

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

¹Ahmed A. Alnuaimy, ²Jawad K. Aljanabi, and ¹Mustafa A. manshod

¹College 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 28×10^4 and 48×10^4 in FOL3 and FOL4 respectively and to 8×10^4 , 12×10^4 and 16×10^4 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 6×10^4 and 13×10^4 in FOL4 and FOL5 respectively compared with untreated one 36×10^4 and 24×10^4 respectively. Then to 12×10^4 , 8×10^4 and 8×10^4 in FOL1, FOL2 and FOL3 respectively compared with that in untreated isolates (28×10^4 , 24×10^4 and 28×10^4) 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 نمو 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 بابل²

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 (FOL1 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5) اختلفت فيما بينها بلون مستعمراتها وفي معدلات نموها وفي امراضيتها. وسببت رواشح عزلات الفطر الممرض (FOL2, FOL3, FOL4) تركيز 25% بقعا صفراء الى بنية على اوراق الطماطة بعد 7 ايام من تلقحها 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 ثبت بالكامل انبات الأبواغ الكبيرة لعزلات الفطر FOL في حين كانت نسبة الانبات في المعاملات (بدون مضاد حيوي) FOL4 و FOL1 و FOL2 و FOL5 و FOL3 هي 78 و 70 و 66 و 55 و 53% على التوالي. أما بالنسبة للأبواغ الصغيرة للعزلات (FOL1 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5) فقد انخفضت فيها نسبة الانبات بوجود المضاد الحيوي الى 16 و 8 و 8 و 2 و 11% على التوالي مقارنة بمعاملات السيطرة (نمو ابواغ الفطر بدون مضاد حيوي) التي وصلت فيها نسبة الانبات الى 77 و 83 و 71 و 92 و 85% على التوالي. ان إنتاج الأبواغ الكبيرة لعزلات الفطر FOL قد ثبت تماما بوجود عامل المقاومة الحيوية ، أما عند نمو عزلات الفطر FOL لوحدها فقد وصل التجرثم الى ذروته في العزلتين FOL3 و FOL4 (48×10^4 و 28×10^4) على التوالي، تلتها باقي العزلات (FOL1 و FOL2 و FOL5) التي كانت فيها اعداد الأبواغ الكبيرة (8×10^4 و 12×10^4 و 16×10^4) على التوالي. في حين انخفضت اعداد الأبواغ الصغيرة الى النصف تقريبا مقارنة مع معاملة السيطرة ، حيث بلغت في المعاملتين T×FOL4 و T×FOL5 (16×10^4 و 13×10^4) على التوالي مقارنة بنظيراتها بمعاملة السيطرة (36×10^4 و 24×10^4) ، تلتها المعاملات T×FOL1 و T×FOL2 و T×FOL3 (12×10^4 و 8×10^4 و 8×10^4) على التوالي مقارنة بمعاملات المقارنة للعزلات المناظرة (28×10^4 و 24×10^4 و 28×10^4) على التوالي. نستنتج من الدراسة الحالية ان الراشح الأيضي لفطر التضاد *T. harzianum* له تأثير تثبيطي كبير على حيوية الأبواغ وتجرثم الفطر الممرض *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*

(Kivang و Kuguk، 2002)، ومن هذه الآليات 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 وتجراثم الفطر *F.o.f. 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 فتحة 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 هايبيكلورات 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*

شخص الجنس *Fusarium* لأول مرة من قبل العالم Link عام 1809 اذ يعد أحد اهم الاجناس الفطرية المهمة صحياً واقتصادياً حيث يضم العديد من الانواع الممرضة للإنسان والحيوان والنبات، ولبعض انواعه القدرة على انتاج العديد من السموم الفطرية مثل Zearalenone و Moniliformin و Fusaproliferin. (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 (Borrero et al., 2011 ; Rai 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 البايولوجية 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 وبآليات مختلفة

تم الحصول على العزلة الفطرية *T. harzianum* من مختبر الفطريات المتقدم في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل. الخصائص التشخيصية المظهرية والمجهريّة لعزلات الفطر

FOL

لدراسة الخصائص المظهرية والمجهريّة لعزلات الفطر *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* اعتمدت طريقة (Summerell et al., 2003). نمت عزلات الفطر FOL 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 FOL الى منتصف اطباق البتري. حضنت الاطباق على درجة حرارة 25 ± 2 °م لمدة خمسة ايام بعدها فحصت التغيرات المظهرية على المزارع الفطرية خاصة لون المزرعة وحوافها وتطور الصبغة، سجلت الخصائص المجهريّة 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 2 و 4 و 6 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 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5).

ولغرض حفظ عزلات الفطر FOL وفطر المكافحة الاحيائي *T. harzianum* تم صب 20 مل من الوسط PDA المعقم في أنابيب اختبار حجم 50 مل ، ثم تركت الأنابيب مائلة حتى تصلب الوسط الغذائي ثم لقت كل منها بقرص قطره 0.5 سم أخذت من حافة مستعمرات عزلات الفطر FOL النامية على الوسط الغذائي PDA بعمر 4 أيام بينما لقت 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 هايوكلورات 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 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5) 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 المرض. تم حساب نسبة إنبات بذور الطماطة بعد مرور 6 أيام من الحضان 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 لقت كل منها بثلاثة أقراص قطر (0.5) سم ولكل من العزلات FOL1 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5 فضلاً عن الفطر *T. harzianum* النامية على الوسط P.D.A بعمر 5 أيام كلاً على افراد كذلك لقت دوارق اخرى بالفطر المرض FOL وفطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* كلاً على حدة وبففس الطريقة السابقة ثم اغلقت الدوارق بأحكام ولفت بالشريط اللاصق منعاً 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 جيداً 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

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 ± 2 م في الظلام و pH الوسط 7 قيست نسبة الانبات مباشرة تحت المجهر بعد 24 ساعة من الحضان باستخدام المجهر المركب ، اذ تم عد عشر أبواغ كونيديية بصوره عشوائية لكل حقل ميكروسكوبي ولكلا الأبواغ الكبيرة والصغيرة وبواقع خمس حقول لكل مكرر. عدت الأبواغ نابثة 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 المعاملة 9-أ . تم تنمية عزلات الفطر FOL بنفس الخطوات السابقة وحضنت الاطباق على درجة حرارة 28 ± 2 م ولمدة سبعة ايام بعدها اضيف 10 مل من الماء المقطر المعقم لكل طبق لغرض جمع أبواغ العزلات الفطرية باستخدام 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 التعشبية CRD وبثلاث مكررات لكل معاملة وحلت 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 اعتماداً على خصائصها المظهرية والمجهرية هي (FOL1 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5) أذ تباينت هذه العزلات في كثافة

المقارنة حيث اضيف الى الاوراق الماء المعقم فقط وكلاً على حدة وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 م 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 الفيوزارييم (FOL1 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5) بأعتماد طريقة الزرع المزدوج (Ligocka et al., 2002) حضر الوسط الغذائي PDA المعقم وصب في أطباق بتري ، لفتح 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 لفتح 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 عذلة، حضنت الاطباق على درجة حرارة 25 ± 2 م ولمدة اربع ايام ، 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.

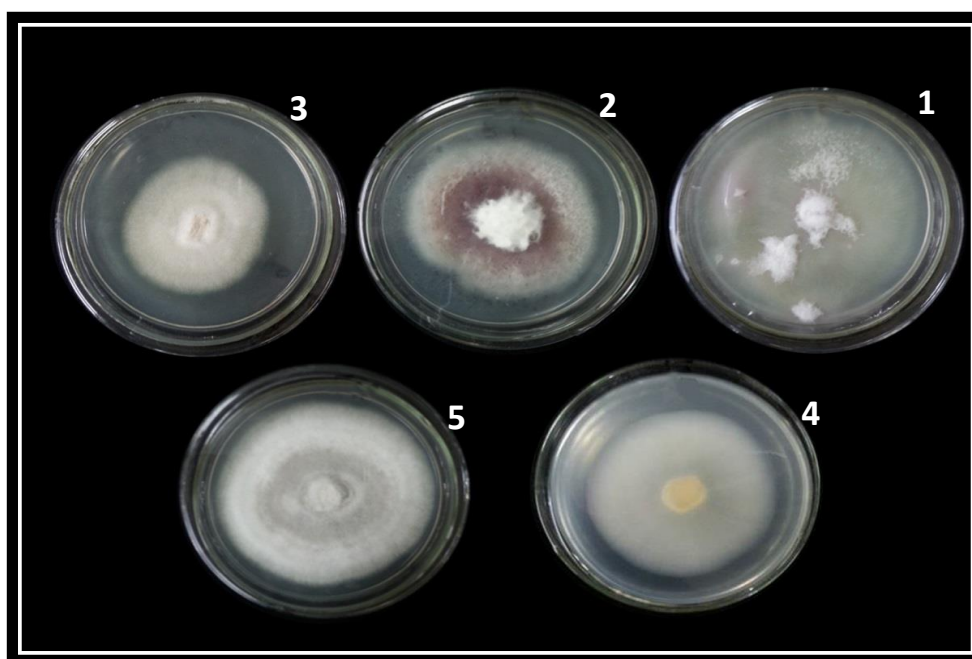
تأثير الراشح الايضي للفطر *T. harzianum* في نمو وتجرثم عزلات الفطر FOL على :

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 (Culture Medium) poisoned technique 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

عزلات الفطر FOL في معدلات النمو أذ توقفت العزلة FOL1 معنوياً طيلة مدة التجربة مقارنة بنمو العزلات الأخرى أذ وصل نمو هذه العزلة إلى 3.1 سم بعد 2 يوم من التلقيح ، 5.4 سم بعد اربع ايام وصل النمو إلى 100% من مساحة الطبق بعد 6 ايام من التلقيح تلتها العزلة FOL5 (2.7 و 5 و 8.3 سم) بعد (2 و 4 و 6 يوم) على التوالي في حين كانت معدلات النمو للعزلة FOL3 هي الأقل معنوياً بعد اليوم الثاني 1.6 سم واليوم السادس 5.7 سم من التجربة. أما العزلتين (FOL2 و FOL4) فلم تختلفا معنوياً بعد اليوم الثاني من التجربة (2.2 و 2.3 سم) على التوالي كذلك بعد اليوم السادس (7.1 و 7 سم) على التوالي.

الغزل الفطري وفي الوان المستعمرات التي تراوحت من الابيض الى الوردى والبنفسجي ، كذلك لون المستعمرات من الجهة الخلفية للمستعمرات التي تراوحت من الوردى او البنفسجي الى البني (صورة 1)، أما الصفات المجهرية للعزلات الفطرية فقد تمثلت بإنتاج الكونيديا الكبيرة Macro conidia الهلالية الشكل والكونيديا الصغيرة Micro conidia ذات الشكل البيضوي الى الكروي وإنتاج الكونيديا الحرشفية التي تنتج بشكل مفرد أو تجمعات أو سلاسل صغيرة، ومن الملاحظ أن إنتاج الكونيديا الصغيرة كان مميزاً في جميع العزلات ، وجميعها لها القدرة على إنتاج كونيديا صغيرة لكن إنتاجها للكونيديا الكبيرة وكذلك الوسائد sporodochium كان متبايناً، كما بينت نتائج (جدول 1) اختلاف



صورة (1). مستعمرات عزلات الفطر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL1 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5) النامية على الوسط الغذائي PDA بدرجة حرارة 25 ± 2 و لمدة 6 ايام

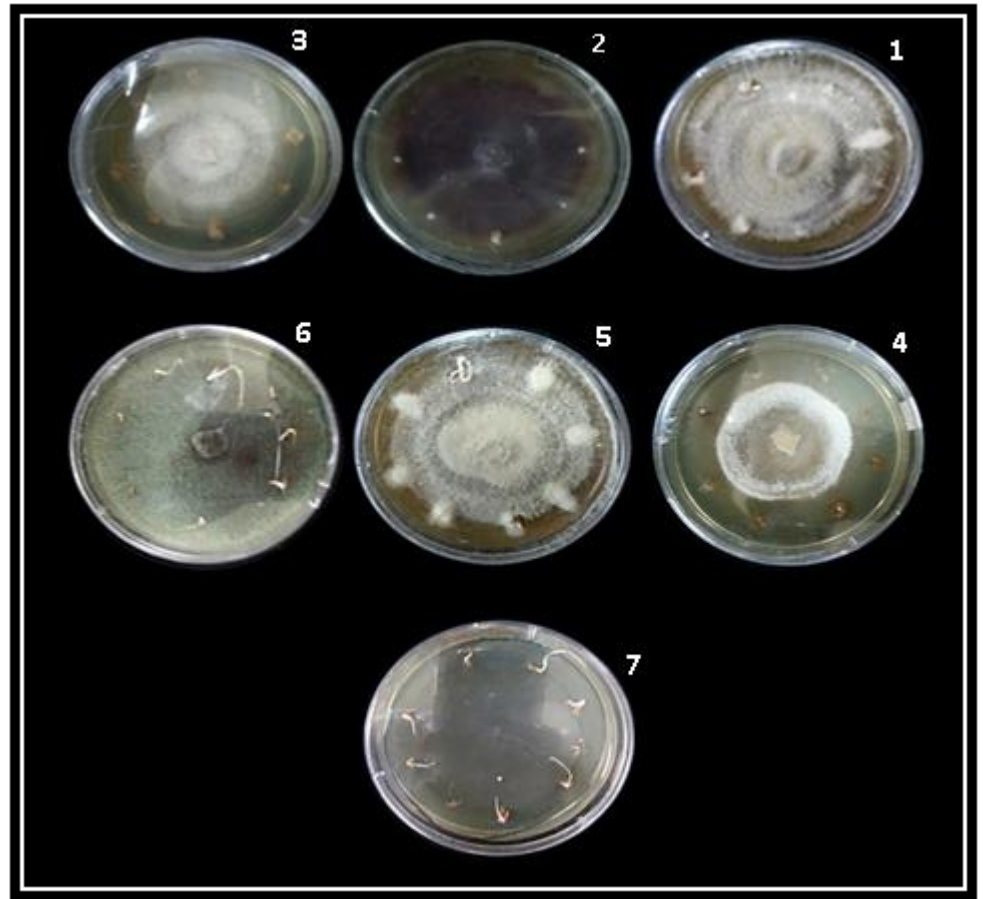
جدول (1). النمو القطري لعزلات الفطر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL1 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5) النامية على الوسط الغذائي PDA بدرجة حرارة 25 ± 2 و لمدة 6 ايام

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

القابلية المرضية لعزلات الفطر FOL

الممرض قد يفرز مركب أو أكثر من مركبات كاربوهيدراتية وأنزيمات البيروكسيداز والأحماض الدهنية والأمينية أو 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 كيميائية 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).

اظهرت النتائج (الصورة 2) ان العزلات الثلاث (FOL2 وFOL3 وFOL4) اعطت نسبة تعفن للبذور 100% لبذور 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 خففت 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



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

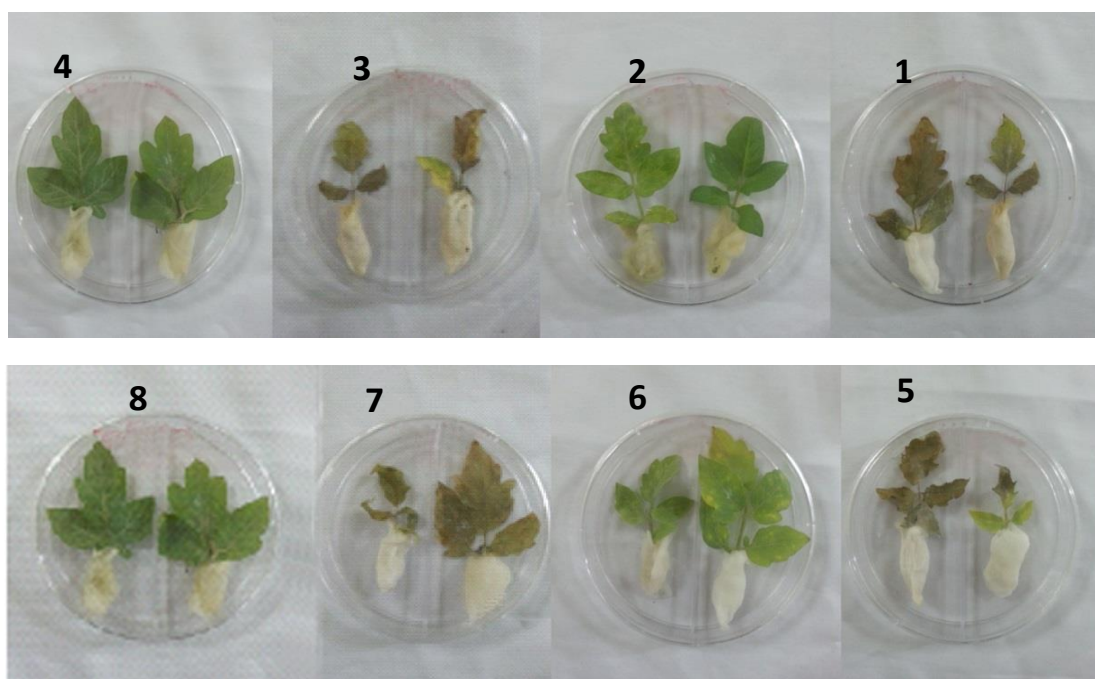
جدول (2). تأثير عزلات الفطر *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* على النسبة المئوية لإنبات بذور الطماطة

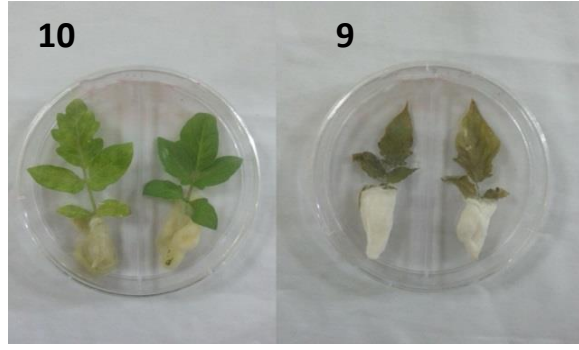
نسبة الانبات	الفطر
20%	FOL1
0%	FOL2
0%	FOL3
0%	FOL4
20%	FOL5
90%	T.h
90%	Control
13.45	LSD .05

وفي المقابل فإن 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 و β -1-3-glucanase و Xylanase ، Cellulase ، Proteases وان هذه الإنزيمات تحلل الكايتين والكلوكان والبروتينات المكون لجدار الخارجي للخيوط الفطرية في بيئة المسبب المرضي (Chełkowski *et al.*, 2004; Champeil *et al.*, 2012). كذلك إفرازه العديد من المضادات مثل Trichodermin و Trichodermol و Emodin Chrysophancol و Pachybasin و Gliotoxin التي تعمل على تحليل الخيط الفطري للفطر الممرض (Kivang, 2002).

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 بالتبيس والانكماش لكل من العزلات (FOL4, FOL3, FOL2) (صورة 3)، اما بالنسبة للعزلتين (FOL5 و FOL1) فكان تأثيرهما قليل مقارنة بباقي العزلات. ان اصفرار الأوراق وتبيسها 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).



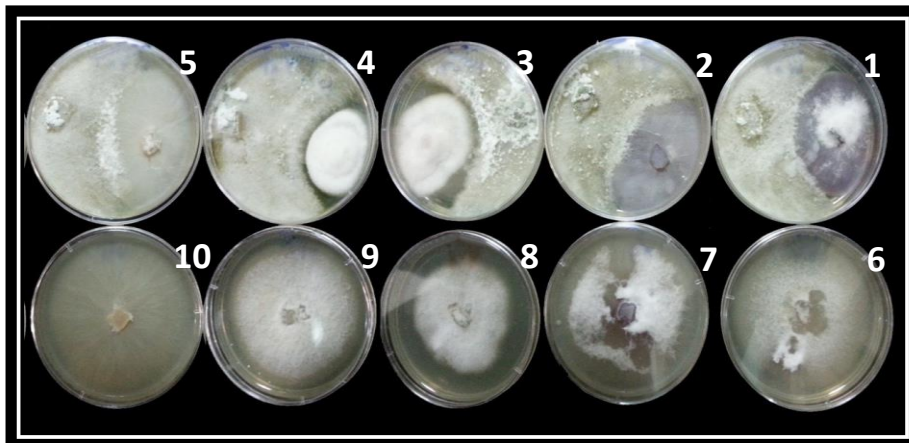


صورة(3). التأثير التثبيطي لرواشح عزلات الفطر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* على اوراق نبات الطماطة. 1: العزلة FOL1 ، 2: FOL1 + فطر التضاد ، 3: العزلة FOL2 ، 4: العزلة FOL2 + فطر التضاد ، 5: ، العزلة FOL3 ، 6: FOL3 + فطر التضاد ، 7: العزلة FOL4 ، 8: العزلة FOL4 + فطر التضاد، 9: العزلة FOL5 ، 10: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

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 الثانية (Bell et al., 1982)، أذ ان فطر المقاومة الأحيائية *T. harzianum* يمتلك خصوصية تطفلية وافراز رواشح كيميائية 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* و β -1-3-glucanase و *Chitinase* حيث تساعد الانزيمات في تحليل خلايا العائل وموته والتغذي عليه(حسان ، 2005 والعيساوي ، 2006).

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 و FOL5 (3.3 و 3 سم) على التوالي مقارنة بما يمثلان في معاملة السيطرة (8.5 و 8 سم) على التوالي عند اليوم الخامس حيث كانت هاتين العزلتين هما الاسرع نمواً وكثافة بالنسبة للغزل الفطري، تلاها معاملات التداخل للعزلات (FOL2 و FOL3 و FOL4) 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 ، 7.2 سم) على التوالي ويرجع ذلك الى ان الفطر *T. harzianum* يتميز بسرعة النمو وقدرته على منافسة



صورة (4). التضاد بين الفطر *T. harzianum* وعزلات الفطر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL1 و FOL2 و FOL3 و FOL4 و FOL5) 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 الطبقة، اما الارقام التي لا تحمل هذه العلامة فهي معاملات المقارنة

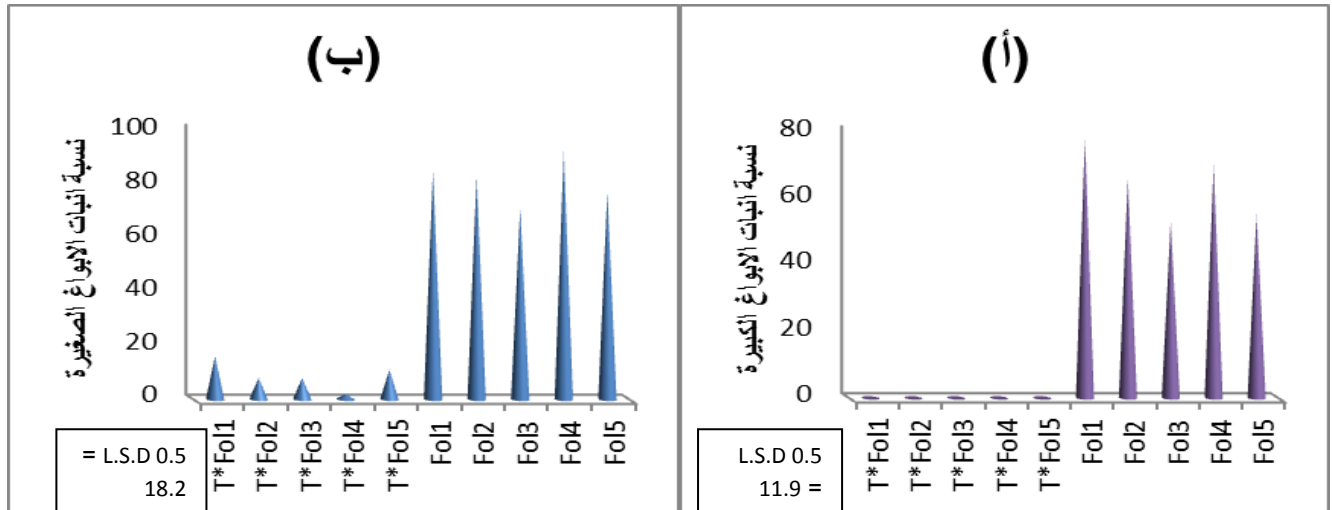
T×FOL5 الى 11.16% على التوالي مقارنة مع مثيلاتها في معاملات السيطرة والتي كانت نسبة الانبات 77 و 85%، ثم في المعاملات T×FOL2 و T×FOL3 و T×FOL4 (8 و 8 و 2%) على التوالي مقارنة بمعاملات المقارنة (83 و 71 و 92%) على التوالي.

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

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

تأثير الراشح الايضي للفطر *T. harzianum* على حيوية 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 و 70%) على التوالي، تلا ذلك المعاملات FOL2 و FOL3 و FOL5 (66 و 53 و 55%) على التوالي. أما بالنسبة للأبواغ الصغيرة فقد انخفضت فيها نسبة الانبات نتيجة التأثير التثبيطي للفطر *T. harzianum* للمعاملتين T×FOL1 و



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

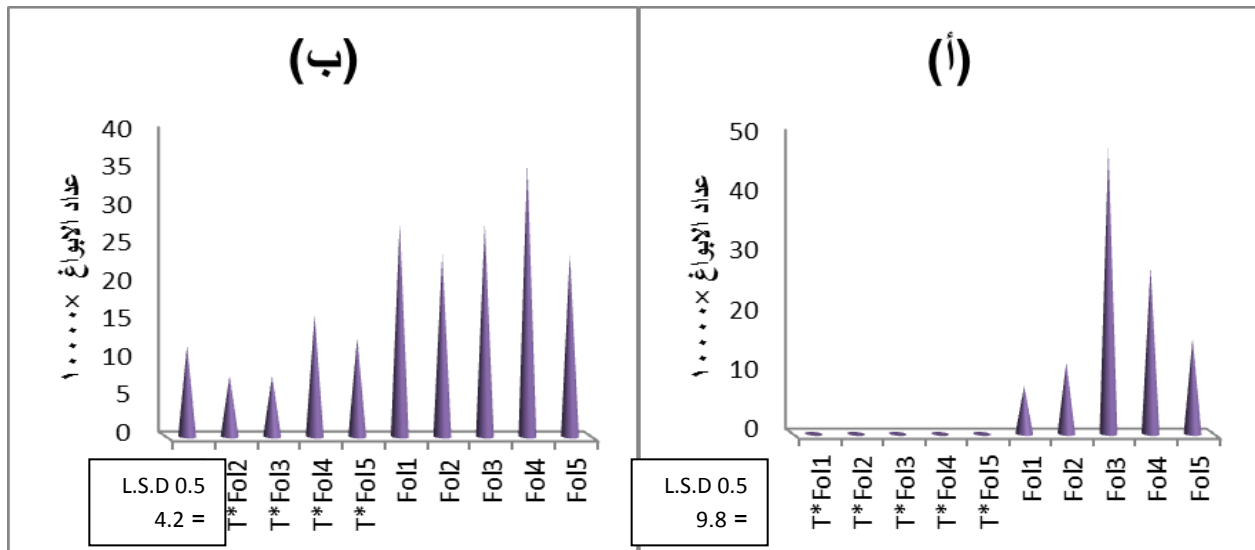
بين عزلات الفطر FOL نفسها ، حيث ان تثبيط أو انخفاض عملية التجرثم لعزلات الفطر الممرض ربما يرجع ذلك الى قدرة فطر المقاومة *T. harzianum* على انتاج العديد من المواد الايضية الثانوية خاصة المضادات مثل Trichodermol و Trichodermin و Gliotoxine و Pachybasin و Emodin Chrysophancol التي تعمل على تحلل الخيوط الفطرية (Kivang و Kuguk، 2002). كما ان لفطر التضاد القدرة على انتاج إنزيمات داخل وخارج الخلايا محللة للسليولوز مثل Cellulases، Cellobiases التي تحول السيليلوز إلى كلوكوز. ان الانزيمات محللة للكيتين والتي يفرزها الفطر *T.harzianum* تتضمن Exochitinases Endochitinases التي تنتج خلال نمو 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.

تأثير الراشح الايضي للفطر *T. harzianum* على انتاج

الكونيدات الكبيرة والصغيرة لعزلات الفطر FOL

بينت النتائج (شكل 2) ان انتاج الأبواغ الكبيرة من قبل عزلات الفطر FOL قد فشل تماما نتيجة التأثير التثبيطي لراشح الفطر *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 على التوالي، ثم تلتها باقي العزلات (FOL1 و FOL2 و FOL5) (8×10^4 و 12×10^4 و 16×10^4) على التوالي. أما بالنسبة للأبواغ الصغيرة (شكل 2) فقد كان سلوك المضاد الحيوي معها مختلفا اذ انخفضت اعدادها الى النصف تقريبا مقارنة مع معاملة السيطرة ، حيث وصل التجرثم في معاملي التداخل بين الفطر الممرض وفطر المقاومة الاحيائية FOL4 و FOL5 (16×10^4 و 13×10^4) وهي تمثل تقريبا نصف العدد مقارنة بمعاملة السيطرة (36×10^4 و 24×10^4) ثم تلتها بعد ذلك باقي العزلات T×FOL1 و T×FOL2 و T×FOL3 و T×FOL4 (8×10^4 و 8×10^4 و 12×10^4) على التوالي مقارنة بمعاملات المقارنة لنفس العزلات (28×10^4 و 24×10^4 و 28×10^4) على التوالي ، كذلك بينت النتائج ان هناك فروق معنوية



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

- العيساوي ، نياب 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 .أطبعه ألتانيه. 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 annum* 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 oxysporum 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.