فعالية الفطر *Trichoderma herzianum* في المقاومة الحيوية لنوعين من الفطر *Fusarium* المعزولة من بذور القرنفل

نديم احمد رمضان

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل

تاريخ الاستلام **2006/10/01**

تاريخ القبول **2006/12/10**

ABSTRACT

The present study was able to isolate eight different species and yeast of seed born fungi from carnation seed (*Dianthus caryophyllus*), six of which belong to the class Deuteromycetes, one to the class Ascomycetes, and one to the class Zygomycetes . The percentages of isolation were 7% *Alternaria alternata* , 1% *Fusariun colmorum*, and 1% *F. oxysporum* .

The infection with these fungi caused reduction in the seed germination ratio to 28% and 16 % in the seed of the local cultivar and the red (Dwarf) with *F.oxysporum* respectively . while seeds of white cultivor (Doppio) exhibited ratios of 60% and 80% with both species of *Fusarium.*

The biological controller *Trichoderma herzianum* had a clear effect on the growth of both species of the *Fusarium* and the antagonism degree 1.3 and 1.6 respectively.

Fusarium oxysporum producd more polygalacturonase , pectatelyase and showed a clear zone 6 cm diameter around the fungal colony.

الخلاصة

تمكنت الدراسة الحالية من عزل فطريات خيطية , تنتمي الفطريات المعزولة من بذور القرنفل (*Dianthus caryophyllus*) الى ثمانية أجناس فضلاً عن الخمائر يعود ستة منها الى صف الفطريات الناقصة في حين ينتمي جنس واحد الى صف الفطريات الكيسية و الاخر الى صف الفطري ات اللاقحية , من بذور نبات القرنفل . وبلغت نسبة عزل الفطريات *Alternaria dianthicola* 7% و *Fusarium colmorum* 1%و *F.oxysporum* 1%.أدت الاصابة بهذة الفطريات الى خفض نسبة الانبات الى 28.0 % و 16.0 % في الصنف المحلي والاحمر (Dwarf) مع *F.oxysporum* على التوالي .و تفوقت بذور القرنفل الصنف الابيض

(Doppio) في نسبة أنباتها حيث وصلت الى 60%و80% مع كلا النوعين على التوالي .كان للمقاوم الحيوي *Trichoderma herzianum* تأثير واضح في نمو كلا نوعي الفطر *Fusarium* كليهما وبلغت درجة التضاد 1.3 و1.6 على التوالي . تغلب الفطـر *F. oxysporum* على *F. colmorum* في انتاج الانزيمات المحللة للمواد البكتينية واظهر منطقة رائقة بلغ قطرها 6 سم حول مستعمرة الفطر.

المقدمة

يعد القرنفل (*Dianthus caryophyllus*) من نباتات الزينة المهمة وقد وجد برياً في المنطقة الممتدة من جنوب اوربا الى الهند . وقد وصفه Theophrastus في كتابه تاريخ النباتات حوالي 3000 عام قبل الميلاد ، و وهب الاغريق زهرة القرنفل الى الاله Zens الذي سمي باللاتينية Dianthus أي زهرة الاله . كما قام الاغريق بتتويج أبطال الالعاب الاولمبية بالقرنفل و تستعمل بذور القرنفل في اكثار الاصناف المحلية المفردة وذات الازهار الصغيرة ولغرض انتاج اصناف جديدة ، اما الاصناف ذات الازهار الكبيرة فتحور فيها اعضاء التذكير الى بتلات ولهذا لاتتكون البذور فيها (طواجن ، 1987).

يتعرض هذا النبات للاصابة بالعديد من الفطريات منها *Alternaria dianthi* و *A. dianthicola* و *Rhizoctonia solani* (Agarwal and Sinclair, 1997) . كما تسبب أنواع من جنس *Fusarium* تعفناً في البذور وسقوط البادرات وتعفن السيقان ، و تصبح الاصابة متوطنة واحياناً وبائية عند الزراعات الكثيفة والاكثار بالعقل ولهذا يعد هذا الفطر أحد ى أهم مشاكلات انتاج القرنفل (Holley and Baker , 1966) .

لوحظ أن الانزيمات المحللة للسليليلوزاو البكتين او الهميسليلوز او المركبات البروتينية تنشط عند تلامس الفطريات مع النبات العائل , وتتكون الصفائح الوسطى بين الخلايا تتكون اساسا من البكتين وان تحلل أي من هذ هالمواد يتطلب انزيما او اكثر يفرز هالمسبب المرضي (Agrios,2005).

استخدمت مجموعة من انواع الفطريات في مكافحة حيوية لفطريات ممرضة للنبات أذ يفرز عدد منها مواداً مثبطة للنمواوأنه يتطفل على انواع اخرى (ميخائيل ،2000).ولقد حلت المكافحة الحيوية محل المبيدات الفطرية التي تتباين في فعاليتها وقصر امدها في حماية النبات طوال الموسم فيما انخفضت فاعلية عدد من المبيدات بسبب ظهور سلالات فطرية مقاومة (Cook and Zhang , 1985) . وفي محاولة لمكافحة امراض القرنفل حيويا فقد استهدفت الدراسة الحالية أستخدام الفطر *Trichoderma herzianum* بوصفه عاملاً حيوياً في مقاومة الفطريات المحمولة في بذور القرنفل .

مواد وطرائق العمل

مصادر البذور :

تم الحصول على بذور القرنفل (*Dianthus caryophyllus*) من السوق المحلية وضمت صنفاً محلياً وصنفين مستوردين هما الصنف الأحمر (Dwarf Fragrance Mix) و الصنف الأبيض(Doppio Chobond Bianco) .

أختبار سلامة البذور :

أخذت 100 بذرة من كل صنف بعد غسلها جيداً بالماء و تعقيمها سطحياً بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم (NaOCl) 1% مدة 3 دقائق . زرعت البذور في اطباق بتري حاوية لوسط دكستروزالبطاطا الصلب (PDA) وبمعدل 10 بذور / طبق زج اجي ثم حضنت الاطباق في درجة 25ْ م لمدة اسبوع (ISTA ,1976).أحتوت الاطباق على وسط دكستروز البطاطا PDA الصلب المتكون من غم/لتر (200 بطاطا و 20 دكستروز و15 آجار).عزلت الفطريات النامية وشخصت حسب المفاتيح التصنيفية(Booth ,1971 ; Pitt and Hocking , 1997 ; Ellis,1971) . سجلت نسبة العزل وحفظت الفطريات في قنان زجاجية حاوية لوسط PDA المائل .

اختبارتأثير الفطرعلى إنبات البذورفي الاطباق:

زرع نوعان من الفطر *Fusarium* هما *F.culmorum* و *F.oxysporum* و نميا في اطباق بتري بلاستيكية قطر 9 سم حاوية ل20 مل من وسط PDA الصلب و حضنت في درجة حرارة 25ْ م الى حين امتلاء الطبق ثم وزعت 100 بذرة معقمة لكل صنف من القرنفل وبمعدل 10 بذور /طبق ثم حضنت الاطباق في درجة 25ْ م ولمدة 7 ايام بعد ذلك حسبت البذور النابتة في كل طبق .استخدمت الاطباق الحاوية لوسط PDA حسب والخالية من الفطر بوجود بذور القرنفل لتمثل المقارنة (الرفاعي ، 2002) .

الكفاءة التضادية لفطر *T. harzianum* ضد فطر *Fusarium*:

تم الحصول على المقاوم الحيوي *Trichoderma herzianaum* من قسم وقاية النبات /كلية الزراعة و الغابات / جامعة الموصل و أختبرت الكفاءة التضادية عن طريق الزراعة المزدوجة للمقاوم الحيوي و الفطريين *F. culmorum* و *F. oxysporum* على الوسط الغذائي PDA في الاطباق الزجاجية المعقمة . وضع في كل طبق بتري قطر 9 سم قرص قطره 5 ملم من مستعمرة المقاوم الحيوي مع قرص مماثل من الفطر *Fusarium* وبعمر 5 أيام و بشكل مقلوب حتى يلامس الغزل الفطري سطح PDA مع أحتساب المسافة الفاصلة بين القرصين 4 سم تقريبا و بواقع ثلاث ة مكررات لكل فطر .سجلت البيانات بعد 7 أيام من

التحضين في درجة 25ْ م،قدرت درجة التضاد حسب السلم الخماسي الذي أشار اليه Bell أخرون (1982) أذ تمثل محاوره :

1- نمو الفطر المقاوم يغطي الطبق دون نمو الفطر الممرض .

2- نمو الفطر المقاوم يغطي ثلثي الطبق و الثلث الباقي لنمو الفطر الممرض .

3- نمو الفطر المقاوم يغطي نصف الطبق و يغطي الفطر الممرض النصف الاخر و عدم وجود منطقة فاصلة بينهما .

4- نمو الفطر المقاوم يغطي ثلث المساحة و الفطر الممرض يغطي الثلثين .

5- الفطر المقاوم لاينمو و يغطي الفطر الممرض الطبق بالكامل .

يكون المقاوم الحيوي فعالآ عندما تكون قدرته التضادية 2 أو اقل مع الفطريات الممرضة .

الكشف عن الانزيمات المحللة للبكتين في الفطريات:

أستخدم الوسط الذي وصفه Hankin اخرون (1971) أذ يحتوي اللتر الواحد من الوسط على :1غم خلاصة الخميرة و 15 غم اجارو 5 غم بكتين البرتقال و 2 غم $(NH_4)_2SO_4$و4غم KH_2PO_4 و6 غم Na_2HPO_4 و0.2 غم $FeSO_4.7H_2O$ و1ملغم $CaCl_2$ و10 مايكروغرام H_3BO_3 و10 مايكروغرام $MnSO_4$ و 70 مايكروغرام $ZnSO_4$ و50 مايكروغرام $CuSO_4$ و10 مايكروغرام MoO_3 والاس الهيدروجيني7 للكشف عن انزيم Pectate lyaseو5 للكشف عن Polygalacturanase .حضنت الاطباق مدة 5 أيام ثم اضيف المحلول المائي 1 % من الكاشف Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)الى الاطباق الحاوية للفطريات النامية . يترسب الكاشف بتماس مع البكتين في الوسط و تظهر منطقة رائقة حول المستعمرة الفطرية دليلآ على تحلل البكتين.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج و كما يبين الجدول (1) عزل تسعة من الفطريات تعود الى ثمانية أجناس منها سبعة أنواع تعود الى الفطريات الناقصة ونوع وا حد يعود الى الفطريات الكيسية ونوع أخر يعود الى الفطريات اللاقحية . وأشارت النتائج الى ان الفطريات الناقصة ومنها الداكنة كانت أكثر تواجداً مقارنة بالفطريات الاخرى ومن المحتمل ان تعزى سيادة تواجدها الى تحملها للجفاف وبقائها فعالة مددآ طويلة في الأنسجة الداخلية للبذور بشكل غزل فطري او ابواغ كلاميدية (Neergaard ,1977).وبلغت نسبة عزل الفطر *Alternaria dianthicola* (7و2.5%) في بذورالصنف المحلي والاحمرعلى التوالي وعزل الفطر *Aspergillus* من بذورالاصناف الثلاثة ويعود اليه *A.niger* و *A.flavus* والطورالكامل *Eurotium*. يشير الملاحظات البارزة الى أحتواء بذور الصنف المحلي على أكبر عدد من الفطريات وقد يفسر هذا

تعرض النباتات للفطريات في الحقل فضلاً عن فرص اصابتها بالفطريات اثناء جمع البذور وتجفيفها وخزنها والتي قد يكون مصدرها الهواء او التربة او أسطح أوراق النباتات (Stetzenbach وآخرون ، 1999) .

يعد الفطر *Fusarium* أحد أهم الفطريات المسببة لامراض تعفن البذور وموت البادرات وتعفن الجذور لكثير من النباتات (Gray واخرون,1999) و كانت نسبة عزل النوع *F. culmorum* 1 % من الصنف المحلي والنوع *F.oxysporum* 1 % من الصنف الاحمر.كما وجد ان انواعآ من هذا الفطر تنقل في بذور القرنفل (Noble and Richardson 1968 ,) .وصلت نسبة إنبات بذور القرنفل للاصناف الثلاثة المحلي والاحمر والابيض 70و 80و 85%على التوالي والجدول (2) يوضح تأثيرالفطر *F.oxysporum*في خفض نسبة إنبات بذور الصنفين المحلي والاحمر الى 28.0 و 16.0%على التوالي و 28 و48% على التوالي مع الفطر *F.colmorum*. إن الصنف المحلي حساس للاصابة بكلا النوعين من الفطر وان الصنف الاحمرحساس للنوع *F.oxysporum* ومتوسط الحساسية لنوع *F. colmorum*في حين كان الصنف الابيض Doppino مقاوم آ لكلا النوعين من الفطر .وهذه النتائج تتفق مع ماذكرهBakerو Tammen (1954)من أن أصناف القرنفل تختلف في مقاومتها لفطر *Fusarium* وذكر ان الصنف Miller's Yellow حساس والصنف Sim مقاوم .

يوضح الجدول (3) أن للمقاوم الحيوي *T.harzianum* كفاءة تضادية عالية ضد الفطرين *F. colmorum* و*F. oxysporum* اذ وصلت درجة التضاد الى 1.3 و 1.6 على التوالي وذلك حسب السلم الخماسي و تفوق ا معنويآ على معاملة المقارنة التي لم يستخدم فيها المقاوم الحيوي و بلغت نسبة التثبيط 68.5 % و 88.0 % لكلا الفطـرين على التوالي . و لقد ذكر Elad و Chet (1986) أن القدرة التضادية للفطر *T. harzianum* تعود الى الاستعمار السطحي لهايفات الفطر و اختراقه لهايفات الفطريات الممرضة أو أفراز مضادات حياتية (El-Farnawany and Shama ,1996 و Papavizaz, 1985). واشار Kucuk و Kivane (2004) ان عزلات الفطر *T.harzianum* نمت بمعدلات اسرع على وسط PDA اكثر من المسببات المرضية و انه ثبط نمو ثلاثة فطريات تنقل بالتربة و من المعروف ان هذا الفطر ينتج العديد من المضـادات الحيـوية مثل Trichodermin و Trichodermol و Harzianum A و Harzianolide.وامكن مقاومة ذبول القطن المتسبب عن فطر *F. oxysporum* و ذلك بمعاملة البذور بـلبواغ الفطر *T.harzianum*و كذلك في مكافحة موت البادرات المتسبب عن الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Sclerotium rolfsii* و *F.oxysporum f. sp carthami* (العروسي وميخائيل، 2003).

اظهر اختبار انتاج الانزيمات المحللة للمواد البكتينية قدرة الفطر *F. oxysporum* على انتاج الانزيمات المحللة للمواد البكتينبة (polygalacturonase و pectatelyase) بدرجة عالية اذ ظهرت منطقة رائقة حول مستعمرة الفطر بقطر 6 سم عند الاس الهيدروجيني 5 و7 على التوالي مقارنة بالنوع *F. colmorum* الذي لم تتجاوز المنطقة الرائقة حوله بضع ملمترات (الشكل ، 1) و هذا يفسر قدرة الفطر على الاصابة و خفض نسبة انبات البذور .أن انتاج الفطريات للانزيمات مهم جدا في اصابة العائل و تحليل المواد الغذائية و تحطيم المخلفات العضوية (Hankin and Anagnostakis1975 و Agrios,2005).

الجـدول (1) : اختبار سلامة بذور ثلاثة أصناف من القرنفل على وسط PDA.

الفطريات المعزولة	% لعزل الفطريات		
	الصنف المحلي	الاحمر Dwarf	الابيض Doppio
Alternaria dianthicola	7.0	2.5	0.0
Aspergillus flavus	3.0	1.0	0.0
A. niger	1.0	0.0	0.0
Aspergillus spp.	1.0	2.0	1.0
Eurotium	1.0	0.0	0.0
Fusarium culmorum	1.0	0.0	0.0
F. oxysporum	0.0	1.0	0.0
Macrophomina phaseolina	1.0	0.0	0.0
Penicillium spp.	2.0	2.0	0.0
Rhizopus stolonifer	1.0	0.0	0.0
Stemphyllium herbarum	2.0	0.0	0.0
Yeasts	3.0	0.0	0.0

الجـدول (2) : تأثير فطـــر *Fusarium* في نسبة إنبات بذور القرنفل .

	% للانبـــات

الاصناف	المعامـــلات		
	المقارنة	*F. colmorum*	*F. oxysporum*
المحـــلي	70	28.0	28.0
الاحمـــر	80	48.0	16.0
الابيـــض	85	60.0	80.0

الجدول (3) :التأثير التضادي للمقاوم الحيوي *T. harzianum* في نمو فطريات *Fusarium* .

الفطريات	درجـة التضاد		% للتثبيط
	المقارنة	*T. herzianum*	
F. colmorum	**5.0**	**1.3**	**62.5**
F. oxysporum	**5.0**	**1.6**	**88.0**

أ **ب**

الشكل (1) انتاج انواع فطر *Fusarium* للانزيمات المحللة للمواد البكتينية:

أ –فطر *F. colmorum* وجود منطقة رائقة بسيطة حول المستعمرة .

ب فطر *F. oxysporum* وجود منطقة رائقة كبيرة حول المستعمرة .

المصـادر

الرفاعي ، الاء علاء الدين . 2002 . الفطريات المصاحبة لبذور ثلاثة أصناف من الحنطة وتأثير بعض الانواع على الانبات.مجلة ابحاث جامعة البصرة ، 28: 125–142.

العروسي ، حسين وسمير ميخائيل 2003 . مكافحة الامراض النباتية . مكتبة المعارف الحديثة ، الاسكندرية ، مصر . 280 صفحة .

طواجن ، احمد محمد موسى1987 . نباتات الزينة . مطبعة جامعة البصرة . 502 صفحة .

ميخائيل ، سمير 2000 . امراض البذور . الطبعة الثانية . منشأة المعارف بالاسكندرية ، مصر. 334 صفحة .

Agarwal, V. K. and Sinclair, J. B. 1997. Principles of Seed Pathology . 2*nd*. *ed*. Lewis Publishers. CRC. 539-pp.

Agrios ,G.N. 2005.Plant Pathology. 5th. *ed* . Elsevier Academic Press . 922pp.USA.

Baker, R. and Tammen , J. 1954. *Fusarium* stem rot of carnation . Colo. Flw. Gro. Assoc. Bull. 58:1-3.

Bell, D. K.; Wells, H. D. and Markham, C. R. 1982 The *in vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology , 72 :379 – 382 .

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium.* Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surry. England . 237 pp.

Cook, R.J. and Zhang, B.X. 1985. Degree of sensitivity to metalaxy 4 with the *Pythium* spp. pathogenic to wheat in the pacific north west. Plant Dis., 69 : 686-688.

Elad, Y.,and Chet, I.1986. Biological control of *Fusarium spp*. in cotton, wheat, muskmelon by *T. harzianum*.J.Phytopathol,116:39-47.

Ellis, M . B .1971 . Dematiaceous hyphomycetes . Commonwealth Mycological Institute.Kew , Surrey, England.608 pp.

El-Farnawany, M. and Shama , S. 1996. Biological control of *Rhizoctonia solani* affecting bean seedlings damping –off. Alexanderia J. Agric. Res.,41:253-260.

Gray, L.E.; Achenbach, L.A.; Duff, R. and Lightfoot, D. 1999. Pathogenicity of *F. culmorum f. sp. glycines* isolates on soybean and green bean plants. J. Phytopathol., 147 : 281-284.

Hankin, L.; Zucker,M. and Sands, D.C. 1971.Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria.Appl. Microbiol. 72:205-209.

Hankin,L.and Anagnostakin,S.L.1975.The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia.,67(2)597-607.

Holley, W.D. and Baker, R. 1966. Carnation Production. Including the history, breeding, culture and marketing of carnation. Colorado. Carnations. 142 pp.

ISTA (International Seed Testing Association). 1976. International Rules for seed testing. Seed Sci. and Technol. 4:3–49.

Kucuk , C .and Kivane , M .2004 . *InVitro* Antifungal activity of *T.harzianum*. Turk. J . Biol .28:111-115.

Neergaard,P.1977.Seed Pathology.The Macillian Press LTD .839pp.

Noble, M. and Richardson, M.J. 1968. An annotated list of seed-brone diseases. Commonwealth Institute, Surrey, England. 191 pp.

Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocldium*: Biology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopath., 23:23–54.

Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 1997. Fungi and Food Spoilage. 2*nd*. *ed*. Gailhersburg, Maryland: Chapman and Hall. 593 pp.USA.

Stetzenbach, L.; Butter, M. and Cruz-Perez, P. 1999. Fungal spores aerosolized from contaminated flooing materials (Abstr.). American Industrial Hygiene Association Conference, Toronto, June, 5-11, 1999.