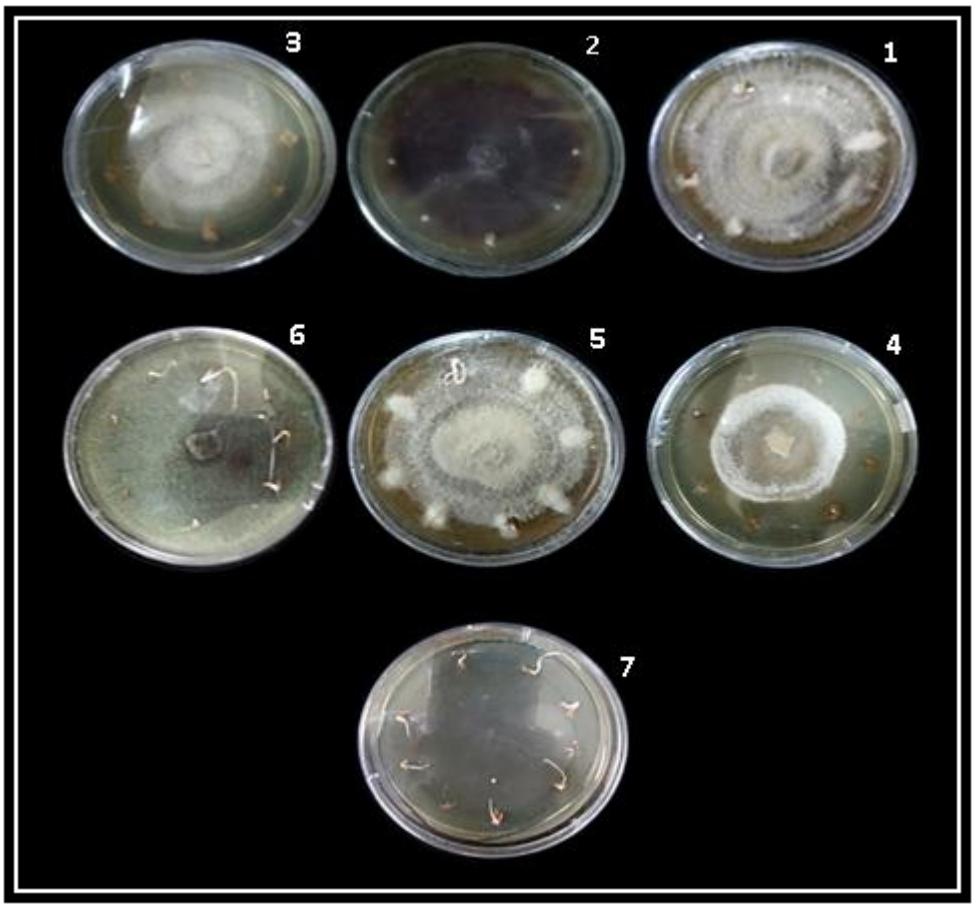
جدول (1). النمو القطري لعزلات الفطر *F*. oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5) النامية على الوسط الغذائي PDA بدرجة حرارة 25 ±2 ولمدة 6 ايام

رمز العزلات الفطرية	النمو القطري (سم)		
	اليوم الثاني	اليوم الرابع	اليوم السادس
FOL1	3.1	5.4	9.0
FOL2	2.2	3.0	7.2
FOL3	1.6	3.8	5.7
FOL4	2.3	4.3	7.0
FOL5	2.7	5.0	8.3

L.S.D $_{0.05}$	0.7

القابلية المرضية لعزلات الفطر FOL

اظهـرت النتـائج (الصـورة 2) ان العـزلات الـثلاث (FOL2 وFOL3 وFOL4) اعطـت نسـبة تعفـن للبـذور 100% لبـذور الطماطة مقارنة مع العزلتين FOL1 وFOL5 اللتان كانت فيهما نسبة التعفن 80% على الرغم من ان هاتين العزلتين كانتا هما الاعلى في معدل النمو وفي كثافة الغزل الفطري المنتج مقارنة بباقي العزلات رغم ان جميع العزلات المستخدمة من الفطر الممرض FOL قد خفضت من انبات بذور الطماطة بنسب تتراوح من 80-100 % (الجدول 2) وهذا دليل على امراضيتها العالية نتيجة لإنتاجها العديد من المواد الايضية والسموم الفطرية التي قد يعود اليها سبب تثبيط انبات بذور الطماطة ، أذ ان الفطر الممرض قد يفرز مركب أو أكثر من مركبات كاربوهيدراتية وأنزيمات البيروكسيديز والأحماض الدهنية والأمينية او المواد السامة التي تؤدي إلى تعفن البذور (El-Zawahry, 2000). في حين كانت نسبة الانبات لبذور الطماطة في كل من معاملة المقارنة ومعاملة الفطر *T. harzianum* هي 90% مما يدل على عدم وجود تأثير ممرض لفطر المقاومة الاحيائية أذ يمتلك هذا الفطر قدرة تطفلية وقابلية على افراز رواشح كيمائية لها تأثير تثبيطي على مسببات الامراض النباتية وفي النسبة المئوية للانبات وقد يتغلغل الى داخل البذور مؤدياً الى أستحثاث المقاومة الجهازية (Howell ,2002) حيث ان فطر *T. harzianum* كان محفز للانبات وهذا يتفق مع (Chinnasamy,2006).



صورة (2). تأثير عزلات الفطر FOL على نسبة انبات بذور الطماطة. 1: العزلة FOL1 ، 2: العزلة FOL2، 3: العزلة FOL3 ، 4: العزلة FOL4 ، 5: العزلة ، FOL5 ، 6: عزلة الفطر *T. harzianum*، 7: معاملة المقارنة (بدون معاملة). النامية على الوسط الغذائي PDA على بدرجة حرارة 25 ±2 ولمدة 6 ايام

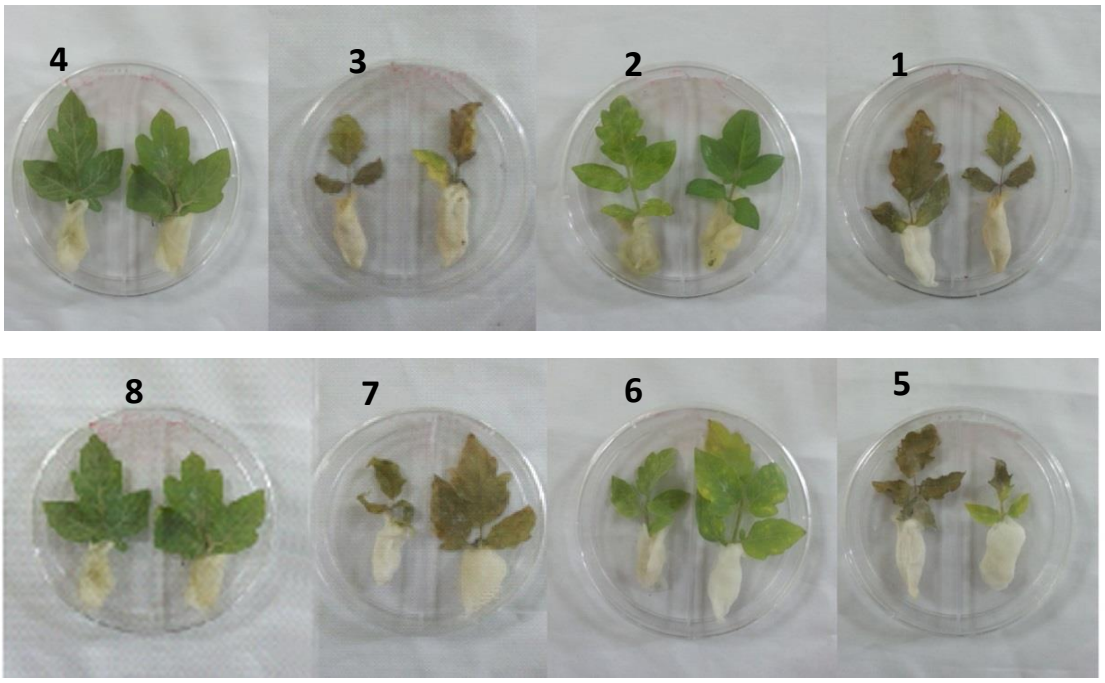
جدول (2). تأثير عزلات الفطر *F*. oxysporum f. sp. *Lycopersici* على النسبة المئوية لإنبات بذور الطماطة

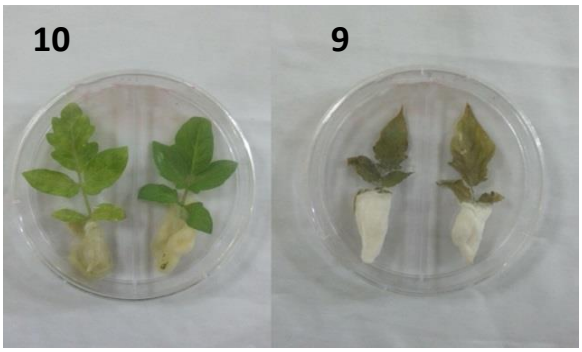
الفطر	نسبة الانبات
FOL1	20%
FOL2	0%
FOL3	0%
FOL4	0%
FOL5	20%
T.h	90%
Control	90%
LSD .05	13.45

تأثير رواشح عزلات الفطر الممرض FOL على اوراق نبات الطماطة

ظهر على اوراق نبات الطماطة حيث ظهرت عليها اعراض الاصفرار بعد 7 ايام من التلقيح ثم اخذت بالتيبس والانكماش لكل من العزلات (FOL4, FOL3, FOL2) (صورة 3)، اما بالنسبة للعزلتين (FOL1 وFOL5) فكان تأثيرهما قليل مقارنة بباقي العزلات. ان اصفرار الأوراق وتيبسها ربما ناتج عن افراز عزلات الفطر للعديد من السموم ومنها Lycomarasmin التي تعمل على تحطيم نفاذية الغشاء الخلوي مما يؤدي الى ازدياد فقد بخار الماء بسهولة اكثر، كما تنتج بعض سلالات الفطر انزيم Tomatinase الذي له دور في تحطيم مركب Tomatina المسؤول عن مقاومة بعض أصناف الطماطة للفطر الممرض (Perveen & Bokhari, 2012).

وفي المقابل فأن رواشح التداخل ما بين الفطر الممرض وفطر *T. harzianum* فأنها لم تظهر اي اعراض مرضية على اوراق نبات الطماطة مما يدل على ان فطر المقاومة الاحيائية قد يفرز انزيمات محللة مثل Chitinase وβ-1-3-glucanase وProteases ، Cellulase ، Xylanase وان هذه الإنزيمات تحلل الكايتين والكلوكان والبروتينات المكون لجدار الخارجي للخيوط الفطرية في بيئة المسبب المرضي (Chełkowski *et al*., 2012; Champeil *et al*., 2004). كذلك إفرازه العديد من المضادات مثل Trichodermol وTrichodermin وGliotoxine وPachybasi وEmodin Chrysophancol التي تعمل على تحليل الخيط الفطري للفطر الممرض (Kuguk & Kivang, 2002) .

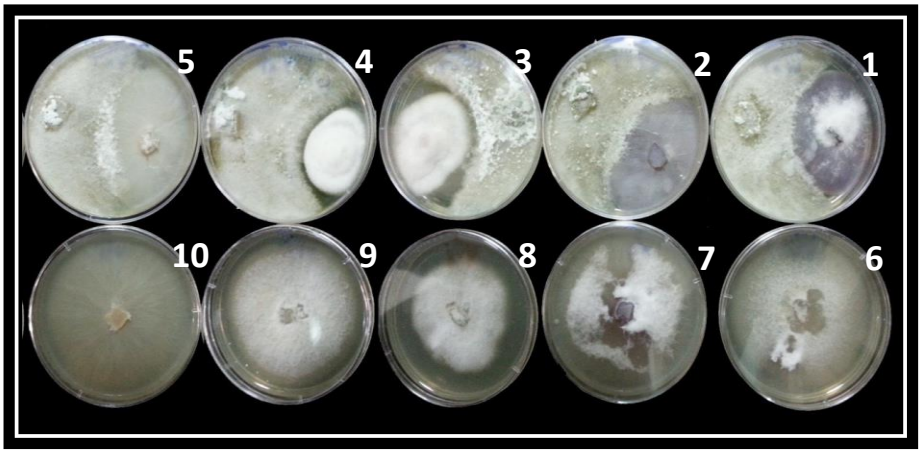




صورة(3). التأثير التثبيطي لرواشح عزلات الفطر F. oxysporum f. sp. lycopersici على اوراق نبات الطماطة. 1: العزلة FOL1 ، 2: FOL1 + فطر التضاد ، 3: العزلة FOL2 ، 4: العزلة FOL2 + فطر التضاد ، 5: ، العزلة FOL3، 6: FOL3 + فطر التضاد، 7: العزلة FOL4 ، 8: العزلة FOL4 + فطر التضاد، 9: العزلة FOL5، 10:FOL5 + فطر التضاد 11: معاملة السيطرة

الكفاءة التضادية للفطر *T. harzianum* ضد عزلات الفطر FOL

برهنت النتائج ان الفطر *T. harzianum* يمتلك قدرة تثبيطية عالية ضد عزلات الفطر FOL فقد خفض من سرعة نمو عزلات الفطر الممرض الى اقل من 40 % مقارنة بمعاملة السيطرة اذ بلغ النمو القطري للعزلتين FOL1 وFOL5 (3.3 و3 سم) على التوالي مقارنة بما يمثلان في معاملة السيطرة (8.5 و8 سم) على التوالي عند اليوم الخامس حيث كانت هاتين العزلتين هما الاسرع نمواً وكثافة بالنسبة للغزل الفطري، تلاها معاملات التداخل للعزلات (FOL2 وFOL3 وFOL4) والتي كان معدل نمو اقطارها (2.6 , 2.4 , 2.3) سم على التوالي مقارنة بمعاملات السيطرة لنفس العزلات التي بلغ فيها معدل نمو الاقطار للعزلات الثلاث (5.3 , 6.8 , 7.2سم) على التوالي ويرجع ذلك الى ان الفطر *T. harzianum* تميز بسرعة النمو وقدرته على منافسة الفطر FOL على الغذاء وكذلك احاطة الفطر الممرض ومنعه من النمو والتطور(الخفاف، 2006)، حيث بلغت نسبة التثبيط في جميع المعاملات حوالي 75% لان نسبة التضاد كانت من الدرجة الثانية (فطر التضاد يغطي 4/3 من مساحة الطبق) حسب مقياس (Bell *et al.*, 1982)، أذ ان فطر المقاومة الأحيائية *T. harzianum* يمتلك خصوصية تطفلية وافراز رواشح كيمائية لها تأثير في السيطرة على حيوية مسببات الامراض، ان الآلية التي يسلكها فطر المقاومة الحيوية تتضمن التفاف غزل الفطر بشكل حلزوني حول غزل الفطر الممرض. ثم يقوم بافراز المضادات الحياتية وبعض الأنزيمات المحللة لجدران خلايا الفطر الممرض مثل Protease وβ-1-3-glucanase وChitinase حيث تساعدالانزيمات في تحليل خلايا العائل وموته والتغذي عليه(حسان ، 2005 والعيساوي ، 2006).



صورة (4). التضاد بين الفطر *T. harzianum* وعزلات الفطر *F.* oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL1 وFOL2 وFOL3 وFOL4 وFOL5) النامية على الوسط الغذائي PDA على بدرجة حرارة 25 ±2 ولمدة 6 ايام.

جدول (3). مستوى التضاد بين الفطر *T. harzianum* وعزلات الفطر *F.* oxysporum f. sp. *lycopersici* بعد خمسة أيام من النمو على الوسط الغذائي PDA

المعاملة	معدل نمو عزلات الفطر FOL (س)	المعاملة	معدل نمو عزلات الفطر FOL (س)
T×FOL1	3.3*	FOL1	8.5
T×FOL2	2.6*	FOL2	7.2
T×FOL3	2.4*	FOL3	6.8
T×FOL4	2.3*	FOL4	5.3
T×FOL5	3*	FOL5	8

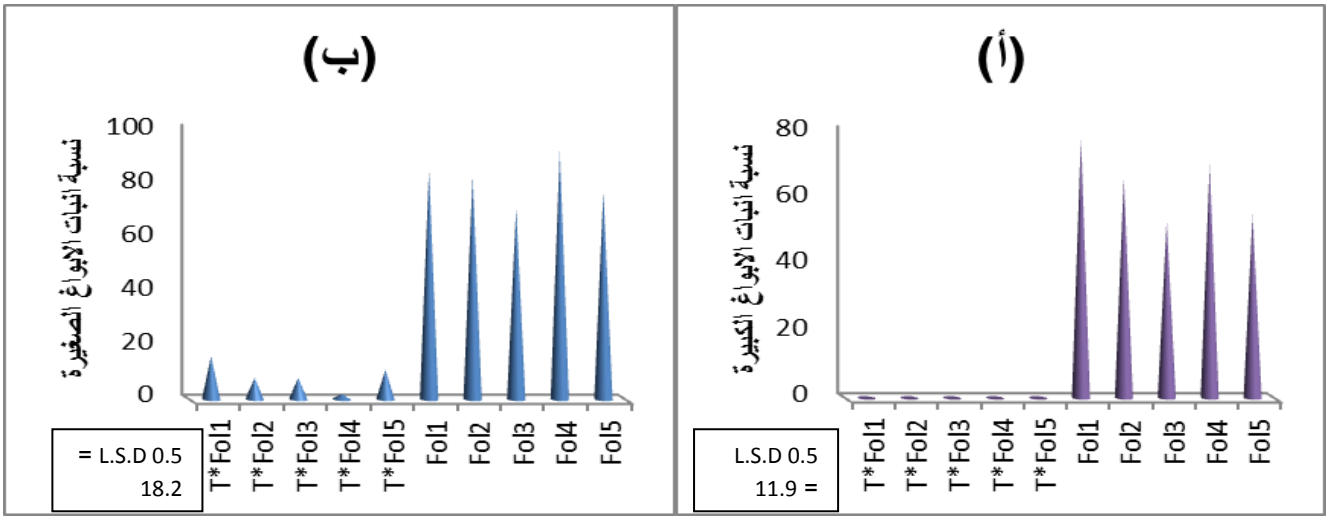
(*) تشير هذه العلامة الى ان درجة التضاد من الدرجة الثانية اي ان فطر المقاومة يشغل 4/3 الطبق، اما الارقام التي لا تحمل هذه العلامة فهي معاملات المقارنة

تأثير الراشح الايضي للفطر *T. harzianum* على نمو وتجرثم عزلات الفطر FOL

تـأثير الراشـح الايضـي للفطـر *T. harzianum* علـى حيويـة الكونيدات الكبيرة والصغيرة لعزلات الفطر FOL

أظهرت النتائج (شكل 1) وجود قدرة تثبيطية عالية للفطر *T. harzianum* على حيوية الأبواغ الكبيرة لعزلات الفطر FOL ، اذ ظهر تثبيط تام لإنباتها في كافة المعاملات مقارنة مع معاملات السيطرة حيث بلغت اعلى نسبة انبات في المعاملتين FOL4,FOL1 (78 و70%) على التوالي، تلا ذلك المعاملات FOL2وFOL3 و FOL5 (66 و53 و55%)على التوالي. أما بالنسبة للابواغ الصغيرة فقد انخفضت فيها نسبة الانبات نتيجة التأثير التثبيطي للفطر *T. harzianum* للمعاملتين T×FOL1و T×FOL5 الى 11.16% على التوالي مقارنة مع مثيلاتها في معاملات السيطرة والتي كانت نسبة الانبات 77 و85% ، ثم في المعاملات T×FOL2 وT×FOL3 وT×FOL4 (8 و8 و2%) على التوالي مقارنة بمعاملات المقارنة (83 و71و92%) على التوالي.

أن الانخفاض الكبير لنسبة الانبات ربما يرجع الى القدرة العالية لفطر المقاومة الاحيائية على انتاج مواد ايضية مثبطة للإنزيمات الخاصة بامراضية المسبب كما في إنزيم Srineprotase الذي له أثرٌ كبيرٌ في تثبيط قابلية المسبب المرضي *Fusarium* على تحليل خلايا العائل النباتي بفعل إنزيماته وإحداث الإصابة وهذا يتفق مع (Chełkowski *et al*. 2012; Champeil *et al*. 2004).



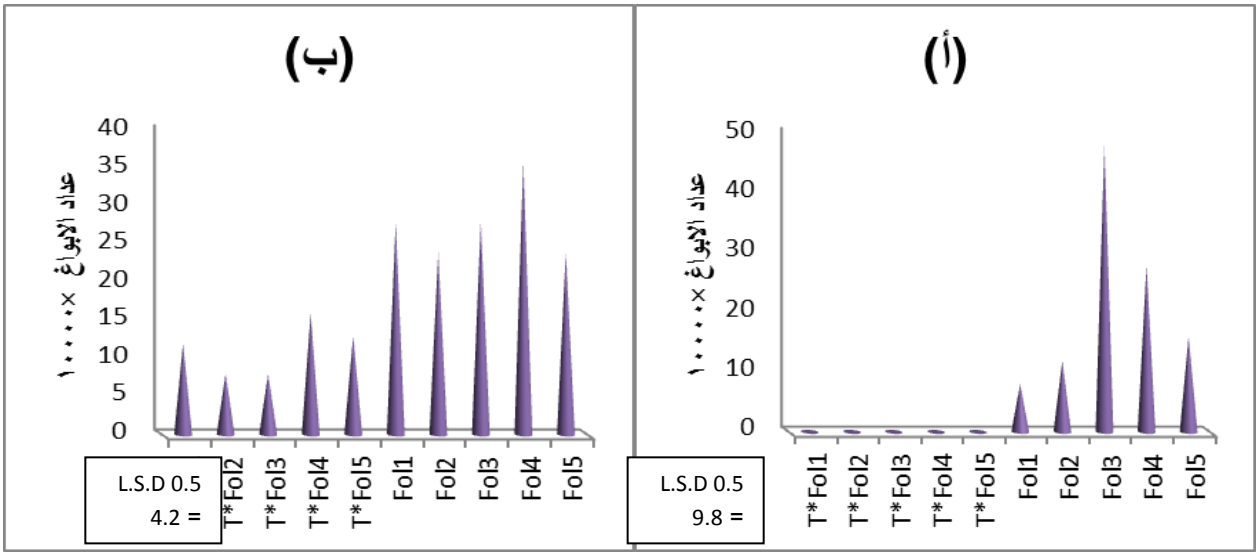
شكل 1: تأثير الراشح الايضي للفطر *T. harzianum* على النسبة المؤية لانبات ابواغ عزلات الفطر FOL، أ: الابواغ الكبيرة، ب: الابواغ الصغيرة

تـأثير الراشـح الايضـي للفطـر *T. harzianum* علـى انتـاج الكونيدات الكبيرة والصغيرة لعزلات الفطر FOL

بينت النتائج (شكل 2) ان انتاج الأبواغ الكبيرة من قبل عزلات الفطر FOL قـد فشـل تمامـا نتيجـة التـأثير التثبيطـي لراشـح الفطـر *T. harzianum* وعلى كافة عزلات الفطر الممرض التي عوملت مزارعها الفطرية بلقاح فطر التضاد بالمقارنة مع معاملة السيطرة والتي وصل فيها إنتاج الأبواغ الكبيرة في العزلتين FOL3 و FOL4 الى 48×10^4 و 28×10^4 علـى التـوالي، ثـم تلتهـا بـاقي العـزلات (FOL1و FOL2 و FOL5) (8×10^4 و 12×10^4 و 16×10^4) على التوالي.

أما بالنسبة للأبواغ الصغيرة (شكل2) فقد كان سلوك المضاد الحيوي معها مختلفا اذ انخفضت اعدادها الى النصف تقريبا مقارنة مع معاملة السيطرة ، حيث وصل التجرثم في معاملتي التداخل بين الفطر الممرض وفطـر المقاومـة الاحيائيـة FOL4 ×T و FOL5 ×T (16×10^4 و 13×10^4) وهـي تمثـل تقريبـاً نصـف العـدد مقارنـة بمعاملـة السـيطرة (36×10^4 و 24×10^4) ثـم تلتهـا بعـد ذلـك بـاقي العـزلات T×FOL1 و T×FOL2 و T×FOL3 (12×10^4 و 8×10^4 و 8×10^4) علـــــى التوالي مقارنـة بمعاملات المقارنـة لنفس العزلات (28×10^4 و 24×10^4 و 28×10^4) علـى التوالي ، كذلك بينت النتائج ان هنـاك فروق معنويـة بين عزلات الفطر FOL نفسها ، حيث ان تثبيط أو انخفاض عملية التجرثم لعزلات الفطر الممرض ربما يرجع ذلك الى قدرة فطر المقاومة *T. harzianum* على انتاج العديد من المواد الايضية الثانوية خاصة المضـادات مثل Trichodermol و Trichodermin و Gliotoxine و Pachybasi و Emodin Chrysophancol التي تعمل على تحلل الخيوط الفطرية (Kuguk و Kivang، 2002). كما ان لفطر التضاد القدرة علـى انتـاج إنزيمـات داخـل وخـارج الخلايـا محللـة للسـليلوز مثـل Cellulases،Cellobiases التي تحول السيليلوز إلى كلوكوز. ان الانزيمات محللة للكايتين والتي يفرزها الفطر *T.harzianum* تتضمن Exochitinases Endochitinases التـي تنـتج خـلال نمـو الفطر (Chełkowski *et al*., 2012 ; Champeil *et al*., 2004).

وقد يعود السبب في اختلاف اعداد الأبواغ بين عزلات الفطر الممرض الى الظروف المختبرية التي خضع لها الفطر ونوع العزلة والمنطقة التي اخذت منها، أو قد يمتلك الفطر مستويات مختلفة من النمو مما قد ينعكس على عملية التجرثم.



شكل 2: تأثير الراشح الايضي للفطر T. harzianum على تجرثم عزلات الفطر FOL، أ: الابواغ الكبيرة، ب: الابواغ الصغيرة

المصادر العربية

حسان، آلاء خضير . 2005 . تقويم فاعلية بعض عوامل الاستحثاث والمبيدات في حماية نبات الخيار من الإصابة بالفطر الممرض *Pythium aphanidermatum* . رسالة ماجستير . كلية الزراعة – جامعة بغداد ، 92 صفحة.

العيساوي ، ذياب عبد الواحد فرحان . 2006 . عزل وتشخيص بعض الفطريات المرافقة لمرض موت بادرات وتعفن جذور الرقي ومقاومتها بالطرق الأحيائية والكيميائية. رسالة ماجستير ، الكلية التقنية / المسيب ، 66 صفحة .

الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله . 2000. تصميم وتحليل التجارب الزراعية .ألطبعه ألثانيه. جامعة الموصل صفحة 360 .

Bell, D. K., Wells, H. D., and Markham, C. R., 1982. In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, *72*(4), p. 379-382.

Borrero, C., Trillas, M. I., Ordovás, J., Tello, J. C., and Avilés, M., 2004. Predictive factors for the suppression of Fusarium wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology*, *94*(10), p. 1094-1101.

Carling, D. E., Leiner, R. H., & Kebler, K. M., 1987. Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of Rhizoctonia solani. *Phytopathology*, *77*(11), p. 1609-1612

Champeil, A., Doré, T., and Fourbet, J. F., 2004. Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains. *Plant science*, *166*(6), p. 1389-1415

Chełkowski, J., Gromadzka, K., Stępień, Ł., Lenc, L., Kostecki, M., and Berthiller, F., 2012. Fusarium species, zearalenone and deoxynivalenol content in preharvest scabby wheat heads from Poland. *World Mycotoxin Journal*, *5*(2), p. 133-141.

Chinnasamy, G. 2005. A proteomics perspective on biocontrol and plant defense mechanism. In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (pp. 233-255). Springer, Dordrecht.

Daniel, H. C. F., Wilfredo, F. F., Francisco, C. R., Gabriel, G. M. and Epifanio, C. D. 2014. Antibiosis In vitro of *Trichoderma* Strains Metabolic Extract on Mycelial Growth and Reproductive Capacity of *Fusarium oxysporum* Isolated from Pepper Plants (*Capsicum annuum* L.) *British Biotechnology Journal*, 4 (4), p. 387-399

El-Zawahry, M. Aida, M.A. El-Morsi and Abd-Elrazik, A.A.. 2000. Occurrence of fungal diseases on date palm trees and off-shoots in New Valley governorate and their biological control. *Assiut. J. Agric. Sci.*, 31(3), p. 189-212.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, *2*(1), p. 43.

Küçük, Ç., and Kivanç, M., 2004. Isolation of Trichoderma spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkish Journal of Biology*, *27*(4), p. 247-253.

Larkin, R. P., and Fravel, D. R., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol

organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant disease*, *82*(9), 1022-1028.

Leslie, J. F., and Summerell, B. A., 2006. Practical approaches to identification. *The Fusarium laboratory manual, 1st ed. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA*, p. 101-110.

Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., Kostecki, M., Golinski, P., Ritieni, A., and Chelkowski, J., 1998. Beauvericin Production by FusariumSpecies. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(8), p. 3084-3088.

Mandal, S., Mallick, N., and Mitra, A., 2009. Salicylic acid-induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, *47*(7), p. 642-649.

Monte, E., 2001. Understanding Trichoderma: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, *4*(1), p. 1-4.

Rai, G. K., Kumar, R., Singh, J., Rai, P. K., and Rai, S. K., 2011. Peroxidase, polyphenol oxidase activity, protein profile and Phenolic content in tomato cultivars tolerant and susceptible to Fusarium oxsyporum f. sp. lycopersici. *Pak. J. Bot*, *43*(6), p. 2987-2990.

Ritieni, A., Fogliano, V., Randazzo, G., Scarallo, A., Logrieco, A., Moretti, A., and Bottalico, A., 1995. Isolation and characterization of fusaproliferin, a new toxic metabolite from Fusarium proliferatum. *Natural Toxins*, *3*(1), p. 17-20.

Summerell, B. A., Laurence, M. H., Liew, E. C., and Leslie, J. F., 2010. Biogeography and phylogeography of Fusarium: a review. *Fungal Diversity*, *44*(1), p. 3-13.

Summerell, B. A., Salleh, B., and Leslie, J. F. 2003. A utilitarian approach to Fusarium identification. *Plant disease*, *87*(2), p. 117-128.