P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) **مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة** Open Access
2013 ,(7), (3) :23-32

إمكانية استعمال بعض الأحياء المجهرية في السيطرة على نمو الفطر *Pythium* spp.

ساجد صلاح الدين سليم **بحار مقداد عبدالله**

جامعة الأنبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2012/10/01
تاريخ القبول: 2013/01/10
تاريخ النشر: 03/ 2014/11
DOI: 10.37652/juaps.2013.94580

الكلمات المفتاحية:
الأحياء المجهرية،
السيطرة الحيوية،
مو الفطر *Pythium* spp.

الخلاصة:

درست قابلية ثلاث عزلات لفطر *Pythium* spp. (وهي عزلة الباميا والتي شخصت حسب المراجع التصنيفية بأنها *P. afertile* وعزلة التبن وعزلة الرشاد) المعزولة من جذور و مخلفات بعض النباتات المصابة على إحداث الأصابة بمرض سقوط البادرات قبل البزوغ وبعده (Pre – and post emergence seedlings damping – off) لعدد من النباتات الاقتصادية كالذرة والسمسم وخيار القثة والطماطة، أظهرت عزلات الفطر *Pythium* spp. تبايناً واضحاً في قدرتها على إحداث الإصابة بسقوط البادرات قبل بزوغها وبعده إذ كانت عزلة *P. afertile* أشدها قدرة على إحداث الإصابة بالسقوط قبل البزوغ بمعدل عام بلغ 39.99 % تليها عزلة الرشاد بمعدل عام بلغ 32.08% وقد جاءت عزلة التبن آخراً بمعدل إصابة بلغ 27.08%، في حين تفوقت عزلة الرشاد على باقي العزلات في إحداث الإصابة بالسقوط بعد البزوغ بمعدل عام بلغ 27.35% تلتها عزلة *P. afertile* ثم عزلة التبن بمعدلات إصابة بلغت 21.44% و 16.35 % على الترتيب. أثمرت محاولة عزل الفطريات الموجودة في منطقة محيط الجذر (Rhizosphere) لكل من نباتي الطماطة والسمسم عن عزل 13 فطراً مختلفاً فضلاً عن عزلات الفطر *Pythium* spp. وتبين أن تلك العزلات تعود إلى الأجناس الآتية : *Alternaria* و *Aspergillus* و *Cladosporium* و *Penicillium* و *Phytophthora* و *Rhizoctonia* و *Trichoderma* و *Verticillium* و *Fusarium*. إذ أمكن عزل الفطريات المذكورة أعلاه ما عدا الفطر *Fusarium* في حال نبات الطماطة وكل من الفطرين *A. wentii* و *Cladosporium* في حال نبات السمسم. وقد أظهرت نتائج البحث تقارباً في طبيعة استجابة الفطريات المضادة المعزولة من تربة مخيط الجذر تجاه عزلتي الفطر *Pythium* spp. باستثناء عزلة الفطر *Trichoderma* spp. التي كانت أشدها تأثيراً وبمعدل تثبيط بلغ 66.37% وذلك لقدرته على التطفل فطرياً على خيوط الفطر الممرض (*Pythium sp.*).

المقدمة :

يعد الجنس *Pythium* spp. من الكائنات الحية الشبيهة بالفطريات. تنتشر أنواع هذا الفطر في أنحاء العالم كافة مسببةً عدداً من الأمراض منها تعفن الجذور (Root rot) وسقوط البادرات (Seedlings damping off) التي تعد من بين أكثر الأمراض المدمرة للمحاصيل النامية في البيوت الزجاجية (1) كما أشار (2) إلى أن الممرض *Pythium* spp. يؤثر تقريباً في كل أنواع المحاصيل الزراعية وفي أجزاء واسعة من العالم مما يعكس مدى الخسائر الاقتصادية البالغة والناجمة عن أنواع هذا الفطر.

تعد معظم الأحياء المجهرية التي تستعمر منطقة محيط الجذر (Rhizosphere) طبقاً لتأثيراتها ممرضات نباتية والقليل منها يحفز تأثيرات مفيدة ويكون لها فاعلية مضادة تجاه ممرضات النبات (3)، لذا فإن الفلورا الميكروبية مهمة في تحديد الممرض إذ يرتبط كبح التربة بشكل

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science;
E-mail address: dean_coll.science@uoanbar.edu.iq

أساسي مع الفاعلية الأيضية الميكروبية العالية (4 و5). يمتاز الفطر *Trichoderma* sp. بامتلاكه العديد من الآليات التي جعلت منه عاملاً إحيائياً مؤثراً في العديد من مسببات الأمراض وبديلاً كُفأً للمبيدات الفطرية الخطرة، ومن هذه الآليات : التطفل الفطري (Mycoparasitism) والتضاد لحيوي(Antibiosis) و تثبيط الإنزيمات الحالة المحفزة للإمراضية مثل إنزيمات Pectinases والتنافس (Competition) (6 و7 و8)، كما إن تنوع طرائق إضافة الفطر *Trichoderma* بوصفه عامل مكافحة حيوية زاد من كفاءة الفطر في السيطرة على مسببات الأمراض، إذ استعمله (9) لمعاملة بذور نباتي الفجل والبزاليا بغية مكافحة الفطرين*R. solani* و *Pythium sp.* كما استعمل رشاً على المجموع الخضري بشكل معلق كونيدي لمكافحة الفطر *Botrytis cinerea* على العنب (10). لذا فقد استهدفت الدراسة الحالية :

1 – عزل وتشخيص الفطر *Pythium* على مستوى الجنس من جذور بعض النباتات المصابة.

2 – دراسة قدرة عزلات هذا الفطر على إحداث الإصابة بمرض سقوط البادرات.

3– عزل الفطريات من منطقة محيط الجذر (Rhizosphere) لنباتات الدراسة واختبار القدرة التضادية بينها وبين الفطر *Pythium* spp. .

المواد وطرائق العمل :

أولاً : جمع البذور :

تم الحصول على بذور محصول السمسم – صنف محلي – من الأسواق المحلية – الرمادي. اما بذور محاصيل الذرة الصفراء– 5018 صنف معتمد والطماطة صنف early person محلي، وخيار القثة – صنف محلي فقد تم الحصول عليها من كلية الزراعة – جامعة بغداد.

ثانياً : جمع العينات :

جمعت عينات عدة من ترب مناطق زراعية مختلفة في مركز مدينة الرمادي، وانتخبت أنواع الترب الطينية والمشبعة بالماء ثم وزعت هذه العينات في أصص بلاستيكية معقمة وزرعت بأنواع مختلفة من بذور النباتات لحين بزوغ البادرات.

ثالثاً : تحضير التربة وزراعة النبات :

استخدمت في زراعة بذور النباتات المنتخبة لإجراء الدراسة والمعقمة بمحلول الهايبوكلورايت التجاري بتركيز 6% لمدة دقيقتين، تربة خفيفة مؤلفة من الرمل والبيتموس بنسبة 1:2 معقمة في جهاز الموصدة (Autoclave)، والتي تركت سبعة أيام قبل الاستعمال وقيس الرقم الهيدروجيني والتوصيل الكهربائي للتربة فكانت القيم 7.0 و 1.4 ملي سمنز / سنتيمتر على الترتيب. وزعت البذور المعقمة لكل من محاصيل خيار القثة والذرة والسمسم والطماطة بواقع عشرة بذور في كل أصيص ولكل محصول وكل على حدة.

رابعاً : عزل الفطر الممرض.*Pythium* sp :

بعد بزوغ البادرات تم فحصها بعناية وعزلت البادرات التي ظهرت عليها أعراض الإصابة وعلاماتها. غسلت هذه البادرات جيداً باستعمال الماء الجاري لمدة نصف ساعة، أخذ المجموع الجذري وقطع إلى قطع عدة وبواقع 0.5 - 1 سنتيمتر طولاً لكل قطعة. عقمت القطع بنقعها في محلول هايبوكلورايت الصوديوم التجاري بتركيز 6% لمدة 60 ثانية. غسلت بعدها القطع بوفرة من الماء المقطر المعقم ووضعت بعدها بين طبقتين من ورق الترشيح المعقم لسحب الماء الزائد ووزعت القطع على أطباق بتري بأقطار 8.5 سنتيمتر حاوية على وسط البطاطا سكروز– اكار Potato Sucrose Agar (P.S.A) وبواقع 4 قطع / طبق. حفظت الأطباق بعدها في الحاضنة على درجة حرارة 26±2ْ مئوية لمدة 5-7أيام ولحين ظهور المستعمرات .

خامساً : التنقية والحفظ :

لغرض الحصول على عزلات فطرية نقية تم اتباع الطريقة الواردة في (11). حفظت العزلات المنقاة بزرعها على وسط PSA في أنابيب اختبار.

سادساً: التشخيص :

شخصت الفطريات التي تم عزلها وتنقيتها باعتماد الصفات الزرعية والصفات المظهرية من خلال فحص النموات الفطرية بأخذ أجزاء من المزرعة وفحصها مجهرياً بعد تحميلها بقطرة من اللاكتوفينول. وقد تم اعتماد المفاتيح التصنيفية الواردة في (12) لتشخيص الفطريات.

سابعاً : اختبار قدرة عزلات الفطر *Pythium spp.* على إحداث الإصابة لبادرات بعض النباتات الاقتصادية:

اختبرت القدرة الإمراضية للعزلات *P.afertile* (التي عزلت من جذور نبات الباميا) وعزلة التبن (التي عزلت من وسط التبن المستخدم في تنمية الفطر *Pleurotus* sp.) وعزلة الرشاد (التي عزلت من جذور نبات الرشاد). نقلت أقراص من مزارع العزلات الفطرية منماة على وسط P.S.A ونشرت بين بذور النباتات وبواقع خمسة أقراص لكل أصيص على حدة وبستة مكررات لكل محصول. غطيت البذور والأقراص الفطرية بطبقة من التربة بسمك 1 سنتيمتر. سقيت الأصص بالماء المقطر المعقم للحد الذي تبقى فيه التربة رطبة. وتجدر الإشارة إلى أن معاملة السيطرة تضمنت زراعة المحاصيل المذكورة في الأصص من دون تلويثها بالأقراص الفطرية وبواقع ستة أصص لكل محصول.

تم البدء بتسجيل النتائج مع بزوغ البادرات فوق سطح التربة في كل من معاملة المقارنة والمعاملات الأخرى ولمدة 21 يوماً بفاصل زمني مقداره يومان بين قراءة وأخرى. وتم حساب النسبة المئوية لكل من البادرات المصابة قبل البزوغ وبعده. كررت التجربة لمرة واحدة .

ثامناً : عزل الفطريات من منطقة محيط الجذر (Rhizosphere) لنباتي الطماطة والسمسم :

تم اختيار العزلات التي أبدت إمراضية عالية (*P. afertile* وعزلة الرشاد) ضد النباتات التي أبدت حساسية فائقة للإصابة بالعزلات الممرضة من فطر *Pythium* spp. (نباتي الطماطة والسمسم) إذ تم زراعة بذور الطماطة والسمسم (على وفق الطريقة الواردة في الفقرة تحضير التربة وزراعة النبات) تحت ظروف غير معقمة وبعد مضي 10 - 7أيام من بزوغ البادرات وظهور أعراض الإصابة عليها قلعت البادرات برفق وهزت الجذور بعناية للتخلص من الحبيبات الكبيرة الحجم ثم وضعت الجذور مع ما يحيطها من التربة(Rhizosphere) في دورق زجاجي سعة 250 ملليتراً حاوياً على 100 ملليتر محلول ملحي فسلجي. نقلت بعدها الدوارق إلى حاضنة هزازة (Shaker Incubator) تحت درجة حرارة 26 ± 2° مئوية لمدة نصف ساعة وبسرعة 80 دورة / دقيقة، بعدها أخذت هذه المحاليل وأجري لها تخفيفات عشرية وصولاً إلى التخفيف الخامس (طريقة التخفيف العشري) ومن ثم أضيف 0.5 ملليتر من كل تخفيف لكل طبق على حدة وصب فوقها وسط P.S.A مضاف إليه صبغة Rose Bengal بنسبة 0.035 غرام / لتر و Streptomycin بتركيز 1/ 1000 بنسبة 3 ملليتر/ لتر وخلطت العينات مع الوسط ثم حضنت الأطباق تحت درجة حرارة 26 ± 2° مئوية لمدة عشرة أيام بعدها تم حساب التعداد الكلي للفطريات في غرام واحد من تربة جو الجذر وتشخيصها .

تاسعاً : اختبارات المقدرة التضادية :

1: اختبارات المقدرة التضادية بين الفطريات المعزولة من منطقة محيط الجذر (Rhizosphere) وفطر *Pythium* spp. في الوسط الزرعي P.S.A :

أجري هذا الاختبار لمعرفة تأثير الفطريات التي سبق عزلها من منطقة محيط الجذر لنباتي السمسم والطماطة في الفطر *Pythium* spp. نفذ الاختبار باتباع تقانة الزرع المزدوج الواردة في (13). استعملت ستة أطباق لكل معاملة، أما معاملة المقارنة فقد تضمنت زراعة ستة أطباق لكل عزلة فطر *Pythium* spp. فواعة على حدة وحضنت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 26 ± 2° مئوية لمدة 7.0 أيام. سجلت بعدها نتائج قابلية التضاد (Antagonism) بين الفطريات المعزولة وعزلات فطر *Pythium* spp. إذ تم حساب مقدار التثبيط وذلك بحساب قطر مستعمرة الفطر الممرض المنمى باتباع تقانة الزرع المزدوج ومقارنته بمعاملة المقارنة وقد حسبت النسبة المئوية للتثبيط على وفق المعادلة الاتية :

$$\% \text{ للتثبيط} = \frac{\text{معدل نمو الفطر في المقارنة} - \text{معدل نمو الفطر في المعاملة}}{\text{معدل نمو الفطر في المقارنة}} \times 100$$

كررت التجربة لمرة واحدة.

2: دراسة تأثير فطر *Trichoderma* spp. المعزول من التربة في معدل نمو الفطر *Pythium* spp.:

أجري هذا الاختبار لتقويم كفاءة فطر *Trichoderma* spp. الذي سبق أن عزل من التربة ضد الفطر *Pythium* spp. إذ نفذ الاختبار على وفق ما ذكر في الفقرة السابقة الا أن مدة الحضن استمرت

لعشرة أيام وذلك لمتابعة ظاهرة التطفل الفطري (Mycoparasitism) إذ تم قياس منطقة التداخل الفطري كل 24 ساعة بعد حدوث التماس بين الفطرين وذلك باستعمال المسطرة الاعتيادية المدرجة. ولمشاهدة التداخل بين الغزل الفطري للفطرين في المجهر فقد تم استعمال طريقة تداخل الهايفات على أغشية رقيقة من الأكار (Hyphal interaction on thin films of agar) الواردة في (13). كررت التجربة لمرة واحدة.

النتائج والمناقشة :

أولاً : تشخيص الفطر *Pythium*:

تم عزل وتشخيص ثلاث عزلات تعود إلى الجنس *Pythium* spp. إحداها شخصت لمستوى النوع وهي عزلة *Pythium afertile* والاثنتان المتبقيتان شخصتا إلى مستوى الجنس وقد أطلق عليهما تسميتا عزلة التبن وعزلة الرشاد وذلك باعتماد الصفات الزرعية والمظهرية لمزارع عزلات الفطر إستناداً إلى المفاتيح التصنيفية الواردة في (12).

ثانياً : اختبار قدرة عزلات الفطر *Pythium* spp. على إحداث الإصابة لبادرات بعض النباتات الاقتصادية :

1- اختبار قدرة عزلات الفطر *Pythium* spp. على إحداث الإصابة قبل البزوغ لبادرات بعض النباتات الاقتصادية:

يتضح من الجدول 1 الاختلاف الواضح في قدرة عزلات الفطر *Pythium* spp. على إحداث المرض. إذ من ملاحظة المعدل العام لنسب إصابة البادرات قبل البزوغ يتضح أن عزلة *P. afertile* كانت الأشد قدرة على إحداث المرض وبمعدل عام بلغ 39.99% في حين كانت عزلة التبن الأضعف بين العزلات بمعدل إصابة بلغ 27.08% وكانت عزلة الرشاد وسطاً في قدرتها. وبصورة عامة أبدت جميع العزلات قدرة إمراضية واضحة عند مقارنة نسب موت البادرات بتلك الخاصة بمعاملات السيطرة. كما تشير النتائج المعروضة في الجدول إلى وجود تباين في نسب موت البادرات قبل بزوغها وذلك تبعاً لأنواع عزلات الفطر *Pythium* spp. والنباتات المدروسة بالمقارنة مع معاملات السيطرة. إذ سجلت عزلة الفطر *P. afertile* أعلى نسبة إصابة في نبات السمسم بلغت 73.33% وبفارق معنوي عن إصابة النبات نفسه بعزلة التبن البالغة 51.66% وقد اتسمت هذه الفروق بالمعنوية عند مقارنتها بمعاملة السيطرة. في حين انخفضت الإصابة في نبات الذرة بشكل كبير تحت تأثير العزلات الفطرية كافة إذ تراوحت بين 0.0 % و 8.33 % ولم تسجل تأثيراً يرقى إلى مستوى المعنوية بالمقارنة مع معاملة السيطرة. أما فيما يخص إصابة كل من نباتي الطماطة وخيار القثة فقد تراوحت بين 60 % و40% في نبات الطماطة بتأثيرعزلتي *P. afertile* والرشاد على الترتيب، و23.33 % و11.66% في نبات خيار القثة تحت تأثير عزلتي *P. afertile* والتبن غير أن الأخيرة لم تسجل تأثيراً يرقى إلى مستوى المعنوية بالمقارنة مع معاملة السيطرة. وعلى الرغم من تأثر جميع النباتات المستعملة بعزلات الفطر المختلفة الاَ أنها أظهرت تفاوتاً واضحاً في درجة تأثرها فقد كان نبات السمسم أشدها تأثراً يليه في ذلك نباتا الطماطة و خيار القثة على الترتيب في حين أبدى محصول الذرة مقاومة واضحة لمعظم العزلات ويتضح ذلك من استعراض معدلات سقوط البادرات قبل البزوغ إذ سجل نبات السمسم أعلى نسبة موات للبذور بلغت 47.49% وبفارق معنوي واضح عن نسب الموات التي أظهرتها كل من نباتات الذرة و خيار القثة والطماطة التي بلغت 2.9% و12.49% و36.25 % على الترتيب.

2- اختبار قدرة عزلات الفطر *Pythium* spp. على إحداث الإصابة بعد البزوغ لبادرات بعض النباتات الاقتصادية :

تشير النتائج المعروضة في الجدول 2 إلى استمرار التباين في قدرة عزلات الفطر *Pythium* spp. على إحداث المرض إذ تفوقت عزلة الرشاد على باقي العزلات في إحداث الإصابة بمعدل عام بلغ 27.35% تلتها عزلة *P. afertile* ثم عزلة التبن بنسب سقوط بلغت معدلاتها 21.44% و16.35% على الترتيب مع ملاحظة غياب الفروق المعنوية بين هذه العزلات. إلا أنها بصورة عامة أبدت قدرة إمراضية واضحة على إحداث المرض عند مقارنة نسب موت البادرات الناتجة من الإصابة بهذه العزلات بتلك الخاصة بمعاملات السيطرة. ويتضح من مقارنة متوسطات نسب الإصابة أن أعلى نسبة إصابة حدثت في نبات السمسم بتأثير عزلة الرشاد وبمتوسط إصابة بلغ 73.33% يليها في ذلك نبات الطماطة بتأثير عزلة *P. afertile* بمتوسط إصابة بلغ 40.27% وبفروقات معنوية بالمقارنة مع معاملات السيطرة ليستمر التدرج في الانخفاض في الإصابة لتصل 5.55% في نبات خيار القثة بتأثير عزلة الرشاد ثم لتبلغ أدناها في نبات الذرة تحت تأثير العزلات الفطرية كافة والبالغة 0.0%، ولم تسجل

المعاملتان الأخيرتان تأثيراً يرقى إلى مستوى المعنوية بالمقارنة مع معاملات السيطرة.

وفيما يخص نمط العلاقة بين نباتات التجربة وعزلات الفطر *Pythium* spp. فيلاحظ أنها أبدت نمطاً مشابهاً لما أبدته تجاه عزلات الفطر *Pythium* spp. المختلفة في مرحلة سقوط البادرات قبل البزوغ والمعروضة نتائجها في الجدول 1 إذ كان نبات السمسم أشدها تأثراً يليه في ذلك نبات الطماطة ثم خيار القثة، في حين أبدى نبات الذرة مقاومة كاملة لعزلات الفطر جميعاً إذ بلغت نسب موت البادرات بعد البزوغ 0.0%. وبمقارنة المعدل العام لنسب إصابة نباتات التجربة يلاحظ اتساع الفرق في نسب الإصابة بين الذرة و خيار القثة والسمسم لتصل حد المعنوية في حين اختفت هذه الفروق مع نبات الطماطة على الرغم من وجودها حسابياً.

ونظراً لما أبدته كل من عزلة *P. afertile* وعزلة الرشاد من ضراوة كبيرة ضد نباتات الدراسة فقد تم اختيارهما في تجارب البحث اللاحقة، كما تم اختيار نباتي الذرة والسمسم لما أبداه الأول من مقاومة والثاني من حساسية فائقة للإصابة بالمرض.

لعل للتغاير الكبير فيما تحتويه أنواع الفطريات من ضروب وسلالات ذات صفات وظيفية وشكلية وتركيبية خاصة بها، شأنها في ذلك شأن الكثير من الأحياء المجهرية، دوراً مهماً في اختلاف قدرتها على إحداث الإصابة على نباتات معينة دون أخرى. وهذا ما تعكسه نتائج الجدول (1) إذ أظهرت عزلات فطر *Pythium* spp. تبايناً واضحاً في قدرتها على إحداث الإصابة إذ كانت عزلة *P. afertile* أشد العزلات ضرراً بالنباتات المختبرة بينما كانت عزلتا التبن والرشاد أقل تأثيراً. وبذا تكون مشاهداتنا متوافقة مع ما ذكر (15). ومن جهة أخرى اختلفت النباتات المستعملة في درجة تأثرها بعزلات الفطر *Pythium* spp. المختلفة إذ كان نبات السمسم أشدها حساسية للإصابة بالفطر يليه نبات الطماطة في كلا مرحلتي الإصابة (قبل البزوغ وبعده) في حين أبدى نبات الذرة مقاومة كاملة للإصابة بالفطر في مرحلة البادرات (جدول 2) وقد يكون السبب في تباين رد فعل النباتات المختلفة وما أبدته من حساسية أو مقاومة تجاه عزلات الفطر المختلفة يعود إلى طبيعة التباين فيما تكونه هذه النباتات من وسائل دفاعية تركيبية أو مستحثة (16) فضلاً عن وقت نواتج الدفاع وموقعها أثناء عملية الإصابة (17). كما يضاف إلى ذلك أن الجزيئات الراشحة في أثناء إنبات البذور وتكشف الجذور قد تلعب دوراً مهماً في مدى حساسية أو مقاومة النباتات وهي بذلك قد تسلك سلوكاً متبايناً بشكل حاد باتجاه زيادة حساسية النبات للإصابة أو مقاومتها والعامل الأساسي في ذلك هو نوع الجزيئات الراشحة من النبات وطبيعتها.

ثالثاً : عزل الفطريات من منطقة محيط الجذر (Rhizosphere) لنباتي السمسم والطماطة:

أمكن عزل 13 فطراً من المنطقة المحيطة بجذور كل من نبات الطماطة ونبات السمسم تعود إلى الأجناس *Alternaria* و *Aspergillus* و *Cladosporium* و *Penicillium* و *Phytophthora* و *Rhizoctonia* و *Trichoderma* و *Verticillium* و *Fusarium*.

ويلاحظ من الأعداد المعروضة في الجدول 3 التي تمثل تكرار الجنس الفطري المسجل أن أكثر الأجناس كثافة ضمن نماذج التربة والتخافيف المحضرة لتربة جو جذر الطماطة كان الجنس *Aspergillus* و يليه تنازلياً الأجناس *Trichoderma* و *Penicillium* و *Rhizoctonia*و *Verticillium* ثم *Alternaria* وأخيراً *Cladosporium* و *Phytophthora*.

أما الفطريات الأكثر تسجيلاً التي أمكن عزلها من منطقة محيط الجذر لنبات السمسم من ضمن الأنواع الثلاثة عشر (13) المسجلة فقد شملت أجناس *Aspergillus* و*Trichoderma* و*Penicillium* و*Fusarium* و*Verticillium* و*Rhizoctonia*ثم *Phytophthora* وأخيراً *Alternaria*.ولم يعزل الفطر *Fusarium* من منطقة محيط جذر نبات الطماطة في حين لم يعزل الفطر *A. wentii* و *Cladosporium* من منطقة محيط جذر نبات السمسم.

ويبدو من النتائج المعروضة في الجدول 3 أن هناك تبايناً واضحاً في تعداد الفطريات المعزولة تبعاً لنوع النبات ونوع عزلة الفطر *Pythium* spp. المستخدمة في تلويث ترب هذه النباتات وكما يلاحظ أنه لا يوجد نمط ثابت لتوزيع هذه الأجناس الفطرية المعزولة من منطقة محيط الجذر على وفق عاملي النبات (الطماطة والسمسم) وعزلتي الفطر *Pythium* spp.(*P. afertile* وعزلة الرشاد).

وقد يكون السبب في هذا التنوع في أجناس الفطريات وأعدادها تبعاً لنوع النبات عائداً إلى اختلاف طبيعة التركيب الكيمياوي لرواشح جذور النباتات التي تعد عاملاً محدداً وذا تأثير سلبي أو ايجابي بحسب نوع الفطر. ومن ثم فإن لوجود عدد من الفطريات أو غيابها تأثيراً في الفطر *Pythium* spp. بسبب ما تفرزه من مواد تعمل على تثبيط الجنس *Pythium* spp. (18) لذا فإن طبيعة هذه المواد المفرزة وخواصها الكيمياوية وكيفية تأثيرها وتداخلها مع فاعلية الفطريات الأخرى التي تعد ممرضة(مثل *Pythium* spp.) بحاجة إلى المزيد من الدراسة للإفادة منها في مجال السيطرة الحيوية.

رابعاً : اختبارات المقدرة التضادية :

1- اختبارات المقدرة التضادية بين الفطريات المعزولة من منطقة محيط الجذر (Rhizosphere) وفطر *Pythium* spp. في الوسط الزرعي P.S.A :

تظهر النتائج المعروضة في الجدول 4 أن هناك خمسة أنواع من الفطريات المعزولة من تربة محيط الجذر (Rhizosphere) لكل من نباتي الطماطة و السمسم إذ كان لها القدرة على التضاد مع عزلتي الفطر *Pythium* spp. (*P. afertile* وعزلة الرشاد) وهي الفطر *Rhizoctonia* spp. و*Aspergillus* spp. و*Penicillium* spp. و *Verticillium* spp. و*Trichoderma* spp. إذ ظهرت منطقة تثبيط (Inhibition zone) بين عزلتي الفطر *Pythium* spp. والفطريات المضادة. ويلاحظ أن هناك تفاوتاً واضحاً في شدة التأثر بين عزلتي الفطر *Pythium* spp. إذ إن عزلة الرشاد كانت أشد تأثراً من العزلة *P. afertile* بعلاقة التضاد بدلالة ازدياد نسب مساحة التثبيط إلا ان الملاحظ أن هذه الفروق لم تمتلك الصفة المعنوية. كما يلاحظ أن هناك تقارباً في طبيعة استجابة الفطريات المضادة تجاه عزلتي الفطر *Pythium* spp. ما عدا عزلة الفطر *Trichoderma* spp. التي كانت أشدها تأثيراً بمعدل نسبة تثبيط بلغت 66.37 % وبفارق معنوي واضح عن بقية الفطريات المضادة (شكل رقم 1 و 2). وبصورة عامة يشير المعدل العام إلى أن كلاً من العزلتين (*P. afertile* وعزلة الرشاد) قد أبدتا نمطاً متشابهاً من النمو كاستجابة لتأثير الفطريات المضادة بدلالة غياب الفروق المعنوية بين المعدلات العامة لنسب التثبيط.

2- دراسة تأثير فطر *Trichoderma* spp. المعزول من التربة في معدل نمو الفطر *Pythium* spp. :

تم اختيار عزلة الفطر *Trichoderma* spp. من أجل دراسة امكانية استعمالها في السيطرة الحيوية على نمو عزلتي الفطر *Pythium* spp. (*P. afertile* وعزلة الرشاد) وذلك لما أبدته هذه العزلة من فاعلية تضادية(Antagonistic activity) كبيرة تجاه عزلتي الفطر *Pythium* spp. ومن متابعة نمط نمو الفطر *Trichoderma* spp. اتضح أنه يمتلك آليات متطورة فاعلة جداً من أجل الاستمرار واستعمار البيئات التنافسية ومن أهم هذه الآليات التطفل الفطري (Mycoparasitism) إذ لوحظ فرط النمو (overgrowth) لعزلة الفطر *Trichoderma* spp. على مستعمرة الفطر الممرض (*Pythium* spp.) وبعد 24 ساعة من التداخل بين الغزل الفطري لعامل السيطرة الحيوية (*Trichoderma* spp.) والغزل الفطري للممرض تكونت منطقة واضحة من التداخل على وسط P.S.A (شكل رقم 1 و 2) ومما تجدر الإشارة إليه وجود اختلافات مهمة في معدل فرط نمو عزلة الفطر *Trichoderma* spp. على عزلتي الفطر *Pythium* spp. إذ بلغ معدل النمو الوافر 35.6 مليمتر و 44.3 مليمتر لكل من عزلتي *P. afertile* وعزلة الرشاد على التوالي (شكل رقم 1 و2). وأثبتت طريقة دراسة تداخل الخيوط الفطرية على أغشية رقيقة من الأكار المستعملة لمتابعة ظاهرة التطفل الفطري أن عزلة الفطر *Trichoderma* spp. أبدت نمطاً مماثلاً خلال تداخلها مع عزلتي الفطر *Pythium* spp. على أغشية الأكار المائي فبعد التماس بين الفطرين نمت الخيوط الفطرية للفطر *Trichoderma* spp. سوية مع الخيوط الفطرية للفطر الممرض ثم حدث التفاف للخيوط الفطرية الرئيسة لفطر *Trichoderma* spp. حول الخيوط الفطرية للعائل أو تكونت تفرعات قصيرة من فطر *Trichoderma* spp. التي أحاطت بالخيوط الفطرية للعائل بشكل محكم. كما لوحظ حدوث الالتفاف الكثيف حول الخيوط الفطرية للعائل (*Pythium* spp.) والنمو الداخلي ضمن الغزل الفطري في أثناء عملية التداخل هذه بين الفطرين، وتحطيم الجدران الخلوية للعائل وبعد أن وصلت الخيوط الفطرية للفطر *Trichoderma* spp. إلى الأجزاء الأقدم من مستعمرة الممرض لوحظ أنها تنمو بداخل الخيوط الفطرية للعائل وعند هذه

المرحلة كانت أغلب الخيوط الفطرية للعائل فاقدة للسايتوبلازم وهذا ما يوضحه الشكل رقم (3).

من خلال متابعة نمط النمو للفطريات المضادة وعزلتي الفطر *Pythium* spp. وعزلة الرشاد (*P. afertile*) في الوسط الصلب P.S.A. باستخدام تقانة الزرع المزدوج لاحظنا حدوث تداخل مايسيلي بين الفطريات المضادة والفطر *Pythium* spp. وربما يكون سبب حدوثه هو التنافس على الغذاء والمكان وهذا يتحدد بشكل كبير بطبيعة نمو الغزل الفطري وسرعته، وهذا يتفق مع ما ذكره (19). كما لوحظ أن هناك تقارباً في طبيعة استجابة الفطريات المضادة تجاه عزلتي الفطر *Pythium* spp. ما عدا عزلة الفطر *Trichoderma* spp. التي كانت أشدها تأثيراً وقد يعزى ذلك إلى الاختلاف في آلية عمل هذا الفطر ضد الفطريات الممرضة التي تتعلق بالخصائص التضادية للفطر *Trichoderma* spp. والمتضمنة التطفل وتحليل الفطريات الممرضة (13)، فضلاً عن ذلك فإن النمو السريع لعزلة الفطر *Trichoderma* spp. واستعمار سطح الوسط والمواد الأساس (20) تمنحها أفضلية تنافسية مهمة للمكان والمغذيات مع الفطريات الممرضة حتى قبل أن توظف أو تستخدم مخزونها من السموم الفطرية(Mycotoxins) (21).

المصادر:

1- Ben – Jenana , Raoudha Khanfir., Rabiaa Haouala., Mohamed Ali Triki., Jean–Jaques Godon., Khaled Hibar., Mohamed Ben Khedher.,and Belgacem Henchi. (2009). Composts، compost extracts and bacterial suppressive action on *Pythium aphanidermatum* in tomato.Pak. J. Bot. 41 (1) : 315 – 327.

2- Ben – Yaphet , Y., and Eric B. Nelson. (1999). Differential suppression of damping – off caused by Pythium aphanidermatum، P. irregulare and P. myriotylum in composts at different temperatures. Plant Dis. 83 (4) : 356 – 360.

3- Al – Yahya، F. A., El – Hussieni S. M., Ibrahim A. A., and Ibrahim Y E. (2007). A new biocontrol fungus Trichoderma kongii in the kingdom of Saudi Arabia isolation and identification. Saudi Journal of Biological Sciences. 14 (2) : 137 – 144.

4- Chen , W., Hoitink F. A. J.,Schmitthenner A. F., and Tuovinen O. H. (1988). The role of microbial activity in suppression of damping – off caused by Pythium ultimum. Phytopathol. 78 : 314 – 322.

5- Lumsden، R. D., Garica E. R., Lewis J. A., and Frias T. G. A. (1987). Suppression of damping – off caused by Pythium spp. in soil from the indigenous Mexican chinampa agicultural system. Soil Biology and Biochemistry. 19 : 501 – 508.

6- Monte , Enrique. (2001).Understanding Trichoderma:between biotechnology and microbial ecology. Int.Micobiol. 4 : 1 – 4.

7- Chet , I., Inbar J., and Hadar I. (1997).Fungal antagonists and mycoparasi- tes. IN : Zafari،Doustmorad.، Mehdi Mehrabi Koushki.، and Eidi Bazgir.(2008).Biocontrol valuation of wheat take– all disease by Trichoderma screened isolates. African Journal of Biotechnology. 7 (20) : 3653 – 3659

8- Harman , Gary E., Charles R. Howell., Ada Viterbo., Ilan Chet.، and Matteo Lorito.(2004).Trichoderma species – opportunistic , avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2 : 43 – 56.

9- Harman , G. E., I. Chet., and R. Baker. (1980). Trichoderma hamatum effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by Pythium spp. or Rhizoctonia solani. J. Phytopathol. 70 : 1167 – 1172.

10- Elad , Y. (1994). Biological control of grape grey mould by Trichoderma harzianum. Crop Prot. 13 : 35 – 38.

11- Raper , K. B., and Fennell D. I. (1965). The genus Aspergillus. Williams and Wilkins Company. Baltimor.

12- Watanabe , Tsuneo. (2002). Pictorial atlas of soil and seed fungi : morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd. ed.

13- Barakat , Radwan M., Fadel Al – Mahareeq and Mohammad I. Al – Msri . (2006). Biological control of Sclerotium rolfsii by using indigenous Trichoderma spp. isolates from Palestine. Hebron University Research Journal. 2 (2) : 27 – 47.

14- Ingram , D. M., and R. J. Cook.(1990).Pathogenicity of four Pythium species to wheat , barley , peas and lentils. Plant Pathology. 39 : 110 – 117.

15- Murillo, I., L. Cavallarin., and B. San Sagundo. (1999). Cytology of infection maize seedlings by

Fusarium moniliforme and immuno- localization of the pathogenesis –related PRms protein. Phytopathology. 89 : 737 – 747.

16- Børja , I., P. Sharma.,T. Krekling., and A. Lonneborg. (1994). Cytopatho- logical response in roots of Picea abies seedlings infected with Pythium dimorphum. Phytopatholo- ogy. 85 : 495 – 501.

17- Bais , H. P., T. L. Weir., L. G. Perry., S. Gilroy. ,and J.M. Vivanco. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plant and other organisms. Annual Review of Plant Biology. 57: 233– 266.

18- Adomas , Aleksandra., Martin Eklund., Martin Johansson and Frederick O. Asiegbu.(2006).Identification and analysis of differentially expressed cDNAs during nonself – competitive interaction between Phlebiopsis gigantea and Heterobasidion parviporum. FEMS Microbial. Ecol. 57 : 26 – 39.

19- Zafari , Doustmorad., Mehdi Mehrabi Koushki., and Eidi Bazgir.(2008).Biocontrol evaluation of wheat take – all disease by Trichoderma screened isolates. African Journal of Biotechnology.7 (20) : 3653-3659.

20- Küçük , Çiğdem., and Merih Kivanç. (2004). In vitro antifungal activity of strains of Trichoderma harzianum. Turk. J. Biol. 28 : 111 – 115.

جدول 1 : النسبة المئوية لإصابات قبل البزوغ لبادرات بعض النباتات الاقتصادية بعزلات الفطر *Pythium* spp.

عزلات الفطر *Pythium* spp.	النسبة المئوية لموت البادرات قبل البزوغ				
	الذرة	السمسم	خيار القثاء	الطماطة	المعدل
P. afertile	3.33* (6.14) ij	73.33 (63.9) a	23.33 (21.8) efghi	60.0 (50.8) abcd	39.99 (35.66) A
عزلة التبن	0.0 (0.0) j	51.66 (43.85) bcd	11.66 (14.0) ghij	45.0 (39.8) cde	27.08 (24.41) A
عزلة الرشاد	8.33 (11.9) hij	65.0 (54.46) a	15.0 (16.1) fghij	40.0 (38.65) de	32.08 (30.277) A
السيطرة (غير ملوثة بالفطر)	0.0 (0.0) j	0.0 (0.0) j	0.0 (0.0) j	0.0 (0.0) j	0.0 (0.0) B
المعدل	2.9 (4.51) D	47.49 (43.18) A	12.49 (12.97) CD	36.25 (23.3) BCD	

* الأرقام تمثل متوسطات ستة مكررات (نسب مئوية).

( ) التحويل الزاوي للنسب المئوية.

المتوسطات متشابهة الحروف الصغيرة لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى معنوية 0.05.

المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة أفقياً أو عمودياً لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى معنوية 0.05.

جدول 2 : : النسبة المئوية لإصابات بعد البزوغ لبادرات بعض النباتات الاقتصادية بعزلات الفطر *Pythium* spp.

عزلات الفطر *Pythium* spp.	النسبة المئوية لموت البادرات بعد البزوغ				
	الذرة	السمسم	خيار القثاء	الطماطة	المعدل
P. afertile	0.0* i (0.0)	40.73 cdef (36.476)	4.76 hi (5.378)	40.27 bcdef (36.746)	21.44 AB (19.65)
عزلة التبن	0.0 i (0.0)	30.0 efgh (30.535)	0.0 i (0.0)	35.4 defgh (31.293)	16.35 AB (15.457)
عزلة الرشاد	0.0 i (0.0)	73.33 a (64.135)	5.55 ghi (5.873)	30.55 fghi (25.98)	27.35 A (23.997)
السيطرة (غير ملوثة بالفطر)	0.0 i (0.0)	0.0 i (0.0)	0.0 i (0.0)	0.0 i (0.0)	0.0 B (0.0)
المعدل	0.0 C (0.0)	36.015 A (32.78)	2.577 BC (2.8)	26.55 ABC (23.5)	

* الأرقام تمثل متوسطات ستة مكررات (نسب مئوية).

( ) التحويل الزاوي للنسب المئوية.

المتوسطات متشابهة الحروف الصغيرة لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى معنوية 0.05.

المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة أفقياً أو عمودياً لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى معنوية 0.05.

جدول 3 : أنواع وأجناس الفطريات المعزولة من تربة منطقة محيط الجذر لنباتي الطماطة والسمسم الملوثة بعزلتين للفطر *Pythium sp.* :

الفطريات المعزولة من جو الجذر	تعداد الفطريات والنسبة المئوية	الطماطة		السمسم	
		P. afertile	عزلة الرشاد	*P. afertile*	عزلة الرشاد
Alternaria	عدد	5	3	1	2

1.2	0.6	2.2	3.7	%	*alternata*
1	1	8	0.0	عدد	*Aspergillus flavus*
0.6	0.6	5.9	0.0	%	
47	56	50	43	عدد	*A. niger*
30.1	36.8	37.3	32	%	
5	3	3	3	عدد	*A. terreus*
3.2	1.9	2.2	2.2	%	
0.0	0.0	4	0.0	عدد	*A. wentii*
0.0	0.0	2.9	0.0	%	
0.0	0.0	7	0.0	عدد	*Cladosporium cladosporiodes*
0.0	0.0	5.2	0.0	%	
17	17	6	16	عدد	*Penicillium* sp.1
10.8	11.1	4.4	11.9	%	
20	16	16	10	عدد	*Penicillium* sp.2
12.8	10.5	11.9	7.4	%	
4	3	2	4	عدد	*Phytophthora* sp.
2.5	1.9	1.4	2.9	%	
3	5	9	8	عدد	*Rhizoctonia solani*
1.9	3.2	6.7	5.9	%	
40	37	20	35	عدد	*Trichoderma* sp.
25.6	24.3	14.9	26.1	%	
5	3	6	5	عدد	*Verticillium* sp.
3.2	1.9	4.4	2.3	%	
12	10	0.0	0.0	عدد	*Fusarium* sp.
7.6	6.5	0.0	0.0	%	
156	152	134	129	-	المجموع الكلي للعزلات

جدول 4 : النسب المئوية لمساحة تثبيط عزلات الفطر *Pythium* بالتداخل مع الفطريات المضادة لها :

عزلات الفطر *Pythium* spp.	الفطر المضاد					
	Rhizoct-onia spp.	*Asperg-illus* spp.	*Penicill ium* spp.	*Verticil-lium* spp.	*Trichod-erma* spp.	المعدل
P. afertile	20.69* (24.2)	23.76 (28.8)	13.78 (17.8)	27.82 (30.27)	59.13 (50.3)	27.036 A (30.274)
عزلة الرشاد	30.35 (33.36)	33.3 (35.2)	32.86 (34.9)	27.3 (31.5)	73.615 (59.28)	39.485 A (38.848)
المعدل	25.52 DE(28.78)	28.53 BCDE (32.0)	23.32 E (26.35)	27.56 CDE (30.385)	66.37 A (54.79)	

* الأرقام تمثل متوسطات ستة مكررات (النسب المئوية للتثبيط).

( ) التحويل الزاوي للنسب المئوية.

المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة أفقياً لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى معنوية 0.05.

المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة عمودياً لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى معنوية 0.05.

جدول 5 : نسب سقوط بادرات نبات السمسم المعفرة بالفطر *Trichoderma* spp. ومسحوق جذور نبات الذرة قبل البزوغ وبعده بالمقارنة مع تأثير المبيد Beltanol في التربة

المعاملة	Pre-emerg. %	Post-emerg. %	المعدل
مسحوق جذور الذرة + *P. afertile*	20.0* (21.14) ijklmn	10.37 (15.34) klmn	15.185 (18.24) GH
Trichoderma P. afertile +	10.0 (15.0) lmn	52.56 (46.67) abcdefg	31.28 (30.835) CDEFG
+ Beltanol *P. afertile*	30.0 (32.3) efghijklm	14.8 (18.23) jklmn	22.4 (25.265) EFG
مسحوق جذور الذرة + عزلة الرشاد	40.0 (38.85) cdefghijkl	22.2 (28.0) ghijklm	31.1 (33.425) BCDEFG
Trichoderma +عزلة الرشاد	6.66 (8.85) mn	40.83 (38.56) defghijkl	23.745 (23.705) FGH
+ Beltanol عزلة الرشاد	26.66 (30.78) fghijklm	19.43 (21.74) hijklmn	23.045 (26.26) DEFG
سيطرة 1 (بذور سمسم + *P. afertile*)	70.0 (56.79) abcd	40.33 (39.24) bcdefghij	55.165 (48.015) ABCD
سيطرة 2 (بذور سمسم + عزلة الرشاد)	60.0 (50.85) abcdef	75.0 (60.31) a	67.5 (55.58) A
سيطرة 3 (سمسم فقط)	0.0 (0.0) n	0.0 (0.0) n	0.0 (0.0) H
المعدل	29.257 (28.28) A	30.613 (29.78) A	

* الأرقام تمثل متوسطات ثلاثة مكررات (نسب مئوية).( ) التحويل الزاوي للنسب المئوية.

المتوسطات متشابهة الحروف الصغيرة لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى معنوية 0.05.

المتوسطات متشابهة الحروف الكبيرة أفقياً أو عمودياً لا تختلف عن بعضها معنوياً وحسب اختبار Duncan متعدد الحدود وعلى مستوى معنوية 0.05.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2013 ,(7), (3) :23-32

POSSIBILITY OF USING SOME MICROORGANISMS TO CONTROL THE GROWTH OF *Pythium* spp.

SAJID SALAHUDDIN SALEEM BIHAR MOQDAD ABDULLAH

E.mail: dean_coll.science@uoanbar.edu.iq

ABSTRACT:

The pathogenicity of three isolates of the genus *Pythium* (*P.afertile* , which was isolated from okra , hay isolate and cress isolate) for many economical plants such as maize , sesame , cucumber and tomato were studied in artificially infested soils. These isolates were isolated from the roots of some infected plants and it's pathogenicity was determined according to it's ability to cause pre – and post emergence damping – off of seedlings. The pathogenicity tests showed that the *P. afertile* isolate recorded the maximum reduction in percentage of pre – emergence damping – off , where it's percent was 39.99% , followed by cress isolate as 32.08 % and hay isolate as 27.08% , whereas the cress isolate gave a significant reduction in percentage of post – emergence damping – off which was 27.35 % , followed by *P. afertile* and hay isolates which were 21.44 % and 16.35 % respectively.The antagonistic activity between the fungi that isolated from the rhizosphere of tomato and sesame plants and both *Pythium*'s isolates (*P. afertile* and cress isolates) was studied on P.S.A. culture medium. The results of fungi isolated from the rhizosphere of tomato and sesame plants showed the presence of 13 different types of fungi in addition to *Pythium*'s isolates which are belong to the following genera : *Alternaria* , *Aspergillus* , *Cladosporium* , *Penicillium* , *Phytophthora* , *Rhizoctonia* , *Trichoderma* , *Verticillium* and *Fusarium*. The microbial analysis showed the presence of all isolated fungi that mentioned above except the fungus *Fusarium* in the rhizosphere of tomato plant and both of the fungi *A. wentii* and *Cladosporium* in the rhizosphere of sesame plant. Results of this research demonstrated convergence in the response of antagonistic fungi against both *Pythium* isolates except the fungus *Trichoderma* , which was the most influential with inhibition rate reached to 66.37 % because of it's ability to mycoparasite pathogenic fungi .