تأثير المقاوم الحيوي Trichoderma و Gliocladium في الفطريات المعزولة من بذور السمسم

نديم أحمد رمضان و نجوى بشير اللشي
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2006/1/19 تاريخ القبول 2006/7/17

ABSTRACT

The antagonistic ability of two isolates of the biological control agents Trichoderma spp.(3,11) and isolate (1,2) of Trichoderma viride as well as Gliocladium sp. were studied against the pathogenic fungi Alternaria alternata , Pythium sp Rhizoctonia solani Stemphylium sp., isolated from sesame seeds. Two ways of incubating the dishes ,normal and inversed positions were used .The results showed high antagonistic ability of all types of the biocontrol agents used ranging was between 1.2 and 2.6 in the inversed position of the petri dishes during incubation which were better than in the normal position .The German isolate of T.viride gave the better degree of antagonism among the biocontrol agents used , but were not significantly different from the rest .

الخـــلاصـــــة

تم دراسة القدرة التضادية لعزلتي المقـاوم الحيـوي 3 و 11 Trichoderma spp والعزلة 1 و 2 للمقاوم الحيـوي Trichoderma viride فظـلاً عـن المقـاوم الحيـوي Gliocladium spp. ضد الفطريات الممرضة المعزولة من بذور السمســـــــم Rhizoctonia solani Pythium sp Stemphylium sp Alternaria alternate بطريقتي تحضين الاطباق العادية والمقلوبة وأوضحت النتائج وجود درجة تضاد عالية لانواع المقاوم الحيوي جميعاً تراوحت بين 2.6 ــ 1.2 وأعطى التحضين بصورة مقلوبـة اعطـى درجة تضاد أعلى مقارنة بطريقة التحضين العادية.أما احسن درجة تضاد لأنـواع المقـاوم الحيوي فقد كانت للعزلة (2) للفطر T.viride على الرغم من عدم وجود فـروق معنويـة بينها.

المـــقدمـــة:-

تعد المكافحة الكيميائية وسيلة سريعة وفعالة جدا لمكافحة الفطريات ، إلا ان لهـا العديد من المساوئ والآثار الضارة ومنها تأثيرها في صحة الإنسان والأحياء الأخرى ،كمـا تعد من اهم عوامل تلوث البيئة فضلا عن احتياجها إلى أجهزة معقدة و كلفتهـا الاقتـصادية العالية (عبد الرحيم و اخرون , 1989 و Strashnow و أخـرون 1985) لـذلك اهـتم الباحثون حاليا بإيجاد طرائق ذات كفاءة افضل من المبيدات الفطرية (Hadar و أخرون , 1984) .ولقد عرفت المقاومة الحيوية لمسببات أمراض النبات على انها استخدام طريقـة أو أكثر من الطرائق الحيوية لغرض خفض الطاقـة اللقاحيـة(Inoculum Potential) لهـذه المسببات أو التقليل من الأنشطة المرضية لها (El-Farnawany, 1996).

استخدمت العديد من الفطريات في المكافحة الحيوية لمسببات امراض النبـات واشـارت البحوث إلى استخدام أنواع الفطر .Gliocladium spp ضد الفطريـات Pythium spp و Rhizoctonia solani (Castenjon-Munoz و أخرون, 1995) ،اما اكثـر الفطريـات استخداما في هذا المجال فهي انواع الجنس Trichoderma وأظهر العديد من الانواع مقاومة جيدة ضد فطريات Fusarium solani و R.solani و .Pythium spp وأفضلها عـزلات الفطر T.harzianum (Cuevas و أخرون , 1996).

أوضحت النتائج المختبرية للعديد من الباحثين ان للفطر T.harzianum قدرة تـضادية وتطفلية عالية ضد الفطريات المذكورة علـى الوسـط الغـذائي Potato Sucaros Agar (P.S.A)حيث قام بتثبيط نموها بدرجة كبيرة كما نمت مستعمراته مـن فـوق مـستعمرات الفطريـات المـذكورة (El-Farnawanyو Shama, 1996 وأدم,2000). وتعـد انـواع Trichoderma ذات انتشار عال وتتأثر اعدادها بجفاف التربة أذ تتناقص عند تعرضها لفترة جفاف طويلة وتختلف انواعها في متطلباتها للحرارة فالنوع T.viride تلائمه درجات الحرارة الواطئة في حين تلائم النوع T.harzianium درجات الحرارة العاليـة ووجـد أن كفاءتهـا تختلف بين الاس الهيدروجيني (4-6.5) وتقل إذا زاد عن ذلك (Domsch وأخرون ,1980) وتستغل أنواع الجنسTrichoderma مدى واسعاً من المركبات للحصول على الكـاربون و الطاقة فهي تحصل عليها من السكريات الاحادية والثنائية والمعقـدة وكـذلك تـستفيد مـن البيورينات والبيرمدين والاحماض الامينية بوصفها مصدراً نتروجيناً(Tyeو Willets, 1973)

يهدف البحث الى ايجاد طريقة لمكافحة حيوية باسـتخدام فطـر Trichoderma و Gliocladium للحد من تاثير الفطريات المصاحبة لبذور السمسم.

المواد وطـرائق العمل

عزل الفطريات الممرضة وتنقيتها :-

عزلت الفطريات الممرضة من بذور السمسم (الصنف المحلي) علـى الوسـط الغـذائي لمستخلص البطاطا والسكروز والاجار(PSA) الحاوي للمـضاد الحيـوي كلورامفينيكـول Chloromphenicol ، عقمت 100 بذرة سطحياً بغمرها في محلول هيبوكلورات الصوديوم تركيزه 1 % مدة 3 دقائق ثم غسلت بماء مقطر معقم وجففت باوراق ترشيح معقمة ثم زرعت في اطباق بتري معقمة قطر 9 سم حاوية للوسط الغذائي P.S.A المـضاف اليـه المـضاد الحيوي بتركيز (10 ملغم / لتر) وبمعدل 10بذور لكل طبق حضنت الاطباق فـي درجـة حرارة 25 ± 2 م بصورة مقلوبة (1976,I.S.T.A).بعد نمو المستعمرات الفطرية ثم نقيت وعرفت باستخدام المفاتيح التصنيفية المخصصة (Pitt و Hocking, 1997 و Parameterو Whitney, 1970 و Bottalico و أخرون, 1998).

اختبـار القـدرة التضـادية لانواع المقاوم الحيوي :

اختبر المقاوم الحيوي .Gliocladium spp وعزلتان من .Trichoderma spp 3 . 11 والتي تم الحصول عليها من كلية العلوم / قسم علوم الحياة / جامعة الموصل والعزلتـان1 .2 من Trichoderma viride والتي تم الحصول عليها من المركز القومي للبحوث(مصر) ضد الفطريات الممرضة المعزولة من بذور السمسم.

و درست القدرة التضادية بين أنواع الفطريات الممرضة والمقاوم الحيوي عن طريق الزراعة المزدوجة لكل فطر من الفطريات المعزولة مع كل نوع من انواع المقاوم الحيـوي على الوسط الغذائي في أطباق بتري المعقمة بقطر(9 سم) . وضع قرص من النمو الفطـري بقطر4 ملم لكل فطر من الفطريات المعزولة بشكل مقلوب بحيث يلامس الغزل الفطري سطح الوسط الغذائي مع قرص مماثل له من المقاوم الحيوي بحيث تكون المـسافة الفاصـلة بـين القرصين 4 سم تقريباً. نفذت التجربة بواقع 4 مكررات / فطر ممرض مع كـل نـوع مـن المقاوم الحيوي و حضن طبقان بصورة مقلوبة وطبقان بصورة اعتيادية . أخذت النتائج بعـد 5–7 أيام من تحضين الأطباق على درجة 25 ± 2 م و قدرت درجة التضاد حسب سـلم التقدير الخماسي الذي اعده Bell و أخرون(1982) وذلك كما يأتي :-

– (1) نموات الفطر المقاوم تغطي كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو.

– (2) نموات الفطر المقاوم تغطي ثلثي مساحة الطبق ويغطي الفطر الممرض الثلث الباقي.

ـ (3) نموات الفطر المقاوم تغطي نصف مساحة الطبق ونموات الفطر الممرض تغطي النصف الاخر مع عدم وجود منطقة فاصلة بين المستعمرتين.

ـ (4) نموات االفطر المقاوم تغطي ثلث مساحة الطبق في حين تغطي نموات الفطر الممرض الثلثين الاخرين.

ـ(5) الفطر المقاوم غير نام وتغطي نموات الفطر الممرض كامل مساحة الطبق .

يكون المقاوم فعالاً عندما تكون القدرة التضادية 2 أو اقل مع الفطريات الممرضة.

النتـــائج والمنـــاقشـــة:-

عزل وتشخيص الفطريات الممرضة :-

بعد اجراء عملية عزل للفطريات نقيت وعرفت باستخدام المفتاح التصنيفي الذي أعـده Pitt و Hocking (1997) و شخصت أجناس الفطريات وكانت أهم الاجناس المسببة لموت وتعفن بذور السمسم هـــي Alternaria و Stemphylium و,Rhizoctonia و Pythium وتم تعريف نوع الفطر Rhizoctonia solani حسب المفتاح التصنيفي الذي اعـــــده Parameter و Whitney (1970) ونـوع الفطـر Alternaria alternata باتبـاع المفتاح التصنيفي لـ Bottalico و أخرون (1998) .وتم حساب النسب المئوية للفطريـات الممرضة المعزولة من بذور السمسم المحلية كما موضح في الجدول (1):

الجدول (1) : الفطريات المعزولة من بذور السمسم المحلية

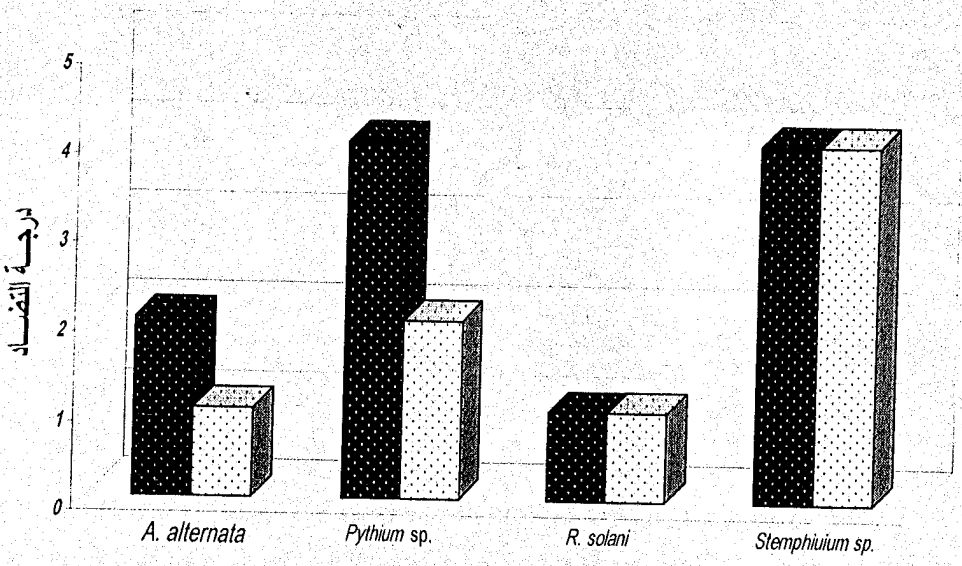
الفطريات الممرضة	% العزل
A. alternata	7.0
Pythium sp	1.0
R. solani	2.0
Stemphylium sp.	2.0

اختبار القدرة التضادية للمقاوم الحيوي للفطريات الممرضة:

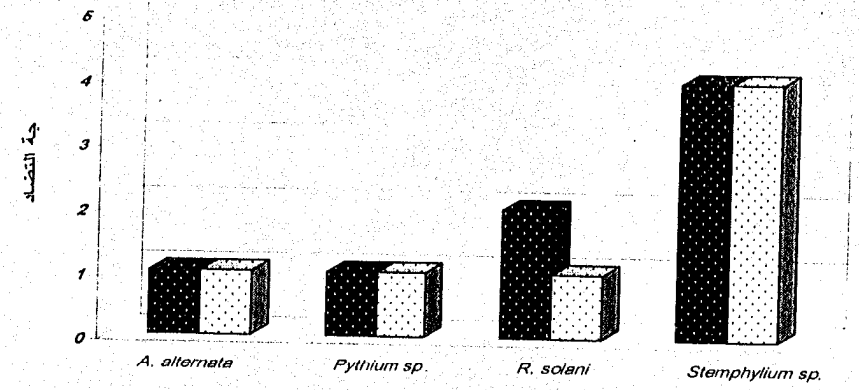
أختبرت القدرة التضادية للمقاوم الحيوي ضد الفطريـات الممرضـة ويلاحـظ مـن الشكل(1) تأثير العزلة Trichoderma spp. 3 من المقاوم الحيوي مع الفطريات الممرضة A. alternata وPythium sp و R. solani وStemphylium sp مختبريا فقد وجد أن نمو المقاوم الحيوي كان اسرع من نمو الفطر الممرض A.alternata أذ غطى نموه كامـل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو (درجة التضاد 1 أو 100 %) وذلك عند

تحضين الأطباق بصورة مقلوبة ، في حين كانت درجة التضاد 2 عند تحضين الاطباق بصورة عادية، ولوحظت درجة تضاد عالية جداً بالنسبة للفطر R. solani سواء عند التحضين بصورة عادية أو مقلوبة حيث بلغت 1 ولوحظ أن هناك تلامساً مباشراً بين مستعمرة المقاوم الحيوي Trichoderma spp. 3 ومستعمرات الفطريات الممرضة تلاه نمو مستعمرة المقاوم الحيوي Trichoderma. spp. فوق سطح مستعمرات الفطريات الممرضة والتفاف بعض من خيوط الغزل الفطري للمقاوم الحيوي حول الغزل الفطري للفطريات الممرضة، كما لم يلاحظ في جميع الحالات ظهور مناطق فاصلة بين النموات الفطرية لمستعمرة المقاوم الحيوي والنموات الفطرية لمستعمرات الفطريات الممرضة مما قد يشير الى أن هنالك نشاطاً تطفلياً للفطر Trichoderma spp. على الفطريات الممرضة. وتدعم نتائجنا ماأوردة الباحثون فقد ذكر Elad وأخرون(1983) وأدم (2000) أن الفطر T. harzianum يهاجم الفطر الممرض R. solani بصورة مباشرة وذلك بتكوين عقد هيفية (hyphal coils) و خطاطيف hooks أو أعضاء الالتصاق appressoria وكانت اقل درجة تضاد قد حدثت مع الفطر Stemphylium sp حيث بلغت 4 .

أما بالنسبة للعزلة11 من المقاوم الحيوي Trichoderma spp. (شكل 2) فلم تختلف درجة التضاد معنويا في حالة الفطرين A.alternata و Pythium sp. في كلا الوضعين من التحضين أذ بلغت أعلى درجة تضاد 1 (100 %) ولم تختلف عن الفطر Rhizoctonia solani عند تحضين الأطباق بصورة مقلوبة .



الشكل (1) : درجة تضاد المقاوم الحيوي3 Trichoderma spp ضد الفطريات الممرضة المعزولة من بذور السمسم بالوضع الاعتيادي للطبق ■ وبوضعه المقلوب □ .



الشكل (2) درجة تضاد المقاوم الحيوي 11 Trichoderma . spp ضد الفطريات الممرضة المعزولة من بذور السمسم بالوضع الاعتيادي للطبق ■ و بوضعه المقلوب □ .

أما في حالة الفطر Stemphylium فقد كانت درجة التضاد ادنى من الفطريات السابقة حيث بلغت 3 وتشير العديد من البحوث الى القوة التضادية العالية للمقاوم الحيوي T.harziannm مع الفطريات الممرضة وهذا ما أشار اليهElad وأخرون (1983) مع مسببات الذبول الطري في نباتات الذرة الرفيعة المتسببة عن الفطرين Fusarium moniliforme وPhome sp وكذلك مع الفطر المسبب لموت بادرات وتعفن جذورلسمسم

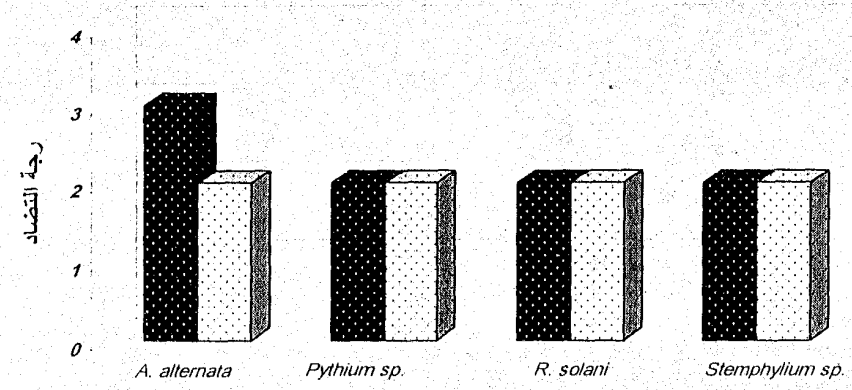
Macrophomina phaseolina (Parameter و Whitney . 1970) , وعزي السبب في ذلك الى ماوجده Hemeda و Rasmy(2003) و Claydon و أخرون (1987) ان المقاوم الحيوي الفطري يفرز مواد متطايرة مثل 6-n-pentyl-2H-pyran-z-one. And 6-n pentenyl 2H-pyran-2 وكما وجد ان غازي اول اوكسيد الكاربون والايثانول من الغازات التي تنتجها مزارع سلالات الفطر T.harzianum والتي تعمل على تثبيط نمو الفطريات مختبريا .

اما فيما يخص المقاوم الحيوي Trichoderma viride فقد اعطت العزلة 1 درجة تضاد عالية بلغت 2 مع كل من الفطريات الممرضة Pythium sp. و R. solani و Stemphylium sp. سواء عند تحضين الاطباق بصورة مقلوبة او أعتيادية كما في الشكل 3 وكذلك مع الفطر A . alternata في حالة التحضين بصورة مقلوبة في حين بلغت درجة التضاد 3 عند تحضين الاطباق بصورة صحيحة .

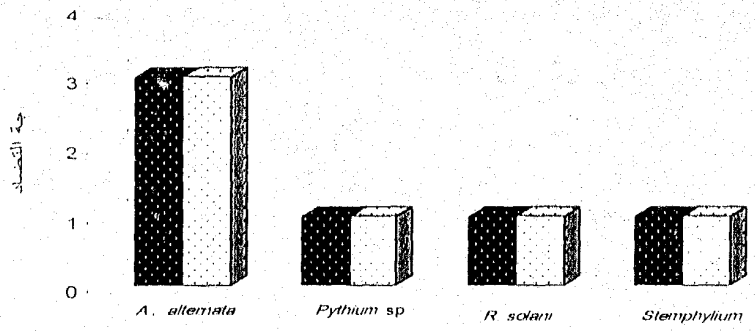
اما العزلة 2 من المقاوم الحيوي T.viride فقد حققت أعلى درجة تضاد بلغت 100 % بحيث غطت نموات الفطر المقاوم كامل الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو مع كل الفطريات Pythium sp. و R. solani و Stemphylium sp. ولكن لم يكن فعالا جدا في تثبيط الفطر A . alternate فقد بلغت درجة التضاد 3 في كلتا حالتي التحضين (الشكل 4).

ويدعم نتائجنا ماشارت اليه الدراسات الى حدوث تداخل بين هايفات الفطر T. viride و هايفات عزلات الفطر R. solani بالصور التالية ، استعمار سطحي لهايفات المقاوم الحيوي على فطر R. solani ، الاختراق المباشر بتكوين عضو الالتصاق وتكوين اشباه العقد على هايفات الفطر R. solani (El-Farnawany و Shama, 1996) وكذلك اوضحت الدراسة المختبرية ان المقاوم الحيوي T.harzianum قد ثبط بكفاءة نمو الفطريات الممرضة P.aphanidermatum و M. phaseolina و F. solani تليه العزلتان 1 و2 من T. viride المسببة لموت بادرات وتعفن جذور السمسم (اللشي , 2003) .

اشارت البحوث الى ان أن قدرة المقاوم الحيوي T. viride على افراز انزيمات محللة او مضادات حيوية مثل Viridin و Trichodermin وإفراز مواد ايضية غازية مثل Acetaldhyde ذات تاثير تثبيطي في نمو عدد من الفطريات المسببة لذبول السمسم(Hutchinson و Cowan , 1972) .

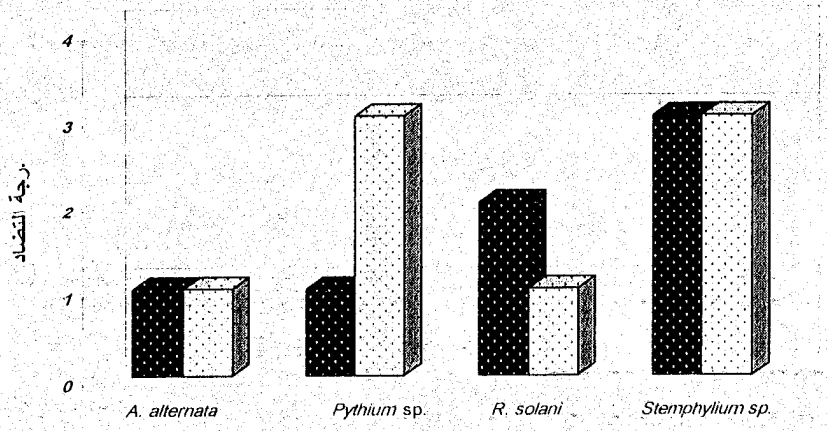


الشكل (3) درجة تضاد المقاوم الحيوي T. viride (عزلة1) ضد الفطريات الممرضة المعزولة من بذور السمسم بالوضع الاعتيادي للطبق ■ و بوضعه المقلوب □.



الشكل (4) درجة تضاد المقاوم الحيوي T. viride (عزلة2) ضد الفطريات الممرضة المعزولة من بذور السمسم بالوضع الاعتيادي للطبق ■ و بوضعه المقلوب □ .

اما المقاوم الحيوي Gliocladium roseum فان أعلى درجة تضاد كانت 100 % كذلك مع الفطر الممرض A . alternata في كلتا حالتي التحضين والتي لم تختلف معنويا عن درجة التثبيط لكل من الفطرين Pythium sp و R. solani عند التحضين بصورة عادية ومقلوبة على التوالي (الشكل 5) .



الشكل (5) : درجة تضاد المقاوم الحيوي Gliocladium sp. ضد الفطريات الممرضة المعزولة من بذور السمسم بالوضع الاعتيادي للطبق ■ و بوضعه المقلوب □.

اما اقل درجة تضاد فقد كانت مع الفطر Stemphylium أذ بلغت 3 وتتفق نتائجنا مع تبين ان استخدام عزلات من الفطر المقاوم Gliocladium roseum كانت كفوءة لمقاومة مرض الذبول الطري في نباتات الذرة الرفيعة المتسبب من الفطريات الممرضة Drechslera و Fusarium (Harman, 2000) ووجد ان المقاوم الحيوي G. penicilloides كان الاكثر تاثيرا ضد الفطر Drechslera . فان الفطر F.oxysporum قد ثبط باستخدام المقاوم الحيوي G. roseum (Hemeda و Shahda , 2002) وتوصل Whipps (1987) الى ان عزلتي G. roseum و G. penicilloides كانتا كفؤتين في تثبيط نمو الفطر F.oxysporum و Verticillium. albo-atrum مختبريا .

ويوضح الجدول (2) تاثيرات متوسطات درجات التثبيط لانواع المقاوم الحيوي في الفطريات الممرضة عند تحضين الاطباق بصورة عادية ومقلوبة فقد يلاحظ ان للمقاوم الحيوي تاثيراً في نمو الفطريات الممرضة أذ بلغت درجة التضاد بين 1 و 2 مما يعني ان المقاوم الحيوي لم يسمح للفطر الممرض بالنمو أو ان المقاوم الحيوي غطى ثلثي مساحة الطبق وهذه درجة تضاد عالية وقد تفوقت معاملة تحضين الاطباق بصورة مقلوبة على التحضين بالوضع الاعتيادي على الرغم من عدم وجود فروق معنوية بينهم ويعزى السبب في ذلك للانزيمات التي ينتجها المقاوم الحيوي Trichoderma spp. مثل Chitinase و B(1,3)glucanase (Hemeda, 1992) او للمواد الطيارة الناتجة من العمليات الحيوية مثل CO_2 و ethanol و acetaldhyde و aceton (Sivan و Chet,1989) و ذكر ايضاً ان CO_2 هو مادة طيارة ناتجة من المقاوم الحيوي Trichoderma spp. والتي تعمل على تثبيط نمو ميسيليوم الفطر Macrophomina phaseolina (Papavizas, 1985) . اما احسن مقاوم حيوي

فكانت انواعه جميعاً كفوءة حيث تراوحت درجة التضاد بين 1.2-2.6 اما افضل درجة تضاد فقد كانت للعزلة 2 للمقاوم الحيوي T. viride على الرغم من عدم وجود فروق معنوية بينهما.

الجدول(2) : تأثير متوسطات درجات التثبيط لأنواع المقاوم الحيوي في الفطريات الممرضة

الفطريات	متوسطات درجات التثبيط *	
	التحضين بصورة عادية	التحضين بصورة مقلوبة
A . alternata	2.0a	1.6a
Pythium sp.	1.8a	1.8a
R. solani	1.6a	1.2a
Stemphylium sp.	2.6a	2.6a

* متوسطات درجات التثبيط لانواع المقاوم الحيوي.Trichoderma spp العزلتين 3 .11وعزلتي المقاوم الحيوي 1T.viride و2 والمقاوم الحيويGliocladium spp .

a: تدل على عدم وجود فروق معنوية .

المصـــــادر:

1- Strashnow , Y. , Elad , Y. , Sivan , A.and Chet , I., Plant Pathology . 34:146-151. (1985).

2-عبد الرحيم ,عوض محمد وأمل عبد الكريم أبو سرية. مجلة وقاية النبات العربية 70 : 167 – 171 . (1989).

3-Hadar,Y.;Harman,G.E.and Taylor,A.G., Phytopayhology,74:106-110. (1984).

4- El-Farnawany,M.A., Assuit J.Agric. Sci.27: 85-96.(1996).

5-Castenjon-Munoz, M.and Oyarzun,P.J. , Europe. J. PI .Pathol .101: 35- 49.1995.(Abst.). (1995).

6-Cuevas,V.C.,Soriano,J.M., Bagunu ,L.G.,Soniega,J.A.and Alfonso,A.L. ,.Philippine.Agriculturist,78:255-276.(Abst). (1996).

7-El-farnawany,M.A.& Shama,S. , Alex.J.Agrie 11: 235-260. (1996).

8-أدم ، كمال أبراهيم.(2000).المقاومة المتكاملة لمرض تعفن بذور وجذور وموت بادرات الطماطا, رسالة دكتوراه. كلية الزراعة والغابات جامعة الموصل,العراق,120 .

9-Domsch, K.H. Gams, W,Anderson ,T.H., Compendium of Soil Fungi.london:Academic859 pp. (1980).

10-Tye , R., and Willets, A.J., J.Gen. Microbial .77:1-11 Unv. Park and London 43 pp. (1973).

11-اللشي,نجوى بشير.(2003).المقاومة المتكاملة لبعض امراض جذور السمسم الفطرية في محافظة نينوى . أطروحة دكتوراه ,كلية الزراعة والغابات جامعة الموصل.الموصل-العراق،151.

13- I.S.T.A. International Rules for seed Testing . Wageningen , Netherlands . 152 pp.(1976).

13-Bell, D.K., Wells. H.D. andMarkham, C.R., Phytopathology, 72: 379-382.(1982).

14-Pitt,J.I. and Hocking ,A.D.2 nd ed Gaithersburg .,Maryland ;Chapman and Hall .593pp.(1997).

15-Parameter , T.B. and Whitney , H.S. Cal. Un. Prss Berkeley(1970).

16-Bottalico, A.and A.Logrieco. Shinha, K.K.and Bhatnagar P. (56-108) . Marcal Dekker , Inc. New York . (1998).

17-Elad,Y.;Chet,I.;Boyle,P.and Henis.,Phytppathology73 : 85-88. (1983).

18-Shahda , W. T. ,A , A.H. Hemeda and Shehata,M.R.A., J.Agric.Sci Mansoura Univ.27(4):2155-2171. (2002).

19-Hemeda,A.A.H.,Rasmy, M. R., Egypt .J.Appl.Sci.18:404-417. (2003).

20-Claydon,N.;Allan,M.;Hanson ,J.R.and Avent ,A.G., Trans .Br.Mycol. Soc. 88(4):503-513. (1987)

21-Hutchinson,S.A.and.Cowan,M.E.,Trans.Bt. Mycol.Soc.59(1)71-77.(1972).

22-Harman,G.E., Pl.Dis.84(4)377-393. (2000).

23-Hemeda, A. A. H. and W. T.Shahda , J. Agric. Sci. Monosoura Univ.27(6):3767-3779. (2002).

24-Whipps, J. M. , New Phytologist, 107(1) : 124-142. (1987).

25-Hemeda, A. A.H. (1992). Rhizosphere mycoflora of potato and their role in seed and plant health in Egypt and Germany Ph.D thesis, Fac.Agric .Alex.Univ.,Egypt., 123 pp.

26-Sivan, A. and I. Chet . J. General Microbial . 135 : 675 – 782(1989).

27-Papavizas , G. C. Ann. Rev. Phytopathol . 23 : 23 – 54(1985).