

عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لمرض تعفن جذور الباقلاء المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* (Kuhn) وانتخاب الأنواع المثبطة للمرض كمعامل مكافحة احيائية

2. مؤشرات المقاومة المستحثة بفعل فطر المقاومة الاحيائي *Trichoderma harzianum*

وعلاقتها بالمرض وانتاجية النبات

عبد الله عبد الكريم حسن ، مآرب احمد عواد

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

Email: Abdullah_has67@yahoo.com

الملخص

اوضحت قابلية التضاد لـ 15 نوع من الفطريات المصاحبة لمرض تعفن الجذور ضد الفطر الممرض *R.solani* ان الفطر *T. harzianum* كان اسرع نموا من الفطر الممرض اذ غطى نموه كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو اذ بلغت درجة التضاد 1.33، اجريت تجربة حقلية في كلية الزراعة /جامعة تكريت للموسم 2012/2011 لاختبار استحثاث المقاومة الجهازية من قبل فطر المقاومة *T. harzianum* ضد مرض تعفن الجذور المتسبب عن الفطر *R.solani* في ثلاث اصناف من الباقلاء، اعطى صنف شايبلا المصاب بالفطر *R.solani* والمكافح بالفطر *T. harzianum* اعلى نسبة مئوية لآفات البذور بلغت 98.67. مقارنة بـ 67.67% في النباتات المصابة غير المكافحة للصنف نفسه وسجل الصنف المحلي المصاب المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيروكسيداز Peroxidase بلغت 10.90 (وحدة/ملغ بروتين)، في حين سجل الصنف المحلي غير المصاب المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيبتاكلوكانيز β -1,3glucanase بلغت 0.289 (وحدة/ملغ بروتين). بلغت اعلى فعالية نوعية لأنزيم الكايتينيز Chitenase في الصنف برشلونة المصاب المكافح 2.089 (وحدة/ملغ بروتين)، في حين بلغت اعلى فعالية نوعية لأنزيم البولي فينول اوكسيداز Poly phenol oxidase في الصنف شايبلا المصاب المكافح 2.163 (وحدة/ملغ بروتين). اظهر الصنف برشلونة المصاب المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم Phenyl alanine ammonialyase بلغت 0.074 (وحدة/ملغ بروتين)، وبلغ اعلى محتوى من الفينولات الكلية في الصنف المحلي المصاب والمكافح بفطر المقاومة الحيوية 19.22 ملغ /غم نسيج /تلاه غير المصاب المكافح بمحتوى فينولات بلغ 13.53 ملغ /غم نسيج ، خفض الفطر *T.harzianum* نسبة الخلايا الميتة من 75.3 و 70.0 و 58.3% الملحقة بالفطر الممرض لوحده الى 20.07 و 30.0 و 44.4% للاصناف محلي وشايبلا وبرشلونة المعاملة بالفطر الممرض والفطر *T. harzianum* على التوالي كما وخفض الفطر *T.harzianum* شدة الاصابة من 44.67 و 50.67 و 44.67% الملحقة بالفطر الممرض لوحده الى 14.3 و 23.67 و 21.93% للاصناف محلي وشايبلا وبرشلونة المعاملة بالفطر الممرض والفطر *T. harzianum* على التوالي في حين ارتفعت انتاجية النباتات المصابة بالفطر الممرض لوحده من 53.7 و 34.8 و 74.3 غم حبوب طازجة/نبات الى 104 و 68.0 و 158.8 غم/نبات عند مكافحة تلك النباتات المصابة بفطر المقاومة الاحيائي *T. harzianum* للاصناف محلي وشايبلا وبرشلونة على التوالي.

الكلمات المفتاحية: مرض تعفن جذور، الباقلاء، مؤشرات المقاومة المستحثة، مكافحة الاحيائية، *Rhizoctonia solani*، *Trichoderma harzianum*

المقدمة

المحصول فإنه يتعرض الى العديد من الآفات الزراعية التي تسبب خسائر اقتصادية بالحاصل كالإصابة بالآفات الحشرية والإمراض الفطرية والفيروسية والديدان الثعبانية والنباتات الزهرية المتطفلة، ويعد مرض تعفن الجذور الناجم عن الفطر *Rhizoctonia solani* من أهم تلك الأمراض والشائعة في العالم ومن ضمنها العراق مسبباً خسائر اقتصادية بهذا المحصول اذ يهاجم الفطر النباتات في جميع مراحل نموها مسببا تعفن البذور وموت البادرات قبل وبعد البزوغ، وتعفن الجذور وقواعد السيقان، وتستخدم لمقاومة هذا المرض عدد من الطرق الفيزيائية والكيميائية والطرق الإحيائية والأكثر شيوعا هي استخدام المبيدات والمبخرات الكيميائية ونظرا لخطورة هذه المواد وكلفتها العالية وسميتها على مستوى الإنسان والحيوان فضلا عن

الباقلاء *faba bean (Vicia fabae L.)* احد المحاصيل الحولية الشتوية الواسعة الانتشار العائدة للعائلة البقولية Fabaceae التي تحتل المرتبة الثانية بعد العائلة النجيلية من حيث الأهمية والتي تحتوي بذورها على نسبة بروتين عالية وتقدر بحدود (25-40%) (1) وهذا يزيد من أهمية المحصول لقيمتة الغذائية العالية وماتحتويه بذوره من كربوهيدرات التي تصل نسبتها في اغلب الأصناف (56%) فضلا عن قدرته على تحسين صفات التربة من خلال تثبيته للنيتروجين الجوي في التربة عن طريق العقد الجذرية بالتعايش مع بكتريا (*Rhizobium spp*) إذ يقدر ما تثبته نباتات العائلة البقولية من النيتروجين الجوي بـ 40-60 مليون طن متري سنويا لذا فهو يدخل في التعاقب المحصولي بهدف تحسين خواص التربة. نظرا لأهمية هذا

ترشيح نوع Whatman-N0.4 نقلت 5 قطع إلى إطباق بتري تحتوي على 15-20 مل من الوسط الزرعي PDA استخدم 5 أطباق لكل عينة و وضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25 ± 2 م مدة 3-5 أيام ، نقيت هذه المستعمرات كل على حدة عن طريق اخذ جزء من حافة المستعمرة ونقت إلى إطباق بتري تحتوي على وسط PDA المعقم بالطريقة السابقة و حضنت لمدة ثلاثة أيام على درجة حرارة 25 ± 2 م ثم شخّصت الفطريات على مستوى النوع اعتمادا على شكل المستعمرة وتركيب الحوامل والأبواغ والتراكيب الأخرى التي يكونها الفطر وفق الأسس التصنيفية المعتمدة (5,6).

تحضير لقاح الفطرين *R. solani* و *T. harzianum*

نقعت بذور الدخن المحلي *Panicum miliaceum* لمدة 6 ساعات بعدها غسلت جيدا بالماء ومن ثم وضع 50غم منها في دوارق زجاجية سعة 250 مل وأضيف لها 10مل من الماء المقطر لترطيبها وعقمت بجهاز الموصدة عند درجة حرارة 121 م وضغط 1.5 كغم /سم² لمدة ساعة واحدة ونمي الفطرين *R. solani* و *T. harzianum* عن طريق نقل خمسة أقراص قطر 0.5 سم لكل فطر ووضع الدوارق في الحاضنة على درجة حرارة 25 ± 2 م لمدة (10 أيام) مع مراعاة رج الدوارق كل 2 - 3 يوم لضمان توزيع اللقاح الفطري وعدم تكتله .

المكافحة الحيوية لمرض تعفن جذور وقواعد سيقان نباتات الباقلاء

المتسبب عن الفطر *R. solani*

نفذت تجربة حقلية في حقول كلية الزراعة - جامعة تكريت، إذ تم تصميم التجربة بقطاعات عشوائية كاملة RCBD بثلاث قطاعات كل قطاع يحوي 12 معاملة، حرثت التربة التي أبعادها 50×12 م² وتم تسويتها وتنظيفها وعقمت بالفورمالين بتركيز 5% من المحلول التجاري قسم الحقل إلى 3 قطاعات المسافة بين قطاع وآخر 1م كل قطاع يحتوي 12معاملة بمسافات متساوية بعدها قسمت إلى 36 وحدة تجريبية بأبعاد 2.5×2 م² لكل وحدة تجريبية مع ترك مسافة 60 سم² بين الوحدات التجريبية وذلك لعمل كنف ترابي ارتفاعه 25-30 سم قسمت كل وحدة تجريبية إلى أربعة خطوط كل خط يحوي 5 نباتات والمسافة ما بين خط وآخر 60 سم² وما بين نبات وآخر 40 سم² ومعاملة وأخرى 1 م² وتم ري الأرض ريه كاملة قبل الزراعة وسمدت الأرض حسب التوصية السمادية إذ اضيف سماد (سوبر فوسفات بمعدل 428غم لكل معاملة واليوريا بمعدل 11.73غم وكبريتات البوتاسيوم بمعدل 209غم) لكل معاملة وعلى دفتين، زرعت 3 أصناف من بذور الباقلاء (الصنف المحلي وصنف شايبلا وصنف برشلونة) بعد تعقيمها سطحيا بمحلول هايپوكلوريت الصوديوم 10% بمعدل 3 بذور لكل جورة وأضيف لقاح الفطرين (*R. solani* و *T. harzianum*) المحمل على بذور الدخن إلى المعاملات المقرر تلوئتها بمعدل 1غم لقاح لكل شتلة وبعد الانتهاء من توزيع المعاملات سقيت الوحدات التجريبية باستخدام منظومة التنقيط، واجريت عمليات الري وعزق الأدغال حسب حاجة الحقل، تضمنت التجربة المعاملات التالية:

تأثيراتها في البيئة فقد لجأت الأبحاث إلى طرق مقاومة أخرى أكثر أمانا ولعل أبرزها المقاومة الإحيائية إذ استخدمت الكائنات الحية كعوامل مقاومة إحيائية Biological control (BCAs) agents للعديد من فطريات التربة الممرضة ومن هذه العوامل الفطر *Trichoderma* (spp) وأنواع عديدة منه استعملت كعوامل مكافحة حيوية قوية ضد فطريات التربة الممرضة والتي نجحت كبديل للمبيدات الكيميائية (2) و فطريات المايكورايزا الحويصلية الشجيرية *Vesicular arbuscular mycorrhiza* مثل النوع *Glomus intraradices* (3) و فضلا عن فطريات أخرى مثل *Paecilomyces lilacinus* و الفطر *Verticillium biguttatum* و الفطر *Pleurotus* (4) إذ تمتلك هذه الفطريات عدد من الآليات التي تجعلها عوامل مقاومة إحيائية فعالة مثل سرعة نموها ومنافستها على المواد الغذائية والمكان وإفرازها للعديد من المضادات الحيوية والأنزيمات فضلا عن تحفيزها للمقاومة الجهازية في النباتات وتحطيم خلايا المضيف بشكل رئيسي من خلال التطفل نظرا لأهمية هذا المرض وانتشار المسبب المرضي في الفطر بصورة عامة وفيحفاظة صلاح الدين بصورة خاصة ولعدم وجود دراسة مسيقة على مستوى المحافظة تختص بدراسة الفطريات المصاحبة للمرض وكذلك انتخاب الأنواع المثبطة للمرض كعوامل مكافحة إحيائية فقد أجريت هذه الدراسة التي تهدف إلى:

- 1- عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لمرض تعفن جذور الباقلاء من بعض مناطق محافظة صلاح الدين.
- 2- غربلة الفطريات المعزولة لأنتخاب الأكثر مقاومة للمرض.
- 3- دراسة آلية المكافحة الإحيائية من خلال دراسة حث المقاومة الجهازية للنبات والتضاد وتكوين المركبات الفينولية.
- 4- تأثير فطر المقاومة الإحيائي المنتخب لمقاومة المرض من جهة وفي مؤشرات النمو والإنتاج لبعض أصناف الباقلاء من جهة أخرى.

المواد وطرائق العمل

نفذ هذا البحث في كلية الزراعة / قسم وقاية النبات في جامعة تكريت للفترة من (2012-2013).

عزل وتشخيص الفطريات

1-العزل من الجذور

جرى عزل الفطر الممرض *R. solani* والفطريات المصاحبة له في اليوم التالي من جمع العينات (مناطق مختلفة من قضاء تكريت وسامراء وبيجي وبلد) من نباتات الباقلاء التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بمرض تعفن الجذور وقواعد السيقان إذ اخذت 10عينات من كل منطقة وتم فصل منطقة الساق القريبة من سطح التربة ومنطقة الجذور عن باقي أجزاء النبات عند ارتفاع 5 سم فوق منطقة التاج وغسلت الجذور بالماء الجاري لمدة 30 دقيقة ثم تركت لفترة قصيرة لتجف ، قطعت هذه الأجزاء إلى قطع صغيرة بطول 1 سم وعقمت بمحلول هايپوكلوريت الصوديوم (NaOCL) بتركيز 1% لمدة 3 دقائق بعدها غسلت بالماء المعقم ثلاث مرات ثم جففت على ورق

وحدة /مل تم اعتماد المنحنى القياسي لتراكيز مختلفة من سكر الكولكوز وتم التعبير عن الفعالية الأنزيمية بالوحدات اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من الكولكوز لكل مل بالدقيقة الواحدة ثم قدرت الفعالية النوعية للأنزيم (وحدة /ملغ بروتين) حسب المعادلة في الفقرة السابقة.

تقدير انزيم الكايتيناز Chitinase

لتقدير هذا الأنزيم اتبعت طريقة (9) اضيف 1مل من محلول الكايتين المحضر عن طريق (اذابة 100 غم من مسحوق الكايتين في 200 سم³ من حامض الفوسفوريك 95% وتكون الأذابة ببطئ وبشكل تدريجي خلال فترة ساعتين وعلى درجة حرارة 25 م° بعدها يضاف 2 لتر ماء مقطر ويترك المحلول بدرجة حرارة الغرفة لليوم التالي يفصل المحلول بالتريش ثم يؤخذ الراسب (الكايتين) ويغسل عدة مرات في الماء المقطر حتى يصل رقم التفاعل الى 5.5) الى 1 مل من المستخلص الأنزيمي لكل معاملة وحضن المزيج في حمام مائي على درجة 37 م° لمدة ساعتين ونبذت بالطرد المركزي بواقع 2000 دورة بالدقيقة لمدة دقيقتين فقط للتخلص من الشوائب ثم اخذ 1 مل من المحلول بعد الطرد المركزي وضيف اليه 1مل من DNS ووضع المزيج في حمام مائي 100 م° لمدة 5 دقائق بعدها بردت الأنبوب وقيست الأمتصاصية على طول موجي 540 نانوميتر ولأستخراج فعالية الأنزيم وحدة/ مل تم اعتماد المنحنى القياسي لسكر N-acetyl glucoseamine وتم التعبير عن الفعالية الأنزيمية بالوحدات اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من سكر N-acetyl glucoseamine لكل مل بالدقيقة الواحدة ثم قدرت الفعالية النوعية للأنزيم حسب المعادلة في الأنزيم الأول.

تقدير انزيم Poly phenol oxidase

قدر انزيم بولي فينول اوكسيداز حسب طريقة (10) من خلال قياس الأمتصاصية على الطول الموجي 470 نانوميتر لخليط التفاعل المتكون من 2.5 مل من محلول الكاتيكول chatechol المحضر من (اضافة 0.025 مل من إل Chatechol الى 100مل من محلول الفوسفيت المنظم ذو الرقم الهيدروجيني 6) و 0.1 مل من المستخلص الأنزيمي لكل معاملة وعرفت الوحدة الأنزيمية بالتغير الحاصل في الأمتصاصية بمقدار 0.01 لكل دقيقة ثم حسبت الفعالية النوعية للأنزيم حسب المعادلة في الأنزيم الأول.

تقدير انزيم Phenyl alanine- ammonialyase

يتكون مزيج التفاعل من اضافة 2.5 مل من المحلول المنظم pH8.8 Tris-Base الى 0.5 مل من المستخلص الأنزيمي وضيف اليها 3مل من 1m M Phenyl alanin حضن المزيج لمدة ساعة كاملة على درجة حرارة 30-35 وبعد التحضين اضيف 1مل من حامض HCL المركز و 1مل من التولوين حرك المزيج لمدة 30 ثانية ونبذ بالطرد المركزي بسرعة 1000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق اخذت طبقة التولوين وقيست الأمتصاصية على طول موجي 290 نانوميتر مع تحضير الكفئ Blank للتولوين فقط (11). لأستخراج فعالية الأنزيم (وحدة/ مل) تم اعتماد المنحنى القياسي لحامض السياناميك

1- معاملة الفطر الممرض + (ثلاثة اصناف) // 2- معاملة الفطر الحيوي + (ثلاثة اصناف) // 3- معاملة الفطر الممرض + الفطر الحيوي + (ثلاثة اصناف) // 4- معاملة المقارنة + وسط حبوب الدخن غير الملقحة + (ثلاثة اصناف).

مؤشرات المقاومة المستحثة في نبات الباقلاء بفعل الفطر T. harzianum

قدرت مؤشرات المقاومة المقاومة الجهازية بعد 6 اسابيع من عمر النبات والتي شملت تقدير البروتينات المتعلقة بالمرض Pathogen Related Proteins (PRP) وهي البيروكسيداز Peroxidase والبيتا-كلوكانيز B-glucanase والكايتيناز Chitinase والبولي فينول اوكسيداز Poly phenol oxidase و- Phenyl alanine ammonialyase فضلا عن الفيولولات الكلية.

تحضير المستخلص الأنزيمي

اخذ 1غم من الجذر لكل معاملة وغسل جيدا وقطع الى قطع صغيرة وتم سحق الجذر في هاون خزفي موضوع في حمام ثلجي وأضيف له 10 مل من محلول الفوسفيت المنظم pH6 ورشح بورق التريش وبعدها وضع في أنابيب ونبذت في جهاز الطرد المركزي المبرد درجة 4 م° بواقع 10.000 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة لفصل الراشح عن الراسب وبعدها اخذ الراشح النباتي الذي يمثل المستخلص الأنزيمي (4).

تقدير إنزيم البيروكسيداز Peroxidase

قدر انزيم البيروكسيداز حسب طريقة (7) من خلال قياس الأمتصاصية على طول موجي 470 نانوميتر لخليط التفاعل المكون من 2.5 مل محلول بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂ و 0.1 مل من المستخلص الأنزيمي لكل معاملة وعرفت الوحدة الأنزيمية بالتغير في الأمتصاصية بمقدار 0.01 لكل دقيقة ثم قدرت الفعالية النوعية للأنزيم (وحدة /ملغ بروتين) حسب المعادلة التالية:

الفعالية الأنزيمية (وحدة/ مل)

الفعالية النوعية (وحدة/ملغ بروتين) =
تركيز البروتين (ملغ/ مل)

تقدير إنزيم البيتا-كلوكانيز 1,3-β-glucanase

يتكون مزيج التفاعل لتقدير انزيم البيتا كلوكانيز من إضافة 1مل من محلول 1,3-β-glucanase (المحضر من اذابة 5غم من β-glucan في 100مل بفر pH6) إلى 1مل من المستخلص الأنزيمي ثم حضن المزيج على درجة حرارة 35 م° في حمام مائي لمدة 40 دقيقة ثم يؤخذ 1 مل من المزيج بعد التحضين ويضاف اليه 1مل من محلول DNS (Di nitro salselic acid) المحضر من اضافة 1غم DNS في 50 مل ماء مقطر ثم يضاف 20 مل هيدروكسيد الصوديوم NaOH تركيز 8% و 30 غم من ملح روشل (محلول صوديوم بوتاسيوم تارتريت) و 30 مل ماء مقطر ويعقبه التسخين بالحمام المائي على درجة حرارة 100 م° لمدة 5 دقائق بعدها اجري تبريد سريع للأنابيب وضيف 2 مل ماء مقطر وقيست الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر (8). لأستخراج فعالية الأنزيم

حاصل النبات

بعد نهاية التجربة قدر معدل وزن الحبوب الطري (غم) / نبات

النتائج والمناقشة

قابلية التضاد للفطريات المصاحبة لمرض تعفن جذور الباقلاء ضد

الفطر الممرض *R.solani*

عزل وشخص 15 عزلة من انواع مختلفة من الفطريات المصاحبة لمرض تعفن الجذور في الباقلاء ، فضلا عن 4 عزلات للفطر المسبب للمرض *R. solani* . اختبرت اشد العزلات امراضية وهي العزلة R.s.4 بعد تطبيق فرضيات كوخ عليها لغرض انتخاب اكفأ فطر من الفطريات المعزولة ضد هذا المرض ، بينت نتائج جدول (1) قابلية التضاد للفطريات المصاحبة لمرض تعفن الجذور ضد الفطر الممرض *R.solani* وبينت النتائج ان المقاوم الحيوي *T. harzianum* كان اسرع نموا من الفطر الممرض اذ غطى نموه كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو و بلغت درجة التضاد 1.33 كما في الصورة (1) يليه الفطر *T. viride* اذ غطى نموه ثلثي مساحة وغطى الفطر الممرض الثلث الباقي وبلغت درجة التضاد 1.66 حسب السلم الذي وضعه (Bell15). ثم تلاها الفطر *Aspergillus flavus* والفطر *A.oryzae* حيث اذ بلغت قيمة التضاد 2.0 و 2.66 ، على التوالي ، اما بقية الفطريات فكانت غير متضادة لنمو الفطر *R.solani* حسب هذا الاختبار . اشارت العديد من البحوث الى قدرة المقاوم الحيوي *T. harzianum* على افراز العديد من الأنزيمات المحللة كأنزيمات Chitinase او β -1,3 gluconase و ProteaseLipase فضلا عن تجمع والتصاق ابواغ عامل مكافحة الأحيائية على الغزل الفطري للمرض محللة اياه (16) او انتاج المضادات الحيوية مثل الأيمودين والترايكودريمين والكلاتوكسين وافراز مواد ايضية غازية مثل الأسييتال هايد وكذلك بين Montealegre (2) ان المقاوم الحيوي *T. harzianum* كان له تأثير مثبط لنمو الفطر *R.solani* . وهذه النتائج تتفق مع العديد من الدراسات التي اشارت الى كفاءة راشح مزرعة الفطر *Trichoderma spp* في تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات وربما يعزى ذلك الى افرازه للعديد من المواد المثبطة لنمو الفطريات كأنتاج المضادات الحيوية Pachybasin و Diketopiperazines و Alamethacin و Trichorzianinse فضلا عن انتاج مركبات متطايرة كالأسترات والكحولات التي لها فعل كايح للعديد من الفطريات الممرضة للنبات (17).

Cinamic acid ، يعبر عن الفعالية الأنزيمية بالوحدات اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من حامض السيناميك لكل مل بالدقيقة الواحدة ثم قدرت الفعالية النوعية للأنزيم (وحدة /ملغ بروتين).

تقدير البروتين

استخدمت طريقة بايوريت لتقدير البروتين في المستخلصات الأنزيمية لمعاملات التجربة ، اذ اضيف 1مل من المستخلص الأنزيمي في انابيب زجاجية ثم اضيف اليها 4 مل من محلول بايوريت مزجت جيدا وحضنت الأنابيب لمدة 20 دقيقة على درجة 37 م وقيست الأمتصاصية على طول موجي 540 نانوميتر . ولأستخراج تركيز البروتين تم اعتماد المنحنى القياسي (المكون من تراكيز مختلفة من اليومين المصل البقري) لتقدير البروتين (12).

تقدير الفينولات الكلية

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل (13) قطع 1غم من النسيج النباتي (جذور) الى 10 مل كحول ايثيلي تركيز 80% في حمام مائي مغلي لمدة 10 دقائق بعدها برد وسحق جيدا بالهاون الخزفي ورشح عبر قطعتي من الشاش ثم اضيف 15 مل كحول 80% وسحق مرة اخرى واكمل الحجم النهائي الى 25 مل . وضع 1مل من المستخلص الكحولي في انبوبة اختبار واطيف 1مل من حامض HCL العيارية 0.05 مع اضافة 1مل من محلول ارنو (المكون من اذابة 25غم نترات الصوديوم $NaNO_2$ في كمية من الماء المقطر واطيف 10غم من مولبيدات الصوديوم Sodium molybodium ثم اكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر) و 10 مل ماء مقطر و 2 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH (4%) وتم قياس الأمتصاصية على طول موجي 515 نانوميتر ولأستخراج تركيز الفينولات تم اعتماد المنحنى القياسي لتراكيز مختلفة من الكاتيكول.

تقدير شدة اصابة النباتات

قدرت النسبة المئوية لشدة الأصابة لكل المعاملات حسب معادلة Mckinney (14) فيما تم تقدير درجة الأصابة حسب مظهر الأصابة اعتمادا على الدليل التالي: 0 / النبات سليم والمجموع الجذري كبير والجذور بيضاء / 1 تلون بسيط على الجذور واصفرار لعدد محدود من الأوراق / 2 تلون الجذور بالكامل مع اصفرار شامل للأوراق / 3 يمتد التلون من الجذور الى قواعد السيقان / 4 موت النبات

شدة الاصابة(%) = $100 \times$ عدد النباتات في الدرجة $0 \times 0 +$... عددالنباتات في الدرجة $5 \times 5 /$ مجموع النباتات المفحوصة $4 \times$

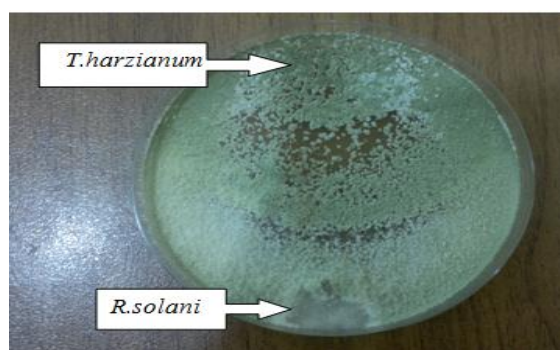
جدول (1) قابلية التضاد للفطريات المصاحبة لمرض تعفن الجذور ضد الفطر الممرض *R.solani*

الفطريات	درجة التضاد(ضد الفطر الممرض <i>R.solani</i>)
<i>A. flavus</i>	2.0 c
<i>A. niger</i>	3.33 b
<i>T. harzianum</i>	1.33 d
<i>A. oryzae</i>	2.66 c
<i>Rhizopus</i>	4.00 a
<i>Aspergillus sp.</i>	4.33 a
<i>A.fumigates</i>	4.33 a
<i>F. oxysporium</i>	3.66 b
<i>Penicillium sp.</i>	4.33 a
<i>Heleminthosporium</i>	4.33 a
<i>A. alternate</i>	4.33 a
<i>P. italicum</i>	4.33 a
<i>Stemophyllum sp.</i>	3.33 b
<i>Mucor sp.</i>	3.33 b
<i>T. viride</i>	1.66 d

تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروق معنوية والحروف المختلفة الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى %5

بلغت 68.8%، اما فيما يخص التداخل الثلاثي بين الصنف والأصابة والمكافحة فتشير نتائج الجدول وجود فروقات معنوية عالية اذ اعطى صنف شاببلا المصاب المكافح اعلى نسبة مئوية للأنبات بلغت 98.67. مقارنة بالمصاب غير المكافح اذ بلغت النسبة المئوية للأنبات 67.67 و 71.0 للصنفين شاببلا والمحلي، على التوالي، واعطى الصنف شاببلا في النباتات المكافحة بفطر المقاومة الحيوية *T. harzianum* اعلى نسبة مئوية للأنبات بلغت 94.0 تلاها الصنف المحلي المكافح بنسبة مئوية بلغت 91.33. مقارنة بمعاملة السيطرة اذ بلغت النسبة المئوية للأنبات 85.67 و 88.33 للصنفين شاببلا والمحلي، على التوالي.

من خلال النتائج تبين ان الفطر *R.solani* كان الأكثر تأثير في النسبة المئوية لأنبات البذور وهذا يمكن ان يعزى الى قدرة هذا الفطر الممرض وكفائته وتخصصه في مهاجمة البذور وهي في طور قبل البروز ويستطيع افراز المواد الأيضية المؤثرة على الأنبات وكذلك الأنزيمات اللازمة لتحليل البذور وتعفنها. في حين اظهر الفطر *T. harzianum* ارتفاعا في النسبة المئوية لأنبات البذور مقارنة بالسيطرة. ربما يعزى السبب الى قدرة الفطر *T. harzianum* في توفير بعض الحماية للبذور في اثناء عملية الأنبات وخلال مهاجمتها من قبل الفطر الممرض *R.solani* او قد يعود السبب الى افراز بعض المواد التي تعمل على تحليل الغلاف الخارجي للحبوب مما يسهل عملية الأنبات مثل انزيم Cellulase، او افراز مواد ذات تأثير تحفيزي على الأنبات والنمو مثل Indole Acetic Acid، ويمكن تفسير حماية الفطر *T. harzianum* للبذور من الفطر الممرض *R.solani* بأفراز الفطر *T. harzianum* موادا خارجية تعمل على تثبيط انزيمات الفطر الممرض فضلا عن افرازه لبعض المواد المشجعة لنمو النبات او استحداث المقاومة في النبات (18).



الصورة (1) تضاد الفطر *T.harzianum* مع الفطر الممرض *R.solani*

تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر الممرض *R.s* في نسبة انبات البذور (%) لثلاثة اصناف من الباقلاء

يوضح الجدول (2) وجود فروق معنوية بين المكافحة من عدمها اذ بلغت النسبة المئوية لأنبات البذور في النباتات المكافحة 90.83 مقارنة بالنباتات غير المكافحة اذ بلغت 78.33. وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل الثنائي بين الصنف والإصابة اذ اعطى الصنف المحلي وصنف شاببلا غير المصاب اعلى نسبة مئوية لأنبات البذور بلغت 89.83. مقارنة بالمصاب اذ بلغت 79.5 و 77.8% للصنف المحلي والصنف شاببلا، على التوالي.، إما عن تأثير التداخل بين الصنف والمكافحة فتبين نتائج الجدول (2) وجود فروقات معنوية عالية اذ اعطى صنف شاببلا المكافح اعلى نسبة مئوية لأنبات البذور اذ بلغت 96.3 ثم تلاه الصنف المحلي المكافح بنسبة مئوية بلغت 89.6 مقارنة بغير المكافحة اذ بلغت النسبة المئوية لأنبات البذور 76.6 و 79.6 للصنفين شاببلا والصنف المحلي، على التوالي، وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل بين الأصابة والمكافحة اذ اعطت النباتات المكافحة بالفطر الحيوي *T. harzianum* اعلى نسبة مئوية لأنبات البذور بلغت 91.44 قياسا بالنباتات غير المكافحة اذ

جدول (2) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في نسبة انبات البذور (%) لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف
	غير مكافح	مكافح		
79.5	71.00	88.00	مصاب	الصنف المحلي
89.83	88.33	91.33	غير مصاب	
83.1	67.67	98.67	مصاب	صنف شابيلا
89.83	85.67	94.00	غير مصاب	
77.8	68.0	87.0	مصاب	صنف برشلونة
87.3	89.3	85.33	غير مصاب	
تأثير الصنف				
84.67	79.6	89.6	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة
86.5	76.6	96.3	صنف شابيلا	
82.58	78.6	86.5	صنف برشلونة	
تأثير الإصابة				
80.17	68.8	91.44	مصاب	التداخل بين الإصابة والمكافحة
89.00	87.7	90.2	غير مصاب	
تأثير المكافحة				
	78.33	90.83		

التداخل الثلاثي	التداخل بين الإصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة	الإصابة	الصنف	LSD
7.95	3.93	6.86	6.86	3.11	n.s	n.s	5%

للأنزيم 5.798 و 7.8 (وحدة/ملغ بروتين) للصنفين برشلونة والمحلي، على التوالي. ويبين الجدول وجود فروقات معنوية بين الأصباة والمكافحة إذ اعطت النباتات المصابة والمكافحة اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيروكسيديز Peroxidase بلغت 10.57 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بالمصابة بالفطر *R.solani* غير المكافحة إذ بلغت فعالية الأنزيم 8.006 (وحدة/ملغ بروتين). اما فيما يخص التداخل الثلاثي بين الصنف والأصباة والمكافحة فتشير نتائج الجدول وجود فروقات معنوية إذ اعطى الصنف المحلي المصاب المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيروكسيديز Peroxidase بلغت 10.90 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاها الصنف برشلونة المصاب المكافح بفعالية نوعية بلغت 10.403 (وحدة/ملغ بروتين). مقارنة بمعاملة السيطرة إذ بلغت فعالية الأنزيم 6.400 و 3.243 و 6.167 (وحدة/ملغ بروتين) للأصناف الثلاثة، على التوالي. ان سبب ارتفاع الفعالية الأنزيمية في النباتات المصابة بالفطر *R.solani* وغير المكافحة بفطر المقاومة الأحيائي قد يعزى الى ان المسبب المرضي يعمل على استحداث المقاومة للنبات، وتعمل استجابة النبات نتيجة لتلك الأصباة متمثلة في ظهور العديد من عوامل المقاومة ومنها البروتينات المتعلقة بالمرض Pathogen Related Proteins (PRP) وهو رد فعل طبيعي لمعظم النباتات التي تصاب بالامراض النباتية. يلاحظ من خلال النتائج ان فعالية انزيم البيروكسيديز Peroxidase بلغت اقصاها في النباتات المصابة والمكافحة بالمقاوم الحيوي *T.harzianum* وفي هذه الحالة يمكن تعزى اسبابها الى حث عوامل المقاومة للنبات بفعل المسبب المرضي من جهة وكذلك من قبل المقاومة الحيوية بالفطر *T.harzianum* من جهة اخرى وتتميز المعاملة بفطر المقاومة الأحيائي *T.harzianum* بحث الأنزيم من قبل الأنبات بصورة مبكرة لآداء فعله التنشيطي ضد الفطر الممرض *R.solani* في حين يكون تحفيز الأنزيم من قبل المسبب المرضي متأخرا اتى بعد حدوث

مؤشرات المقاومة المستحثة (البروتينات المتعلقة بالمرض) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم البيروكسيديز Peroxidase (وحدة/ملغ بروتين) للمرحلة الثانية لثلاثة اصناف من الباقلاء

تبين نتائج الجدول (3) وجود فروقات معنوية بين الأصناف الثلاثة لنبات الباقلاء إذ اعطى الصنف المحلي اعلى فعالية نوعية لأنزيم بلغت 8.430 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاه الصنف شابيلا بفعالية نوعية بلغت 7.615 (وحدة/ملغ بروتين) ثم الصنف برشلونة بفعالية نوعية بلغت 7.601 (وحدة/ملغ بروتين). كذلك تبين نتائج الجدول وجود فروقات معنوية بين الإصابة من عدمها إذ اعطت النباتات المصابة بالفطر *R.solani* اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيروكسيديز Peroxidase بلغت 9.288 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بعدم الإصابة التي بلغت 6.476 (وحدة/ملغ بروتين). ويوضح الجدول وجود فروق معنوية بين المكافحة من عدمها إذ بلغت الفعالية الأنزيمية للنباتات المكافحة 9.126 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بـ 6.638 (وحدة/ملغ بروتين) لغير المكافحة. وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل الثنائي بين الصنف والإصابة إذ اعطى الصنف المحلي المصاب اعلى فعالية نوعية لأنزيم بلغت 10.06 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاه الصنف برشلونة المصاب بفعالية نوعية بلغت 9.37 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المصاب إذ بلغت الفعالية النوعية لأنزيم 6.800 و 5.82 (وحدة/ملغ بروتين) للصنفين المحلي وبرشلونة، على التوالي. إما عن تأثير التداخل بين الصنف والمكافحة فتبين نتائج الجدول وجود فروقات معنوية إذ اعطى الصنف برشلونة المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيروكسيديز Peroxidase إذ بلغت 9.403 (وحدة/ملغ بروتين) تلاه الصنف المحلي المكافح بفعالية نوعية بلغت 9.05 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المكافح إذ بلغت الفعالية النوعية

واستحثات الفايثوالكسينات فضلا عن الدفاعات التركيبية لتقوية الجدران مثل بناء اللكتين كما يتفاعل الأنزيم مع بروتينات الجدار الخلوي لتكوين روابط عرضية ومركبات متعددة مما يزيد من صلابة الجدار الخلوي (19).

الأصابة وانتشار المرض فقد تكون فائدة النبات معدومة من حث الأنزيم بفعل الأصابة. و يعمل البيروكسيداز Peroxidase مع بيروكسيد الهيدروجين في تكسير انزيمات المسبب المرضي ومنها انزيم Pectinase ومن ثم تثبيط عملية تحطيم الجدار الخلوي للنبات

جدول(3) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم البيروكسيداز Peroxidase وحدة / مل

لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف			
	غير مكافح	مكافح					
10.06	9.217	10.90	مصاب	الصنف المحلي			
6.800	6.400	7.200	غير مصاب	صنف شابيلا			
8.42	6.447	10.40	مصاب	صنف برشلونة			
6.803	6.167	7.440	غير مصاب				
9.37	8.353	10.403	مصاب				
5.82	3.243	8.403	غير مصاب				
تأثير الصنف							
8.430	7.80	9.05	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة			
7.615	6.307	8.92	صنف شابيلا				
7.601	5.798	9.403	صنف برشلونة				
تأثير الإصابة				التداخل بين الإصابة والمكافحة			
9.288	8.006	10.57	مصاب				
6.476	5.27	7.681	غير مصاب				
تأثير المكافحة							
	6.638	9.126					
التداخل الثلاثي	التداخل بين الإصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة	الإصابة	الصنف	LSD
0.375	0.216	0.265	0.265	0.153	0.153	0.187	5%

وبرشلونة. ويبين الجدول وجود فروقات معنوية بين الأصابة والمكافحة إذ اعطت النباتات غير المصابة والمكافحة اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيتاكلوكانيز β -1,3glucanase بلغت 0.230 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بالمصابة غير المكافحة إذ بلغت 0.182 (وحدة/ملغ بروتين). اما فيما يخص التداخل الثلاثي بين الصنف والأصابة والمكافحة فتشير نتائج الجدول وجود فروقات معنوية إذ اعطى الصنف المحلي غير المصاب المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيتاكلوكانيز β -1,3glucanase بلغت 0.289 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاها الصنف برشلونة المصاب المكافح بفعالية نوعية بلغت 0.259 (وحدة/ملغ بروتين). ثم الصنف شابيلا المصاب المكافح بفعالية نوعية بلغت 0.208 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بمعاملة السيطرة إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 0.113 و 0.132 و 0.179 (وحدة/ملغ بروتين) للأصناف الثلاثة، على التوالي.

إن الذي يؤكد استحثات المقاومة في النباتات المصابة والمكافحة بفطر المقاومة الأحيائي *T.harzianum* هو زيادة الفعالية الأنزيمية للنباتات السليمة والتي تمت معاملتها بفطر المقاومة الأحيائي *T.harzianum* إذ كانت الفعالية الأنزيمية للنباتات السليمة المعاملة بالفطر الأحيائي اعلى مما هو عليه في النباتات السليمة غير المعاملة بالفطر الأحيائي .

ان β -glucan هو احد البوليمرات الموجودة في جدر الخلايا الفطرية ومن ضمنها الفطر *R.solani* ويؤدي انزيم β -1,3glucanase دور مهم في التحليل المائي لهذه المركبات عند الأصابة الى وحدات ابسط

تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم البيتاكلوكانيز β -1,3glucanase وحدة /مل لثلاثة اصناف من الباقلاء

تشير نتائج الجدول(4) الى وجود فروقات معنوية بين الإصابة من عدمها إذ اعطت النباتات المصابة بالفطر *R.solani* اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيتاكلوكانيز β -1,3glucanase بلغت 0.202 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المصابة إذ بلغت 0.186 (وحدة/ملغ بروتين) ، ويوضح الجدول وجود فروق معنوية بين المكافحة من عدمها إذ بلغت الفعالية الأنزيمية للنباتات المكافحة 0.226 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المكافحة إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 0.162 (وحدة/ملغ بروتين)، وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل الثنائي بين الصنف والإصابة إذ اعطى الصنف برشلونة المصاب اعلى فعالية نوعية للأنزيم بلغت 0.223 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاه الصنف شابيلا المصاب إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 0.195 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة ب 0.164 و 0.193 (وحدة/ملغ بروتين) لغير المصاب للصنفين برشلونة وشابيلا، على التوالي، إما عن تأثير التداخل بين الصنف والمكافحة فتبين نتائج الجدول وجود فروقات معنوية إذ اعطى الصنف المحلي المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم البيتاكلوكانيز β -1,3glucanase إذ بلغت 0.244 (وحدة/ملغ بروتين). تلاه الصنف برشلونة المكافح بفعالية نوعية بلغت 0.227 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المكافح إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 0.145 و 0.160 (وحدة/ملغ بروتين) للصنفين المحلي

نشاطها مرتبط بشدة المقاومة الناشئة عن العدوى الأولية او الحث على المقاومة (20). وان انتاج انزيم Chitinase وانزيم β -1,3 glucanase تعتبر عوامل مهمة في المكافحة الحيوية لفطريات التربة لقابليتهم العالية على تحليل وازالة (Chitin و β -1,3 glucanase) الموجودة في جدر خلايا مسببات المرضية (21). جدول(4) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم البييتاكلوكانيز β -1,3glucanase وحدة

/مل للمرحلة الثانية لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف			
	غير مكافح	مكافح					
0.188	0.1770	0.200	مصاب	الصنف المحلي			
0.201	0.113	0.289	غير مصاب	صنف شابيلا			
0.195	0.183	0.208	مصاب				
0.193	0.179	0.206	غير مصاب	صنف برشلونة			
0.223	0.187	0.259	مصاب				
0.164	0.132	0.195	غير مصاب				
تأثير الصنف							
0.1948	0.145	0.244	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة			
0.1945	0.181	0.207	صنف شابيلا				
0.1936	0.160	0.227	صنف برشلونة				
تأثير الإصابة							
0.202	0.182	0.222	مصاب	التداخل بين الإصابة والمكافحة			
0.186	0.141	0.230	غير مصاب				
تأثير المكافحة							
	0.162	0.226					
التداخل الثلاثي	التداخل بين الإصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة	الإصابة	الصنف	LSD
0.010	0.006	0.008	0.008	0.004	0.004	n.s	5%

الصنف والمكافحة فتبين نتائج الجدول وجود فروقات معنوية اذ اعطى الصنف برشلونة المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم الكايتينيز Chitinase اذ بلغت 1.912 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاه الصنفين شابيلا والمحلي المكافحين بفطر المقاومة الحيوي *T.h* بفعالية نوعية بلغت 1.437 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المكافح اذ بلغت الفعالية النوعية لأنزيم 0.884 و 0.969 و 0.740 (وحدة/ملغ بروتين) للأصناف الثلاث، على التوالي. وببين الجدول وجود فروقات معنوية بين الإصابة والمكافحة اذ اعطت النباتات غيرالمصابة والمكافحة اعلى فعالية نوعية لأنزيم الكايتينيز Chitinase بلغت 1.718 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بالمصابة غير المكافحة اذ بلغت 1.028 (وحدة/ملغ بروتين).، اما فيما يخص التداخل الثلاثي بين الصنف والإصابة والمكافحة فتشير نتائج الجدول الى وجود فروقات معنوية اذ اعطى الصنف برشلونة المصاب المكافح اعلى فعالية نوعية لأنزيم الكايتينيز Chitinase بلغت 2.089 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاها الصنف المحلي غيرالمصاب المكافح بفعالية نوعية بلغت 1.940 (وحدة/ملغ بروتين) ثم الصنف برشلونة غير المصاب المكافح بفعالية نوعية بلغت 1.738 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بمعاملة السيطرة اذ بلغت الفعالية النوعية لأنزيم 0.788 و 0.650 و 0.666 (وحدة/ملغ بروتين) للأصناف الثلاثة، على التوالي.

تبين النتائج ارتفاع ارتفاع الفعالية الأنزيمية في النباتات المصابة بالفطر *R.solani* وغير المكافحة بفطر المقاومة الأحيائي قد يعزى

(سكريات بسيطة) كلوكوز وسكريات قصيرة القطع مما يضعف الجدار الخلوي للفطر الممرض كنتيجة مباشرة لأصابة النبات بالمسببات المرضية كما يتبعها ايضا وجود بروتينات المقاومة SAR-Related proteins(systemic acquired resistance) وهي المعروفة بالبروتينات الخاصة بالمقاومة الجهازية المكتسبة ويكون وجودها او

تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم الكايتينيز Chitinase وحدة /مل لثلاثة اصناف من الباقلاء تبين نتائج الجدول(5) جود فروقات معنوية بين الأصناف الثلاثة لنبات الباقلاء اذ اعطى الصنف برشلونة اعلى فعالية نوعية لأنزيم بلغت 1.398 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاه الصنف شابيلا بفعالية نوعية بلغت 1.203 (وحدة/ملغ بروتين)، ثم الصنف المحلي بفعالية نوعية بلغت 1.089 (وحدة/ملغ بروتين). كذلك تبين نتائج الجدول وجود فروقات معنوية بين الإصابة من عدمها اذ اعطت النباتات المصابة بالفطر *R.solani* اعلى فعالية نوعية لأنزيم الكايتينيز Chitinase بلغت 1.250 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بغير المصابة اذ بلغت فعالية الأنزيم 1.210 (وحدة/ملغ بروتين). ويشير الجدول الى وجود فروقات معنوية بين المكافحة من عدمها اذ كانت اعلى فعالية نوعية في النباتات المكافحة بالفطر *T.harzianum* بلغت 1.595 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المكافحة اذ بلغت 0.864 (وحدة/ملغ بروتين). وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل الثنائي بين الصنف والإصابة اذ اعطى الصنف برشلونة المصاب اعلى فعالية نوعية لأنزيم بلغت 1.534 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاه الصنف شابيلا المصاب بفعالية نوعية بلغت 1.335 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بغير المصاب اذ بلغت فعالية الأنزيم 1.263 و 1.071 (وحدة/ملغ بروتين) للصنفين برشلونة وشابيلا، على التوالي. إما عن تأثير التداخل بين

ان الكايتين هو بوليمر مؤلف من وحدات مكررة من سكر N-acetyl glucoseamin وهو من المكونات الرئيسية في جدر الفطريات ومنها الفطر الممرض *R.solani* كونه يعطي صلابة للتركيب البنائي للجدران ويحتوي على نسبة عالية من النتروجين الذي يحتاجه الفطر *T. harzianum* في النمو وبناء البروتوبلازم. لذا يهاجم الفطريات الحاوية على الكايتين ويلتف حول خيوطها الفطرية بشكل ملف ويبدأ بأفراز انزيم الكايتينيز الذي يحلل خلايا الجدران لغرض امتصاص مكوناتها الداخلية ومن ثم التغذية عليها كونه مصدر كاربوني ايضا ويحصل الفطر *T. harzianum* منها على الكاربون والنتروجين في وقت واحد (23) وبوجود انزيم الكايتينيز Chitinase الذي يحلل الكايتين مائيا مما يؤدي الى ضعف الجدار الخلوي في الفطر الممرض مختزلا من امراضه وتكمن اهمية الفطر *T.harzianum* بدورين مهمين في اضعاف الفطر الممرض اما من خلال حث النبات لزيادة انتاج هذا الأنزيم كونه احد عوامل المقاومة المستحثة وحسب ماتم اثباته في نتائج هذه الدراسة او من خلال افراز الفطر *T.harzianum* نفسه للكايتينيز بشكل مباشر والذي يؤدي نفس الدور في اضعاف الفطر الممرض.

الى ان المسبب المرضي يعمل على استحثاث المقاومة للنبات، وتعمل استجابة النبات نتيجة لتلك الإصابة متمثلة في ظهور العديد من عوامل المقاومة ومنها البروتينات المتعلقة بالمرض Pathogen Related Proteins (PRP) او كرد فعل طبيعي للنبات نتيجة الإصابة بالأمراض النباتية.

يلاحظ من خلال النتائج ان فعالية انزيم الكايتينيز Chitinase بلغت اقصاها في النباتات المصابة والمكافحة بالمقاوم الحيوي *T.harzianum* وفي هذه الحالة يمكن تعزى اسبابها الى حث عوامل المقاومة للنبات بفعل المسبب المرضي من جهة وكذلك من قبل المقاومة الحيوية بالفطر *T.harzianum* من جهة اخرى (22). وتتفق هذه النتائج مع ماتوصلت اليه (3) اذ بينت ان اصابة نباتات الطماطة بالفطر *F.oxysporum* ادت الى زيادة فعالية انزيم β -1,3 glucanase وانزيم Chitinase تدريجيا بأزدياد زمن الإصابة . وإن الذي يؤكد استحثاث المقاومة في النباتات المصابة والمكافحة بفطر المقاومة الأحيائي *T.harzianum* هو زيادة الفعالية الأنزيمية للنباتات السليمة والتي تمت معاملتها بفطر المقاومة الأحيائي *T.harzianum* إذ كانت الفعالية الأنزيمية للنباتات السليمة المعاملة بالفطر الأحيائي اعلى مما هو عليه في النباتات السليمة غير المعاملة بالفطر الأحيائي.

جدول (5) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم الكايتينيز Chitinase وحدة /مل لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف
	غير مكافح	مكافح		
0.882	0.831	0.934	مصاب	الصنف المحلي
1.295	0.650	1.940	غير مصاب	
1.335	1.271	1.398	مصاب	صنف شابيلا
1.071	0.666	1.476	غير مصاب	
1.534	0.981	2.087	مصاب	صنف برشلونة
1.263	0.788	1.738	غير مصاب	
تأثير الصنف				
1.089	0.740	1.437	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة
1.203	0.969	1.437	صنف شابيلا	
1.398	0.884	1.912	صنف برشلونة	
تأثير الإصابة				
1.250	1.028	1.473	مصاب	التداخل بين الإصابة والمكافحة
1.210	0.701	1.718	غير مصاب	
تأثير المكافحة				
	0.864	1.595		

التداخل الثلاثي	التداخل بين الإصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة	الإصابة	الصنف	LSD
0.078	0.045	0.055	0.055	0.032	0.032	0.04	5%

(وحدة/ملغ بروتين) ويشير الجدول الى وجود فروقات معنوية بين المكافحة من عدمها اذ كانت اعلى فعالية نوعية في النباتات المكافحة بالفطر *T.harzianum* بلغت 1.201 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المكافحة اذ بلغت 0.440 (وحدة/ملغ بروتين). وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل الثنائي بين الصنف والإصابة اذ اعطى الصنف شابيلا المصاب اعلى فعالية نوعية للأنزيم بلغت 1.301 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بالمصاب اذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم

تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم البولي فينول اوكسيديز Poly phenol oxidase وحدة /مل لثلاثة اصناف من الباقلاء توضح نتائج الجدول (6) وجود فروقات معنوية بين الإصابة من عدمها اذ اعطت النباتات المصابة بالفطر *R.solani* اعلى فعالية نوعية لأنزيم البولي فينول اوكسيديز Poly phenol oxidase بلغت 0.866 (وحدة/ملغ بروتين) مقارنة بغير المصابة اذ بلغت 0.775

مقارنة بمعاملة السيطرة إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم 0.393 و 0.446 و 0.300 (وحدة/ملغ بروتين) للأصناف الثلاثة، على التوالي. يلاحظ من خلال النتائج ان فعالية البولي فينول اوكسيديز Poly phenol oxidase بلغت اقصاها في النباتات المصابة والمكافحة بالمقاوم الحيوي *T.harzianum* وفي هذه الحالة يمكن تعزى اسبابها الى حث عوامل المقاومة للنبات بفعل المسبب المرضي من جهة وكذلك من قبل المقاومة الحيوية بالفطر *T.harzianum* من جهة اخرى (18). وبعد انزيم البولي فينول اوكسيديز Poly phenol oxidase احد انزيمات الأوكسدة والأختزال الذي يشترك في تأكسد الـ polyphenol وبناء اللكتين في خلايا النبات خلال غزو مسببات المرضية ويشترك في استجابة النبات للأصابة من خلال تفاعلات الدفاع، وفطر الحساسية، عن طريق استحثاث المقاومة ضد مسببات المرضية، وان زيادة الفعالية الأنزيمية للنباتات السليمة والتي تمت معاملتها بفطر المقاومة الأحيائي *T.harzianum* دلالة على استحثاث المقاومة إذ كانت الفعالية الأنزيمية للنباتات السليمة المعاملة بالفطر الأحيائي اعلى مما هو عليه في النباتات السليمة غير المعاملة بالفطر الأحيائي وهذا يؤكد استحثاث المقاومة في النباتات المصابة والمكافحة بفطر المقاومة الأحيائي *T.harzianum*. وهذه النتائج تتفق مع (24) إذ لاحظ في مستخلص الجذور المعاملة بالمقاوم الحيوي *T.harzianum* لنبات الحمص زيادة فعالية انزيم Poly phenol oxidase واننتاج المواد المثبطة Chymotrypsin و Trypsin.

جدول (6) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم البولي فينول اوكسيديز Poly phenol oxidase وحدة /مل للمرحلة الثانية لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والاصابة	المكافحة		الاصابة	الصنف
	غير مكافح	مكافح		
0.653	0.604	0.701	مصاب	الصنف المحلي
1.25	0.446	2.053	غير مصاب	
1.301	0.441	2.163	مصاب	صنف شابيلا
0.563	0.393	0.733	غير مصاب	
0.646	0.456	0.836	مصاب	صنف برشلونة
0.512	0.300	0.724	غير مصاب	
تأثير الصنف				
0.950	0.525	1.376	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة
0.932	0.417	1.44	صنف شابيلا	
0.579	0.378	0.780	صنف برشلونة	
تأثير الاصابة				
0.866	0.501	1.233	مصاب	التداخل بين الاصابة والمكافحة
0.775	0.380	1.17	غير مصاب	
تأثير المكافحة				
	0.440	1.201		

التداخل الثلاثي	التداخل بين الاصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والاصابة	المكافحة	الاصابة	الصنف	LSD
0.063	0.041	0.043	0.043	0.034	0.034	0.022	5%

عدمها إذ كانت اعلى فعالية نوعية في النباتات المكافحة بالفطر *T.harzianum* بلغت 0.047 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بغير المكافحة إذ بلغت 0.029 (وحدة/ملغ بروتين)، وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل التثائي بين الصنف والإصابة إذ اعطى الصنف برشلونة المصاب اعلى فعالية نوعية للأنزيم بلغت 0.059

0.563 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاه الصنف المحلي غير المصاب بفعالية نوعية بلغت 1.25 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بالمصاب إذ بلغت فعالية الأنزيم النوعية 0.653 (وحدة/ملغ بروتين). إما عن تأثير التداخل بين الصنف والمكافحة فتبين نتائج الجدول وجود فروقات معنوية إذ اعطى الصنف شابيلا المكافح اعلى فعالية نوعية للأنزيم البولي فينول اوكسيديز Poly phenol oxidase بلغت 1.44 (وحدة/ملغ بروتين)، تلاه الصنف المحلي المكافح بفعالية نوعية بلغت 1.376 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بغير المكافح إذ بلغت فعالية الأنزيم 0.417 و 0.525 (وحدة/ملغ بروتين) للصنفين شابيلا والمحلي، على التوالي. ويبين الجدول وجود فروقات معنوية بين الأصابة والمكافحة إذ اعطت النباتات المصابة والمكافحة اعلى فعالية نوعية للأنزيم البولي فينول اوكسيديز Poly phenol oxidase بلغت 1.233 (وحدة/ملغ بروتين)، مقارنة بالمصابة غير المكافحة إذ بلغت 0.501 (وحدة/ملغ بروتين). اما فيما يخص التداخل الثلاثي بين الصنف والأصابة والمكافحة فتشير نتائج الجدول وجود فروقات معنوية إذ اعطى الصنف شابيلا المصاب المكافح اعلى فعالية نوعية للأنزيم البولي فينول اوكسيديز Poly phenol oxidase بلغت 2.163 (وحدة/ملغ بروتين)، وتلاها الصنف المحلي غير المصاب المكافح بفعالية نوعية بلغت 2.053 (وحدة/ملغ بروتين). ثم الصنف برشلونة المصاب المكافح بفعالية نوعية بلغت 0.836 (وحدة/ملغ بروتين)،

تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم Phenyl alanine ammonialyase وحدة / مل لثلاثة اصناف من الباقلاء تبين نتائج الجدول (7) عدم وجود فروقات معنوية بين الإصابة من عدمها، ويشير الجدول الى وجود فروقات معنوية بين المكافحة من

اقصاها في النباتات المصابة والمكافحة بالمقاوم الحيوي *T.harzianum* وفي هذه الحالة يمكن تعزى اسبابها الى حث عوامل المقاومة للنبات بفعل المسبب المرضي من جهة وكذلك من قبل المقاومة الحيوية بالفطر *T.harzianum* من جهة اخرى، تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه (25) اذ بين ان المعاملة بالفطر arbuscular fungi (AM) كذلك ادى الى زيادة انزيم Phenyl alanine ammonialyase في عوائل نباتية مختلفة. ان سبب ارتفاع الفعالية الأنزيمية في النباتات المصابة بالفطر *R.solani* وغير المكافحة بفطر المقاومة الأحيائي كرد فعل للنبات لان النبات المصاب بالمرضات يحفز مقاومة النبات وهذه النتائج تتفق مع ما ذكرته دراسات سابقة اذ ان انزيم PAL يحفز التفاعل الذي يحول الفيناييل النين الى امونيا و tras-cinnamic acid ويشترك انزيم PAL في اول خطوات مسار phenyl propanoids لهذا يشترك في البناء الحيوي لمركبات الفينولات المتعددة مثل الفلافونويدات وال phenyl propanoids والكنين في النباتات. ويحث انتاج الأنزيم نتيجة الأصابات المرضية للنبات فضلا عن بعض الهرمونات (3). ولاحظ (24) في مستخلص الجذور المعاملة بالمقاوم الحيوي *T.harzianum* لنبات الحمص زيادة فعالية انزيم Phenyl alanine Chymotrypsin ammonia lyase وانتاج المواد المثبطة Trypsin وفظلا عن ذلك وجد بأن فعاليتها مرتبطة طرديا مع المقاومة المستحثة في العائل ضد المسببات المرضية خلال تعرضه لها ودورها في تخليق اللكنين والسوبرين والميلانين بأكسدة الفينولات وتحويلها الى مواد اكثر سمية للمسببات المرضي.

جدول (7) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر الممرض *R.s* في الفعالية النوعية لأنزيم Phenyl alanine ammonialyase

وحدة /مل لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف
	غير مكافح	مكافح		
0.038	0.029	0.047	مصاب	الصنف المحلي
0.034	0.027	0.042	غير مصاب	صنف شاييلا
0.029	0.026	0.032	مصاب	صنف برشلونة
0.030	0.025	0.036	غير مصاب	
0.059	0.044	0.074	مصاب	
0.040	0.026	0.055	غير مصاب	
تأثير الصنف				
0.036	0.028	0.044	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة
0.030	0.026	0.034	صنف شاييلا	
0.050	0.035	0.064	صنف برشلونة	
تأثير الإصابة				
0.042	0.033	0.051	مصاب	التداخل بين الإصابة والمكافحة
0.035	0.026	0.044	غير مصاب	
تأثير المكافحة				
	0.029	0.047		

التداخل الثلاثي	التداخل بين الإصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة	الإصابة	الصنف	LSD
0.030	0.018	0.021	0.021	0.012	n.s	0.015	5%

المكافحة اذ بلغت 9.20 ملغ/غم نسيج .اما فيما يخص التداخل الثلاثي بين الصنف والأصابة والمكافحة فتشير نتائج الجدول وجود فروقات معنوية اذ اعطى الصنف المحلي المصاب والمكافح بفطر المقاومة الحيوية *T.harzianum* أعلى محتوى من الفينولات الكلية بلغ 19.22 ملغ /غم نسيج تلاه غير المصاب المكافح بمحتوى فينولات بلغ 13.53 ملغ /غم نسيج ثم الصنف شاببلا المصاب المكافح اذ بلغ محتوى الفينولات 12.89 ملغ/غم نسيج , مقارنة بمعاملة السيطرة اذ بلغت الفينولات الكلية 7.07 و 5.28 ملغ/غم نسيج للصنفين , على التوالي,, ان سبب ارتفاع الفينولات الكلية في النباتات المصابة وغير المكافحة بفطر المقاومة الأحيائي *T.harzianum* قد يعزى الى ان المسبب المرضي *R.solani* يعمل على تحفيز بعض الجينات التي كانت سابتة وبالتالي تنتج كمية من الفينولات أكثر او هو رد فعل للنبات نتيجة كاستجابة أولية لغزو المسببات المرضية ومن خلال النتائج تبين ان الفينولات الكلية كانت اقصاها في النباتات المصابة والمكافحة بفطر المقاومة الحيوية *T.harzianum* وهذه الحالة يمكن ان تعزى اسبابها الى حث النبات على تكوين هذه المركبات بفعل المسبب المرضي *R.solani* من جهة وكذلك من قبل المقاوم الحيوي *T.harzianum* من جهة اخرى وتتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه (3) اذ بينت ان زيادة تراكم المركبات الفينولية في نبات الطماطة المصاب بالفطر *F.oxysporum* ربما يعكس او يظهر دفاعات عديدة .واشارات فعالة نتيجة الأستحثات بالمعاملة بفطريات المايكورايزا.

جدول(8) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر المرضي *R.s* في الفينولات الكلية (ملغ/غم نسيج) للمرحلة الثانية

لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف			
	غير مكافح	مكافح					
15.42	11.61	19.22	مصاب	الصنف المحلي			
10.30	7.07	13.53	غير مصاب				
11.36	9.83	12.89	مصاب	صنف شاببلا			
7.12	5.28	8.97	غير مصاب				
6.65	6.17	7.12	مصاب	صنف برشلونة			
4.86	3.84	5.89	غير مصاب				
تأثير الصنف							
12.86	9.34	16.37	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة			
9.24	7.56	10.93	صنف شاببلا				
5.76	5.00	6.51	صنف برشلونة				
تأثير الإصابة							
11.14	9.20	13.08	مصاب	التداخل بين الإصابة والمكافحة			
7.43	5.40	9.46	غير مصاب				
7.30			11.27	تأثير المكافحة			
التداخل الثلاثي	التداخل بين الإصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة	الإصابة	الصنف	LSD
7.9	4.56	5.58	5.58	3.22	3.22	3.94	5%

معنوية بين الإصابة من عدمها اذ اعطت النباتات المصابة بالفطر *R.solani* اعلى نسبة مئوية للخلايا الميتة بلغت 49.68, مقارنة بغير المصابة اذ بلغت النسبة المئوية للخلايا الميتة 3.34. ويوضح الجدول وجود فروق معنوية بين المكافحة من عدمها اذ اعطت النباتات غير

تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T.harzianum* والفطر المرضي *R.s* في الفينولات الكلية (ملغ/غم نسيج) للمرحلة الثانية لثلاثة اصناف من الباقلاء

تبين نتائج الجدول(8) وجود فروقات معنوية بين الإصابة من عدمها اذ اعطت النباتات المصابة اعلى محتوى من الفينولات الكلية بلغ 11.14 ملغ/غم نسيج مقارنة بغير المصابة اذ بلغت 7.43 ملغ/غم نسيج, ووضح الجدول وجود فروقات معنوية بين المكافحة من عدمها اذ كانت اعلى قيمة للفينولات الكلية في النباتات المكافحة بلغت 11.27 ملغ /غم نسيج, مقارنة بغير المكافحة اذ بلغت 7.30 ملغ/غم نسيج , وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل الثنائي بين الصنف والإصابة إذ أعطى الصنف المحلي المصاب اعلى محتوى من الفينولات بلغ 15.42 ملغ /غم نسيج , وتلاه الصنف شاببلا المصاب اذ بلغ محتوى الفينولات 11.36 ملغ/غم نسيج , مقارنة بغير المصاب اذ بلغ محتوى الفينولات الكلي 10.30 و 7.12 ملغ/غم نسيج , إما عن تأثير التداخل بين الصنف والمكافحة فتبين نتائج الجدول وجود فروقات معنوية إذ أعطى الصنف المحلي المكافح أعلى محتوى من الفينولات بلغ 16.37 ملغ/غم نسيج وتلاه الصنف شاببلا المكافح اذ بلغ محتوى الفينولات فيه 10.93 ملغ /غم نسيج, مقارنة بغير المكافح اذ بلغ محتوى الفينولات الكلي 9.34 و 7.56 ملغ/غم نسيج للصنفين , على التوالي,, ويشير الجدول الى وجود فروقات معنوية للتداخل بين الأصابة والمكافحة اذ اعطت النباتات المصابة والمكافحة اعلى قيمة للفينولات الكلية بلغت 13.08 ملغ/غم نسيج , مقارنة بالمصابة غير

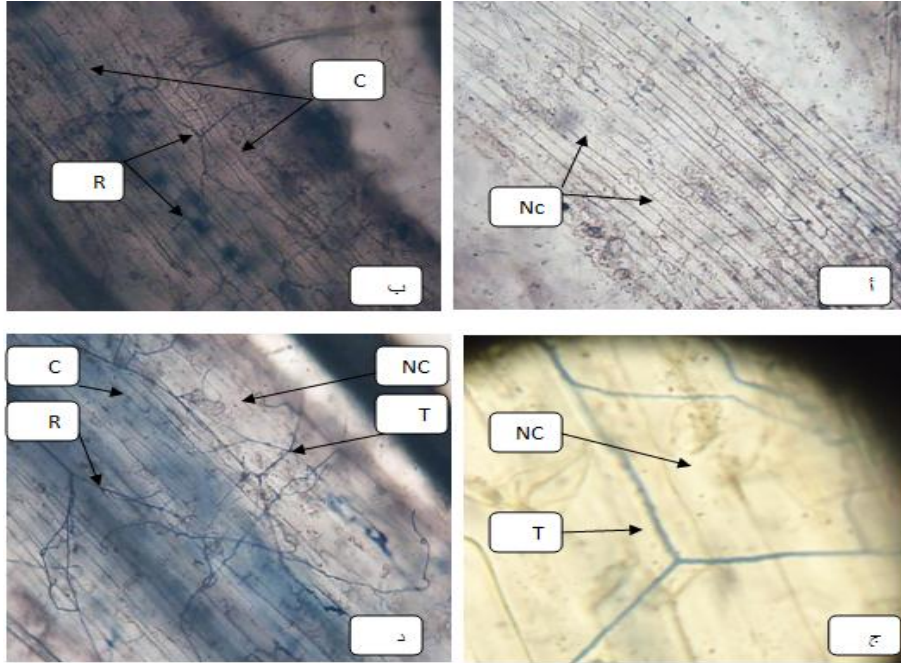
تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر المرضي *R.s* في النسبة المئوية للخلايا الميتة لثلاثة اصناف من الباقلاء : يلاحظ من نتائج الجدول(9) عدم جود فروقات معنوية بين الأصناف الثلاثة لنبات الباقلاء . وتبين نتائج الجدول وجود فروقات

تبيين الصورة (أ) معاملة السيطرة والتي لم يشاهد فيها هايفات الفطر كما ان معظم خلاياه سليمة، اما الصورة (ب) فيظهر معاملة الفطر الممرض مبينا هايفاته منتشرة في خلايا الجذر واصطباغ الخلايا وهو دليل موثقا، كما تبين الصورة (ج) معاملة فطر المقاومة الاحيائي *T.harzianum* مبينا انتشار هايفاته في المقطع مع عدم اصطباغ الخلايا وهو دليل عدم نأثر الخلايا بهذا الفطر في حين تبين الصورة (د) معاملي الفطرين معا وانتشار هايفات كلا الفطرين مع وجود نوعين من الخلايا المصطبغة وغير المصطبغة وهو دليل اختزال تأثير الفطر الممرض من قبل فطر المقاومة الاحيائي. ويلاحظ من الصور (3) مقاطع جذور نبات الباقلاء المعاملة بفطري المقاومة الاحيائي *T.harzianum* والممرض *R.solani* التفاف خيوط *T.harzianum* حول خيط *R.solani* وهي احدى اليات الفطر *T.harzianum* التي تعرف بالتطفل الفطري.

ان زيادة النسبة المئوية للخلايا الميتة يعتبر مؤشر على امراضية المسبب المرضي اذ يؤثر المسبب المرضي بأشكال متعددة ضد النبات ومن هذه الأشكال زيادة موت الخلايا وكلما زادت نسبة موت الخلايا مؤشر على ضراوة المسبب المرضي وبموجب نتائج هذه الدراسة الفطر *T. harzianum* خفض من نسبة الخلايا وهذا دليل على كفاءة الفطر في تقليل شدة الأصابة واختزال في تأثيرات المسبب المرضي. ان النسبة المئوية للخلايا الميتة بوجود الفطر الممرض *R.solani* فقط ارتفعت نتيجة لاستمرار الفطر الممرض بهاجمة النبات وما يسببه من اضرار للنبات. في حين اختزلت اعداد الخلايا الميتة نتيجة لنمو الفطر الاحيائي *T.harzianum* وانتشاره وزيادة حث مقاومة النبات.

جدول (9) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر الممرض *R.s* في النسبة المئوية للخلايا الميتة للمرحلة الثانية من عمر النبات لثلاثة اصناف من الباقلاء

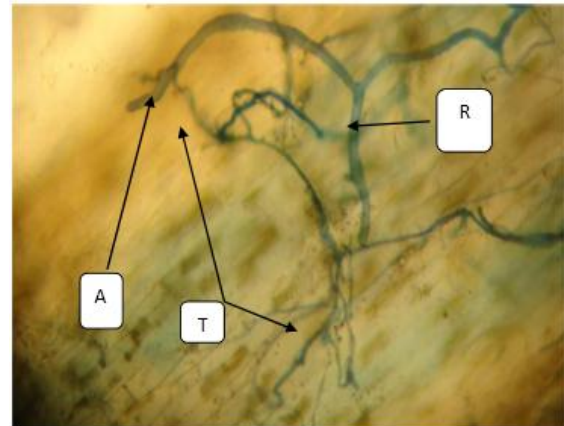
التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف			
	غير مكافح	مكافح					
47.7	75.3	20.07	مصاب	الصنف المحلي			
2.02	4.03	0.0	غير مصاب				
50.0	70.0	30.0	مصاب	صنف شابيلا			
3.05	4.27	1.8	غير مصاب				
51.3	58.3	44.3	مصاب	صنف برشلونة			
2.97	2.8	3.10	غير مصاب				
تأثير الصنف							
24.86	39.6	10.03	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة			
26.53	37.13	15.9	صنف شابيلا				
27.15	30.5	23.72	صنف برشلونة				
تأثير الإصابة							
49.68	67.8	31.47	مصاب	التداخل بين الإصابة والمكافحة			
2.67	3.7	1.64	غير مصاب				
تأثير المكافحة							
	35.8	16.56					
التداخل الثلاثي	التداخل بين الإصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة	الإصابة	الصنف	LSD
6.2	3.6	4.4	4.4	2.6	2.6	n.s	5%



الصور (2) مقاطع جذور نبات الباقلاء المعاملة وغير المعاملة بفطري المقاومة الاحيائي *T.harzianum* والممرض *R.solani* بقوة 10x
أ. معاملة السيطرة (بدون وجود الفطريات) - ب. معاملة الفطر *R.solani* (وجود هايفات الفطر مع تلون الخلايا) - ج. معاملة الفطر
T.harzianum (وجود الهايفات مع عدم تلون الجذور) - د. معاملة الفطرين المقاومة الاحيائي *T.harzianum* والممرض *R.solani* خلايا
مصطبغة ، Nc = خلايا غير مصطبغة ، (T = هايفات الفطر *T.harzianum* ، R = هايفات الفطر *R.solani*)

التثائي بين الصنف والإصابة إذ اعطى الصنف شايبلا المصاب اعلى شدة اصابة بلغت 37.17% وتلاها الصنف برشلونة إذ بلغت شدة الأصابة 33.3%. إما عن تأثير التداخل بين الصنف والمكافحة فتوضح نتائج الجدول (10) الى وجود فروقات معنوية بين التداخل التثائي بين الأصابة والمكافحة إذ اعطت المعاملات المصابة غير مكافحة اعلى شدة اصابة بلغت 46.47% ، وفيما يخص التداخل الثلاثي بين الصنف والأصابة والمكافحة فتشير نتائج الجدول وجود فروقات معنوية عالية إذ اعطى الصنف شايبلا المصاب غيرمكافح اعلى شدة اصابة بلغت 50.67% وتلاها الصنف المحلي وصنف برشلونة بشدة اصابة بلغت 44.67% مقارنة بعدم تسجيل اي اصابة في معاملة فطر *T. harzianum* فضلا عن معاملة السيطرة. وهذه النتائج تتفق مع ماوجده (Larkin 26) وكذلك مع عدد من الباحثين إذ ذكر (27،28) ان انواع *Trichoderma* تعد من اكثر الأعداء الحيوية الواعدة في مقاومة الفطريات الممرضة وتمتلك العديد من الآليات تتضمن التطفل المباشر والتنافس على المواد الغذائية وزيادة جاهزية العناصر الغذائية وإنتاج انزيمات Chitinase و β glucanase-1,3 و β glucanase-1,4 والمضادات الحيوية فضلاً عن تثبيط انزيمات الفطريات الممرضة (22).

تتفق النتائج الحالية مع ما توصل اليه (29) الذي بين استخدام المقاوم الحيوي *T.harzianum* في معاملة بذور الحمص ادى الى مقاومة مرض الذبول الفيوزاري وخفض معنوي في نسبة المرض وشده. وتمتلك الأعداء الحيوية القدرة على تحليل هايفات المسبب المرضي بأنزيمات محللة مثل الكايتينييز Chitinase و Protase و



الصور (3) مقاطع جذور نبات الباقلاء المعاملة بفطري المقاومة الاحيائي *T.harzianum* والممرض *R.solani* بقوة 40x

$A = T.harzianum = T - R.solani = R$ = النغاف خيوط *T.harzianum* حول خيط *R.solani* وهي احدى البات الفطر التي تعرف بالتطفل الفطري

تأثير المكافحة الحيوية بأستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر الممرض *R.s* في شدة الأصابة (%) لثلاثة اصناف من الباقلاء تبين نتائج الجدول (10) تأثير المكافحة الحيوية بأستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر الممرض *R.s* في النسبة المئوية لشدة الأصابة لثلاثة اصناف من الباقلاء عدم جود فروقات معنوية بين الأصناف الثلاثة لنبات الباقلاء كما بينت نتائج الجدول وجود فروقات معنوية بين الإصابة من عدمها اذا اعطت النباتات المصابة اعلى شدة اصابة بلغت 33.32% . ويشير الجدول الى وجود فروق معنوية بين المكافحة من عدمها إذ اعطت النباتات الغير مكافحة اعلى شدة اصابة بلغت 23.33% وتبين النتائج وجود فروقات معنوية للتداخل

التحلل المائي وهي Endo- و Exo-gulacturonase
polygulacturonase التي ينتجها الفطر *Botrytis cinerea*
المسبب للعفن الرمادي مما ينتج عنه خفض في شدة الإصابة
بالمرض.

β -glucanase 1,3- حيث تعمل على تحليل الجدران الخلوية وتنشيط
نمو الغزل الفطري وإنبات ابواغ الفطريات الممرضة كما تمتلك القدرة
على انتاج انزيمات Protases التي تعمل على تحليل الأغشية
والجدران الخلوية للفطريات الممرضة وتعمل على تنشيط نشاط انزيمات

جدول (10) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر الممرض *R.s* في شدة الإصابة لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف
	غير مكافح	مكافح		
0.29	0.44	0.14	مصاب	الصنف المحلي
0.0	0.0	0.0	غير مصاب	صنف شاييلا
0.37	0.50	0.23	مصاب	صنف برشلونة
0.0	0.0	0.0	غير مصاب	
0.33	0.44	0.21	مصاب	تأثير الصنف
0.0	0.0	0.0	غير مصاب	
التداخل بين الصنف والمكافحة				
0.14	0.22	0.07	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة
0.18	0.25	0.11	صنف شاييلا	
0.16	0.22	0.10	صنف برشلونة	
التداخل بين الإصابة والمكافحة				
تأثير الإصابة				
0.33	0.46	0.19	مصاب	التداخل بين الإصابة والمكافحة
0.0	0.0	0.0	غير مصاب	
تأثير المكافحة				
	0.23	0.09		

والأصابة والمكافحة فتشير نتائج الجدول وجود فروقات معنوية إذ
اعطى الصنف برشلونة غير المصاب المكافح اعلى متوسط للوزن
الطري للحبوب إذ بلغ 193.9 غم وتلاه الصنف المحلي غير المصاب
المكافح بمتوسط بلغ 137.9 غم اما الصنف شاييلا المصاب غير
المكافح فقد اعطى اقل وزن للحبوب الطري بلغ 34.8 غم وتلاه
الصنف المحلي المصاب الغير مكافح بوزن طري بلغ 53.7 غم. ان
سبب تفوق اوزان الحبوب للنبات الواحد في النباتات غير المصابة
بالفطر *R. solani* والمعاملة بفطر المقاومة الأحيائي *T. harzianum*
قد يعزى الى قدرة هذا الفطر في تحفيز نمو النبات من
خلال قابليته على زيادة جاهزية العناصر او افرازه للهورمونات
النباتية. إذ بينت العديد من الدراسات ان الفطر ليس فقط مقاوم احيائي
وانما كمخصب حيوي Biofertilizer. (27) واثبتت نتائج هذه الدراسة
كفاءة الفطر *T. harzianum* في المكافحة الأحيائية إذ اختزل من
نسبة الإصابة (جدول 10) وشدة الإصابة (جدول 11) وحث مقاومة
النبات من خلال زيادة فعاليات انزيمات البيروكسيداز Peroxidase
والبيتاكلوكانيز β -1,3glucanase والكاييتينيز Chitinase وانزيم
Poly phenol oxidase وانزيم Phenyl alanine ammonia lyase
واختزال الخلايا الميتة , وعليه فأن جميع تلك الآليات (تحفز
نمو النبات ومقاومته للمرض) ادت الى زيادة حاصل النبات من
الحبوب في النباتات سواء كانت المصابة او غير المصابة مقارنة بتلك
التي لم تعامل بهذا الفطر ولكافة الأصناف المدروسة.

تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر
الممرض *R.s* في وزن الحبوب الطري (غم/ نبات) لثلاثة اصناف
من الباقلاء
يلاحظ من نتائج الجدول (11) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر
T. harzianum والفطر الممرض *R.s* في وزن الحبوب الطري (غم/
نبات) لثلاثة اصناف من الباقلاء جود فروقات معنوية بين الأصناف
الثلاثة لنبات الباقلاء اذا اعطى الصنف برشلونة اعلى متوسط لوزن
الحبوب الطري بلغ 149.8 غم وتلاه الصنف المحلي إذ بلغ وزن
الحبوب الطري 107 غم واعطى الصنف شاييلا اقل وزن للحبوب
الطري بلغ 60.5 غم وتشير نتائج الجدول الى وجود فروقات معنوية
بين الإصابة من عددها اذا اعطت النباتات غيرالمصابة اعلى متوسط
لوزن الحبوب الطري بلغ 129 غم. ويبين الجدول عدم وجود فروق
معنوية بين المكافحة من عددها وتبين النتائج وجود فروقات معنوية
للتداخل الثنائي بين الصنف والإصابة إذ اعطى الصنف برشلونة
غيرالمصاب اعلى متوسط لوزن الحبوب الطري إذ بلغ 182.9 غم
وتلاه الصنف المحلي غير المصاب بمتوسط بلغ 135.2 غم. إما عن
تأثير التداخل بين الصنف والمكافحة فتبين نتائج الجدول (20) وجود
فروقات معنوية فيما بينها إذ اعطى الصنف برشلونة المكافح اعلى
متوسط لوزن الحبوب الطري إذ بلغ 176.4 اما بالنسبة للتداخل الثنائي
بين الإصابة والمكافحة فيبين الجدول وجود فروقات معنوية إذ كان
متوسط الوزن الطري للحبوب اعلى في المعاملات المكافحة الغير
مصابة إذ بلغ 134.2 غم اما فيما يخص التداخل الثلاثي بين الصنف

جدول (11) تأثير المكافحة الحيوية باستخدام الفطر *T. harzianum* والفطر الممرض *R.s* في وزن الحبوب الطري (غم/ نبات) لثلاثة اصناف من الباقلاء

التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة		الإصابة	الصنف			
	غير مكافح	مكافح					
78.9	53.7	104	مصاب	الصنف المحلي			
135.2	132.5	137.9	غير مصاب				
51.8	34.8	68.9	مصاب	صنف شابيلا			
69.1	67.3	70.9	غير مصاب				
116.6	74.3	158.8	مصاب	صنف برشلونة			
182.9	172	193.9	غير مصاب				
تأثير الصنف							
107	93.1	121	الصنف المحلي	التداخل بين الصنف والمكافحة			
60.5	51.1	69.9	صنف شابيلا				
149.8	123.2	176.4	صنف برشلونة				
تأثير الإصابة							
82.4	54.3	110.6	مصاب	التداخل بين الإصابة والمكافحة			
129.1	124	134.2	غير مصاب				
تأثير المكافحة							
	89.1	122.4					
التداخل الثلاثي	التداخل بين الإصابة والمكافحة	التداخل بين الصنف والمكافحة	التداخل بين الصنف والإصابة	المكافحة	الإصابة	الصنف	LSD
84.4	48.7	59.7	59.7	n.s	34.4	42.2	5%

المصادر

- Natalia, Gutierrez., C. M, Avila., M. T, Moreno., and A.M, Torres, 2008. Development of SCA Rmarkers linked to zt-2, one of the genes controlling absence oftannins in faba bean, Australian Journal of Agricultural Research, 59, pp 62–68.
- Montealeger, J.; Valderrama, L.; Sanchez, S.; Herrera, R. Besoain, X.; Perez, L. (2010). Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoeswith *Trichoderma harzianum*mutants. Electronic J. Biotechnol.13(2),717-3458.
- El-khallal, S.M. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against Fusarium wilt disease by bioagent fungi(arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (Jasmonicacid &Salicylic acid): 2-Changes in the antioxidantenzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins.Australian Journal of Basic and AppliedSciences, 1(4):717-732.
- حسن,عبدالله عبد الكريم , الكرطاني, عبد الكريم عريبي, افتخار موسى, خلدون فارس, 2011. تقييم فعالية الفطر *Pleurotus* sp. كمبيد حيوي ضد ممرضاتالنبات:الديدان الثعبانية وفطريات الترية.المؤتمر العلمي الخامس,كلية الزراعة,جامعة تكريت,26_27 نيسان.
- Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Common. Mycol. Inst Surry,U.K. 237 PP.
- Domasch, K.H. Gams, W. and Anderson, T.H. 1980. Compendium ofsoil fungi. Vol.1 Academic press. London.
- Hammerschmidt.R.,Nuckles,Em.and Kuc,J.1982 Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to colletotrichum lagemarium. Physiology and plant pathology 20:73-82.
- Pan,S.Q.,X.S.Ye and J.Kuc.1991 Association of β -1,3 glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould intobacco induced by stem injection with pernospara tabacive or leaf in oculation with tobacco mosaic virus. physiol. Mol. plantpathol., 39:25-39.
- Tweddell,R.J.,S.H.Jabaji-Hare and P.M. charest , 1994. production of Chitinase and β -1,3 glucanase by stachy bortyseleyans, amycoparasite of *Rhizoctonia solani* Appl Environ. Microbiol., 60:489-495.
- Mayer, A.M., Harel, E. and Shaul, R.B. 1965. Assay of catechol oxidaseacritical comparison of methods phytochemistry 5:783-789.
- Assis, J.S., R. Maldonado, T. Munoz, M.I. Escribano and C. Merodio, 2001. Effect of high carbon dioxide concentration onPAL activity and Phenolic contents in ripening cherimoya fruit. Postharvest Bio. Techmol., 23:33-39.
- Cooper, C. (1977). The Tools of Biochemistry. John Wily and Sons Inc. USA.
- Mahadevan, A. and Sridhar, R.1986. Methods in physiological plantpathology. Sivakami publications, Indira nagar, India.
- Mckinney, H. H. 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. J.Agric. Res. 26: 195-217.
- Bell, D, K.; Wells, H.D.; Markham. C.R. 1982. The in vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal. Plan. Pathol. Phytopathol. 72-382-379.
- Ibraheem, B.Y. 2009. Induced biotypes from the fungus *Trichoderma*types to improve biocontrol and enhancement plant growth parameters. Ph.D. Thesis. College of Agriculture and Forestry,Mosul Univ., Iraq
- Verma, M.; S.K. Brar; R.D. Tyagi; R.Y. Surampalli and J.R. Valero. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.; Panoply of biological Control .Biochemical Engineering Journal 37:1-20.

18. Howell, C.R. 2002. Cotton seedling preemergence damping - off by *Rhizoctonia oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.
19. Hibar, K.; M. Daami and M.El Mahjoud (2007). Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis lycopersici* by *Trichoderma* spp.. *Tunisian J. Plant protect.*2:47-58.
20. Dubos C and C. Plomion C.2011. Drought differentially affects expression of PR-10 protein in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* L.) seedling: *J Exp. bot.*52:1143-4.
21. Cota, I.E., R. Troncaso- Rojas. R. Sotelo -Mundo, A. Sanchez - Estrada and M.E. Tiznado - Hernandez, 2007. Chitinase and β -1,3 - glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Scientia Horticulturae.*, 112:42-50.
22. Viterbo, A.; Inbar, J.; Hadar, Y.; Chet, I. 2007. "Plant Disease Biocontrol and Induced Resistance via Fungal Mycoparasites." In: *Environment and Microbial Relationships* 2nd ed. The Mycota IV. (eds. C.P. Kubicek and I.S. Druzhinina) Springer- Verlag Berlin Heidelberg, pp.127-146.
23. Lorito, M.; Harman, G.E.; Hayes, C.K.; Broadway, R.M.; Tronsmo, A.; Woo, S.L. and Dipietro, A.1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitinase. *Phytopathology* 83:302-307.
24. Jayalakshmi, S.K; Raju; S.; Usha Ra, S. ni; Benagi, V.I.; Sreeramulu, D. K. (2009). *Trichoderma harzianum* L1 as potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against with disease caused 3, 44-52.
25. Zheng, H.Z., C.I. Cui, Y.T. Zharg, D. wary, Yu. Jing and Y.K. Kum, 2005. Active changes of lignifications – related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *J. Zhejiang Uni Sci.*, 6B(8):778-786.
26. Larkin, R. P .2004 . Development of integrated biological and cultural approaches for control of Powdery Scab and other soil borne disease. USDA, ARS, New England Plant, soil, and water lab Uni. of Maine, Orone.
27. Harman, G. E .2000 . The myths and dogmas of biocontrol Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* strain T – 22. *Plant. Dis.* 84 : 377 – 393.
28. Yigit, F.; Dikilitas, M. 2007. Control of Fusarium wilt of tomato by combination of fluorescent *Pseudomonas*, Non - pathogen *Fusarium* and *Trichoderma harzianum* T22 in greenhouse conditions, *Plant Pathology*, 6, 159-163.
29. Moradi, H.; Bahman, B.; Jahanshir, A.; Kavch, H.A. 2012. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. *Omics J. POJ.* 5, 68-74.

Isolation and identification of fungi associated with root rot disease in broad bean caused by *Rhizoctonia solani* (Kuhn) and select the disease suppresser species as biological control agents

2. Induced resistance markers by *Trichoderma harzianum* and their relationship with the disease and the plant productivity

Abdullah Abdulkareem Hassan , Maareb Ahmed Awad

Plant protection Department , Agriculture College , Tikrit University , Tikrit , Iraq

Email: Abdullah_has67@yahoo.com

Abstract

The antagonism ability of the 15 species of fungi associated with root rot disease against the pathogen *R. solani* showed the growth of fungus *T. harzianum* was faster than the pathogen *R. s* which cover all area of the petri plate with the antagonism degree 1.33. A field experiment was carried out in 2011/2012 in Agriculture College / Tikrit University for the test of the induction of a systemic resistance by *T. harzianum* against root rot disease caused by *R. s* in three cultivars of broad bean. Shabila cultivar infected with *R. s* and treated with *T. harzianum* gave maximum seeds germination (98.67%) compared with 67.67% in the infected and untreated plants. Maximum specific activity of Peroxidase was 10.9 unit/mg protein recorded in the infected and treated (with *T. harzianum*) local cultivar, while maximum specific activity of β -1,3glucanase was 0.289 unit/mg protein recorded in the uninfected and treated local cultivar, in the infected and treated Barshlona cultivar, maximum specific activities of Chitinase and Phenyl alanine ammoniolyase were 0.074 and 2.089 unit/mg protein, while maximum specific activity of Poly phenol oxidase was 2.163 unit/mg protein recorded in the infected and treated Shabila cultivar. Maximum total phenols was 19.22 mg/g tissue recorded in the infected and treated local cultivar. *T. harzianum* reduce the percentage of dead cells from 75.3, 70.0 and 58.3% in the infected local, Shabila and Barshlona cultivars to 20.07, 30.0 and 44.4% in the infected and treated these cultivars, respectively. In addition, *T. h* reduced the percentage of disease severity from 44.67, 50.67 and 44.67% in the infected local, Shabila and Barshlona cultivars to 14.3, 23.67 and 21.93% in the infected and treated these cultivars, respectively, while the productivity of these infected cultivars increased from 53.7, 34.8 and 74.3 g of fresh seeds to 104.68 and 158.8 g of fresh seeds when treated with *T. harzianum*.

Keywords: root rot disease, broad bean , Induced resistance markers , biological control , *Rhizoctonia solani* , *Trichoderma harzianum* .